

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CAMPUS UNIVERSITÁRIO GOVERNADOR VALADARES
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR- PMBQBM**

Eloisa Helena Medeiros Cunha

**Perfil imunológico e parasitológico de contatos de pacientes com hanseníase -
um estudo de acompanhamento**

Governador Valadares
2022

Eloisa Helena Medeiros Cunha

**Perfil imunológico e parasitológico de contatos de pacientes com hanseníase-
um estudo de acompanhamento**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares como requisito para obtenção de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Dirce Ribeiro de Oliveira

Governador Valadares
2022

Ficha catalográfica

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

Cunha, Eloisa Helena Medeiros.

Perfil imunológico e parasitológico de contatos de pacientes com hanseníase : um estudo de acompanhamento / Eloisa Helena Medeiros Cunha. -- 2022.

133 f.

Orientadora: Lucia Alves de Oliveira Fraga

Coorientadora: Dirce Ribeiro de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

1. Hanseníase. 2. Fatores imunológicos (quimiocinas e citocinas). 3. Fatores genéticos (TLR4). 4. Polimorfismo. 5. Coinfecção. I. Fraga, Lucia Alves de Oliveira, orient. II. de Oliveira, Dirce Ribeiro, coorient. III. Título.

Eloisa Helena Medeiros Cunha

Título: Perfil imunológico e parasitológico de contatos de pacientes com hanseníase - um estudo de acompanhamento.

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora, campus Governador Valadares, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 3 de junho de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Doutora Lucia Alves de Oliveira Fraga - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

Doutora Dirce Ribeiro de Oliveira - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

Doutora Roberta Olmo Pinheiro

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - RJ

Doutora Sandra Bertelli Ribeiro de Castro

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM)

Doutora Pauline Martins Leite Borges

Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

Doutora Gabriella Freitas Ferreira

Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

Juiz de Fora, 05/05/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Olmo Pinheiro**, **Usuário Externo**, em 03/06/2022, às 21:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucia Alves de Oliveira Fraga**, **Professor(a)**, em 06/06/2022, às 13:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pauline Martins Leite Borges**, **Professor(a)**, em 06/06/2022, às 15:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dirce Ribeiro de Oliveira**, **Professor(a)**, em 08/06/2022, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Bertelli Ribeiro de Castro**, **Usuário Externo**, em 09/06/2022, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriella Freitas Ferreira**, **Professor(a)**, em 10/06/2022, às 08:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0767644** e o código CRC **82E57765**.

“Que darei eu ao Senhor por todos os benefícios que me tem feito?
sl 116:12 Louvar-te-ei, Senhor, de todo meu coração; contarei todas as tuas
maravilhas! sl 9:1.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor e consumidor da minha fé. Que eu nunca me esqueça que tudo que tenho e sou, vem de ti Senhor.

A realização deste estudo deve-se, em grande parte, ao incentivo e a colaboração de pessoas as quais serei eternamente grata. E para essas pessoas, deixo a seguinte citação:

“Havendo um jardineiro, mais cedo ou mais tarde um jardim aparecerá”.

Rubens Alves

São elas:

À minha orientadora Prof.^a Dr^a. Lúcia Alves de Oliveira Fraga que dedicou muito do seu tempo me orientando. Obrigada pelos ensinamentos imunológicos, atenção, paciência e ajuda incondicional ao longo dessa pesquisa. Por ter me proporcionado uma das experiências mais incríveis da minha formação acadêmica que foi realizar partes dos experimentos dessa tese no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) - Atlanta/Geórgia. Obrigada por todas as vezes que me ajudou a encontrar soluções para os obstáculos que encontrei, por me acalmar e por ser muito mais que uma orientadora.

À minha coorientadora Prof.^a Dr^a.Dirce Ribeiro de Oliveira pela parceria e ensinamentos.

À Prof.^a Dr^a Jéssica K. Fairley da Emory University – Atlanta/Geórgia por ser colaboradora do nosso grupo de pesquisa, pelo acolhimento durante os experimentos e momentos mais que especiais.

Ao Dr. Willian Evan Secor e Me. Gretchen M. Cooley do CDC, pelo acompanhamento durante os experimentos, ensinamentos e disposição em ajudar.

Às Instituições de Ensino e Pesquisa – Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM/UFJF-GV), Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Emory University e *Centers for Disease Control and Prevention*-Atlanta/Geórgia – por proporcionarem meu aprendizado e minha formação acadêmica.

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

À Lorena Junia de Souza Santos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ pela disponibilidade e ajuda nos experimentos de Citometria de Fluxo.

À Lorena Bruna Pereira de Oliveira, Pedro Marçal e Marlucy Rodrigues Lima pela amizade, incentivo e colaboração no desenvolvimento desse estudo.

Aos integrantes do nosso grupo de pesquisa NuPqHans que foram fundamentais para a coleta e processamento das amostras, sempre dispostos a ajudar. Sem vocês essa pesquisa não teria sido possível! Eternamente grata a vocês.

Aos meus pais, Ageu (*in memoriam*) e Emília, alicerce da minha vida! Aos irmãos Nely, Milene e Adriel. Agradeço a presença amorosa, incentivo para que eu conseguisse completar este percurso. Em especial a minha irmã Milene, que me apoiou desde minha graduação. Esse título também é seu.

Ao meu esposo e amigo Adivam, pelo amor, carinho, companheirismo e por me incentivar a não desistir diante dos obstáculos. Obrigada por compreender a minha ausência durante esse período. Sem a sua força, incentivo e paciência comigo, a concretização desse trabalho seria impossível.

Ao meu pequeno Arthur! Por todos os ensinamentos mesmo tão pequeno. Minha força nos dias mais difíceis veio de você, do seu sorriso e cheirinho delicioso.

À equipe do Centro de Referências em Doenças Endêmicas Dr. Alexandre Castelo Branco – CREDEN-PES e a equipe da Unidade de Saúde de Limeira de Mantena por todo carinho.

Aos meus amigos por toda torcida e pelo incentivo demonstrado ao longo desse período.

A todos aqueles que porventura não tenha citado nominalmente, mas que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Por fim, um agradecimento especial a todos os participantes da pesquisa que prestaram contribuição fundamental para que a mesma fosse possível. Meu muito obrigada a todos pelas contribuições para o avanço da investigação científica na hanseníase.

RESUMO

A hanseníase é uma doença antiga, de evolução lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae*. O número anual de novos casos permaneceu estável na última década, indicando que a transmissão está em andamento, apesar da disponibilidade de tratamento (MDT). O diagnóstico reside nos sintomas clínicos. Assim, os métodos diagnósticos disponíveis não detectam indivíduos infectados assintomáticos. Nosso estudo baseia-se no estabelecimento de assinaturas de biomarcadores que podem ser utilizados para o diagnóstico precoce de contatos assintomáticos com infecção subclínica. O trabalho baseou-se no acompanhamento de subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase (CPB e CMB) em três etapas: Tempo zero (T0), com coletas em 2018, Tempos um (T1) com coletas em 2019/2020 e Tempo dois (T2), com coletas em 2022. Parâmetros imunológicos, genéticos (TLR4) e parasitológicos (*S. mansoni*) foram analisados. Foram utilizadas as técnicas imunológicas: CBA (Cytometric Bead Array) para dosagem de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) sem estimulação e com estimulação antigênica (ML) *in vitro*; ELISA e Multiplex. Assim como técnicas moleculares: qPCR, genotipagem e polimorfismo do gene TLR4. Os resultados mostraram que na cultura estimulada houve uma maior produção das quimiocinas CXCL8, CCL2, CXCL9 e CXCL10 pelo grupo CPB. Diferentemente, houve aumento significativo da produção de citocinas IL-6, TNF, IFN- α e IL-17 no grupo CMB. A análise complementar desses resultados, por meio da conversão em dados categóricos de assinaturas de quimiocinas e citocinas, apontou outras diferenças entre CMB e CPB que não foram detectadas na análise das variáveis contínuas. Na cultura estimulada pelo *M. leprae*, houve aumento na proporção de CPB alto produtores para as quimiocinas CXCL9, CXCL10, CCL2, CXCL8 e a citocina IL-10. Ao mesmo tempo, CMB apresentou alta secreção da quimiocina CCL5 e produção mais destacada de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- α , IL-6 e IL-17. Avaliamos a associação entre o polimorfismo TLR4 rs1927914 e a resposta imune em diferentes perfis (A vs. G e AA vs. AG vs. GG), e verificou-se que a presença do alelo A e do genótipo AA estava associada a um aumento da secreção de quimiocinas e citocinas, independentemente da condição da cultura. Por meio da análise dos parâmetros categóricos, foi encontrada maior produção de CXCL8 e TNF em indivíduos do genótipo AA, independente do estímulo. Em uma avaliação mais completa, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos CPB AA/AG vs. CPB GG e CMB AA/AG vs. CMB GG, especialmente para os marcadores CXCL8, IL-6, TNF e IL-17 na cultura estimulada. É fundamental destacar a maior produção de IL-17 no grupo CMB AA/AG em relação ao grupo CPB AA/AG. No estudo de acompanhamento (T0 e T2), na cultura estimulada, observou-se que o grupo CPB em T2 apresentou produção significativa das quimiocinas CCL5, CXCL8, CCL2, e no grupo CMB, houve uma proporção mais considerável de altos produtores de quimiocinas CXCL9, CXCL10 e citocinas IL-10, IL-2, IL-17 e IL-6. Vale ressaltar que em T0 e T2, o grupo CMB destacou pela maior produção das citocinas IL-17 e IL-6, indicando um perfil

inflamatório neste grupo. Finalmente, as assinaturas de quimiocinas e citocinas foram analisadas de acordo com a resposta de anticorpos de grupos CPB e CMB aos antígenos de *M. leprae* (LID) e de *S. mansoni* (Schisto). Em relação aos dados referentes aos grupos considerados duplamente positivos LID-1(+)/Schisto(+) e duplamente negativos LID-1(-)/Schisto(-), houve uma maior produção das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, e das citocinas IL-17 e IFN- α , no primeiro grupo. Esses dados reforçam a importância de mais estudos de acompanhamento nos contatos para confirmação de biomarcadores como citocinas, quimiocinas e fatores genéticos (polimorfismo no gene TLR4) como ferramentas diagnósticas complementares. Assim, a integração de métodos imunológicos e moleculares para detecção de infecção subclínica em contatos torna-se relevante.

Palavras-chave: Hanseníase. Fatores imunológicos (quimiocinas e citocinas). Fatores genéticos (TLR4). Polimorfismo. Coinfecção.

ABSTRACT

Leprosy is an ancient, slowly evolving disease caused by *Mycobacterium leprae*. The annual number of new cases has remained stable over the last decade, indicating that transmission is ongoing despite treatment (MDT) availability. The diagnosis resides in the clinical symptoms. Thus, the available diagnostic methods do not detect asymptomatic infected individuals. Our study is based on establishing biomarker signatures that can be used for the early diagnosis of asymptomatic contacts with subclinical infection. The work was based on the follow-up of subgroups of contacts of patients with leprosy (CPB and CMB) in two stages: Time zero (T0), with collections in 2018, Time one (T1), with collections in 2019/2020 and Time two (T2), with collections in 2022. Immunological, genetic (TLR4), and parasitological (*S. mansoni*) parameters have been analyzed. Immunological techniques were used: CBA (Cytometric Bead array) to measure cytokines and chemokines in culture supernatants of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) without stimulation and with antigenic stimulation (ML) in vitro; ELISA and Multiplex. As well as molecular techniques: qPCR, genotyping, and TLR4 gene polymorphism. The results showed that in the stimulated culture, there was a more excellent production of the chemokines CXCL8, CCL2, CXCL9, and CXCL10 by the CPB group. Different from the production of cytokines, there was a significant increase in IL-6, TNF, IFN- α , and IL-17 in the CMB group. The complementary analysis of these results, through conversion into categorical data of chemokine and cytokine signatures, pointed out other differences between CMB and CPB that were not detected in the analysis of continuous variables. In the culture stimulated by *M. leprae*, there was an increase in the proportion of high-producing CPB to the chemokines CXCL9, CXCL10, CCL2, CXCL8, and the cytokine IL-10. At the same time, CMB showed high secretion of chemokine CCL5 and more outstanding production of cytokines pro-inflammatory TNF- α , IFN- α , IL-6, and IL-17. We evaluated the association between the TLR4 rs1927914 polymorphism and the immune response in different profiles (A vs. G and AA vs. AG vs. GG), and it was found that the presence of the A allele and the AA genotype was associated with increased secretion of chemokines and cytokines, regardless of the culture condition. Through the analysis of categorical parameters, higher production of CXCL8 and TNF was found in individuals of genotype AA, irrespective of the presence of the stimulus. In a complete evaluation, significant differences were found between the CPB AA/AG vs. CPB GG and CMB AA/AG vs. CMB GG groups, especially for the markers CXCL8, IL-6, TNF, and IL-17 in the stimulated culture. It is essential to highlight the higher production of IL-17 in the CMB AA/AG group compared to the CPB AA/AG group. In the follow-up study (T0 and T2), in the stimulating culture, it was observed that the CPB group at T2 showed significant production of chemokines CCL5, CXCL8, CCL2, and in the CMB group, there was a more considerable proportion of high producers of CXCL9, CXCL10 chemokines and cytokines IL-10, IL-2, IL-17 and IL-6. It is worth mentioning that at T0 and T2, the CMB group highlighted the higher production of IL-17 and IL-6 cytokines, indicating an inflammatory profile in this group. Finally, chemokine and cytokine signatures were analyzed according to the antibody response of CPB and CMB to *M. leprae* (LID) and *S. mansoni* (Schisto) antigens.

Regarding the data referring to the groups considered double positive LID-1(+)/Schisto(+) and double negative LID-1(-)/Schisto(-), there was a more excellent production of chemokines CCL2, CCL5, CXCL8, and cytokines IL-17 and IFN- α , in the first group. These data reinforce the importance of further follow-up studies in contacts to confirm biomarkers such as cytokines, chemokines, and genetic factors (polymorphism in the TLR4 gene) as complementary diagnostic tools. Thus, integrating immunological and molecular methods for detecting subclinical infection in contacts becomes relevant.

Keywords: Leprosy. Immunological factors (chemokines and cytokines). Genetic factors (TLR4). Polymorphism. Coinfection.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica de casos novos de hanseníase no mundo em 2020.....	19
Figura 2 – Estrutura das quimiocinas	31
Figura 3 – Um modelo de estágio esquemático de suscetibilidade genética à hanseníase	40
Figura 4 – Representação esquemática do desenho experimental do estudo	47
Figura 5 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura in vitro.....	63
Figura 6 – Assinaturas de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura in vitro.	65
Figura 7 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de contatos de pacientes com hanseníase após cultura in vitro de acordo com alelos e genótipos do TLR4 rs1927914.....	67
Figura 8 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de contatos de pacientes com hanseníase após cultura in vitro de acordo com os alelos e genótipos do TLR4 rs1927914 – Gráfico de Radar.....	69
Figura 9 – Frequência de alelos e genótipos de TLR4 rs1927914 em subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase.....	70
Figura 10 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura in vitro de acordo com os genótipos do TLR4 rs1927914.....	72
Figura 11 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura in vitro - follow-up.....	74
Figura 12 – Assinaturas de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura in vitro - follow-up.....	76

Figura 13 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura in vitro - Tempo 0 (T0) vs Tempo 2 (T2).....	78
Figura 14 – Assinatura de quimiocinas e citocinas em células mononucleares do sangue periférico de contatos LID-1(+) e LID-1(-) de pacientes com hanseníase após cultura in vitro.....	80
Figura 15 – Assinatura de quimiocinas e citocinas em células mononucleares do sangue periférico de contatos SCHISTO(-) e SCHISTO(+) de pacientes com hanseníase após cultura in vitro.....	82
Figura 16 – Assinatura de quimiocinas e citocinas em células mononucleares do sangue periférico de contatos DN DP de pacientes com hanseníase após cultura in vitro.....	84
Quadro 1 - Apresentação das cartelas para Poliquimioterapia para pacientes paucibacilares e multibacilares.	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers e sonda utilizados na q-PCR	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

aOR: Odds Ratio Ajustado

APCs: Células apresentadoras de antígenos.

B: Borderline

BAAR: Bacilo Álcool-Ácido Resistente.

BCG: Bacilo Calmette-Guérin.

BSA: Albumina de Soro Bovino a 1%

CBA: Cytometric Bead Array.

CC: Cultura Controle

CCL2/MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein.*

CCL2: Quimiocina C-C ligante-2

CCL5/RANTES: *Chemokine (C-C motif) ligand 5.*

CEP/UFJF: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora

CMB: Contato de Paciente Multibacilar.

CPB: Contato de Paciente Paucibacilar.

CREDEN-PES: Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais.

CSF: Fator Estimulador de Colônias

Ct: Número de Ciclos

CTLA-4: Antígeno de Linfócito T Citotóxico-4

CXCL10/IP-10: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 10/Interferon Gamma-Induced Protein 10.*

CXCL8/IL-8: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 8/Interleucina-8.*

CXCL9/MIG: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) /Monokine induced by gamma interferon.*

D: Dimorfo

DD: Dimorfa-Dimorfa

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DT: Dimorfa-Tuberculóide.

DV: Dimorfa-Virchowiana

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

ENH: Eritema Nodoso Hansênico.
ESF: Estratégia de Saúde da Família
Fg: Fentograma
FGF- β : Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos
gDNA: DNA genômico
GIF: Grau de Incapacidade Física
HPJ: Método de Hoffman-Pons-Janer
I: Indeterminado
IB: Índice Baciloscópico.
IDRI: *Infectious Disease Research Institute*
IFN- γ : Interferon-gama.
IFN: Interferon
IgE: Imunoglobulina E
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
IL: Interleucina
IL-1: Interleucina-1
IL-2: Interleucina-2
IL-4: Interleucina-4
IL-5: Interleucina-5
IL-6: Interleucina-6
IL-9: Interleucina-9
IL-10: Interleucina-10
IL-12: Interleucina-12
IL-15: Interleucina-15
IL-17: Interleucina-17
IL-17A: Interleucina-17A
IL-21: Interleucina-21
IL-22: Interleucina-22
IL-23: Interleucina-23
iNOS: Óxido Nítrico-Sintase Induzida
IOC/Fiocruz: Instituto Oswaldo Cruz
IP-10: *Interferon Gamma-Induced Protein 10*

K-K: Kato Katz

L: Lepromatoso

LID-1: *Leprosy Infectious Disease Research Institute Diagnostic-1*

LL: Lepra Lepromatoso.

MB: Multibacilar.

MCP-1: proteína quimiotática de macrófago-1

MDT/PQT: Terapia multidroga/ Poliquimioterapia

MFI: Intensidade Média de Fluorescência

ML: *Mycobacterium leprae*

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

MS: Ministério da Saúde.

ND-O: *Natural Octyl Disaccharide*.

NuPqHans: Núcleo de Pesquisa em Hansenologia.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

PAMP: Padrão molecular associado a patógenos (*Pathogens-Associated Molecular Patterns*)

PB: Paucibacilar.

PBMC: Células Mononucleares Do Sangue Periférico

PBS: Tampão fosfato salino.

PBS-Tween: Tampão Fosfato Salino Com Polissorbato

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*).

PGL-1: Glicolípido fenólico-1.

PQT: Poliquimioterapia.

PRRs: Receptores de reconhecimento padrões (*Pattern Recognition Receptors*)

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*).

RPM: Rotações Por Minuto

S. mansoni: *Schistosoma mansoni*

SA-PE: Estreptavidina Conjugada à Ficoeritrina

SEA: anti-antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni*.

SFB: Soro Fetal Bovino

SNP: Polimorfismos de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism).

SUS: Sistema Único de Saúde.

SWAP: *Soluble antigen preparation of adult schistosomes*

T: Tuberculóide

T0: Tempo 0

T1: Tempo 1

T1R: Reações Hansênicas do Tipo I

T2: Tempo 2

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TCR: Receptor de célula T

TGF: fator de transformação de crescimento

TGF- β : Fator de transformação de crescimento- β

Th1: linfócitos T *helper*

TLR: Receptor do tipo *Toll*.

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

Treg: Células T reguladoras.

TT: Tuberculoide-Tuberculóide

UBS-LM: Unidade Básica de Saúde de Limeira de Mantena

UFJF: Universidade federal de Juiz de Fora

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

V: Virchowiano

VV: Virchowiana-Virchowiana

LISTA DE SÍMBOLOS

α : Letra grega minúscula Alfa

β : Letra grega minúscula Beta

γ : Letra grega minúscula Gama

m: Letra arábica minúscula *Eme* que representa o prefixo mili, equivalente a 10^{-3}

μ : Letra grega minúscula *Mi* que representa o prefixo micro, equivalente a 10^{-6}

η : Letra grega minúscula *Eta* que representa o prefixo nano, equivalente a 10^{-9} .

χ : Letra grega minúscula *Qui*

k: Letra arábica minúscula *Ka* que representa o prefixo kilo, equivalente a 10^3

Da: Representação de unidade de massa atômica: Dalton

g: Letra arábica minúscula *Gê* que representa uma unidade de massa: grama

M: Letra arábica maiúscula *Eme* que representa a quantidade de matéria do soluto por litro da solução: mol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 HANSENÍASE E AGENTE ETIOLÓGICO	17
1.2 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO.....	17
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS	23
1.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA HANSENÍASE.....	25
1.4.1 Imunidade Inata	25
1.4.2 Imunidade Adquirida - Celular e Humoral	26
1.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	33
1.6 COINFECÇÃO POR HEMILTOS E SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE.....	38
1.7 ASPECTO GENÉTICO NA HANSENÍASE.....	39
2 JUSTIFICATIVA	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 GRUPO DE ESTUDO.....	46
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	46
4.3 DESENHO DO ESTUDO.....	47
4.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	48
4.5 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	48
4.6 CONFIDENCIALIDADE	49
4.7 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS	49
4.7.1 Coleta e preparo de material biológico	49
4.7.2 Antígeno	50
4.7.3 Determinação do nível de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de culturas de PBMC <i>in vitro</i> por citometria de fluxo	50

4.8 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> EM AMOSTRAS DE RASPADO INTRADÉRMICO AURICULAR DE CONTATOS.....	51
4.8.1 Ensaio de PCR quantitativo em Tempo Real – qPCR.....	52
4.9 ENSAIO MULTIPLEX PARA ANÁLISE DE ANTICORPOS.....	53
4.10 COLETA DE FEZES E ENSAIO SOROLÓGICO PARA <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	55
4.11 ENSAIOS DE GENOTIPAGEM.....	56
4.11.1 Coleta e preparo de material biológico para extração de DNA	56
4.11.2 Genotipagem dos SNPs selecionados	57
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	58
4.12.1 Análise convencional.....	59
4.12.2 Análise de assinatura de citocinas e quimiocinas	59
4.12.3 Diagrama de Venn	60
4.12.4 Gráficos de radar.....	60
5 RESULTADOS.....	62
5.1 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i>	62
5.2 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i>	64
5.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> DE ACORDO COM OS ALELOS E GENÓTIPOS DO TLR4 RS1927914.....	66
5.4 ANÁLISE DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> DE ACORDO COM OS ALELOS E GENÓTIPOS DO TLR4 RS1927914.....	68

5.5 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS TLR4 RS1927914 EM SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE	70
5.6 ANÁLISE DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS DO TLR4 RS1927914.....	71
5.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> – <i>FOLLOW-UP</i>	73
5.8 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> – <i>FOLLOW-UP</i>	75
5.9 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> – TEMPO 0 (T0) VS TEMPO 2 (T2).....	77
5.10 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> DE ACORDO COM A RESPOSTA AO LID-1(+) E LID-1(-).	79
5.11 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> DE ACORDO COM A RESPOSTA AO SCHISTO(+)/SCHISTO(-).	81
5.12 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> DE ACORDO COM A RESPOSTA AO LID-1(+)/SCHISTO(+) E LID-1(-)/SCHISTO(-)...	83
5.13 DETECÇÃO DE DNA DE ML EM RASPADO DÉRMICO DE CONTATOS POR MEIO DA QPCR.....	84

6. DISCUSSÃO	86
7. CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXO A – Questionários.....	115
ANEXO B – Termo de compromisso CONEP.....	122
ANEXO C – Estimativas de razão de chances considerando diferentes modelos de herança genética em relação aos SNPs rs4833095 (a), rs3804099 (b), rs1927914 (c) e rs17235416 (d) dos respectivos genes TLR1, TLR2, TLR4 e SLC11A1 analisados no presente estudo.....	123
ANEXO D – Caracterização da amostra em razão das variáveis genéticas adotadas no estudo	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 HANSENÍASE E AGENTE ETIOLÓGICO

A hanseníase ou Doença de Hansen é uma doença milenar com relatos na literatura que datam de 600 a.C., sendo a Ásia e África consideradas o berço da doença. Por volta do século XVI a doença foi trazida para o continente americano pelos imigrantes europeus e mais tarde, também pelos escravos africanos. Em 1873, o médico norueguês Gerhard Henrick Armauer Hansen descobriu o agente etiológico causador da hanseníase, *Mycobacterium leprae* (ML) que passou a ser denominado bacilo de Hansen, tornando-se a primeira doença atribuída a uma origem bacteriana (ALCAIS et al., 2005; ROMÃO e MAZZONI, 2013).

É caracterizada como uma doença infectocontagiosa, de evolução lenta, causada pelo ML, patógeno intracelular obrigatório, que não é cultivado *in vitro* e que apresenta tropismo por células apresentadoras de antígenos (APCs) (macrófagos, células dendríticas e monócitos) e células de *Schwann*. Acomete preferencialmente a pele e os nervos periféricos, afetando olhos, mãos e pés. As lesões se desenvolvem com diminuição da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, atrofias e paresias (SUZUKI et al., 2012; ROMÃO e MAZZONI, 2013).

Apresenta-se como um bacilo reto ou ligeiramente encurvado, com 2 a 8 micrômetros de comprimento, não formador de esporos, que se cora em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem em solução álcool-ácido sendo assim, classificado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Apresenta membrana e parede celular composta de peptidoglicanos (lipoarabinomanana-LAM) e ácidos micólicos (ácidos graxos de elevado peso molecular) e externamente uma cápsula rica em glicolípido fenólico-1(PGL-1), conferindo imunogenicidade e patogenicidade ao bacilo (MARTINEZ et al., 2014; DE SOUSA et al., 2017).

1.2 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

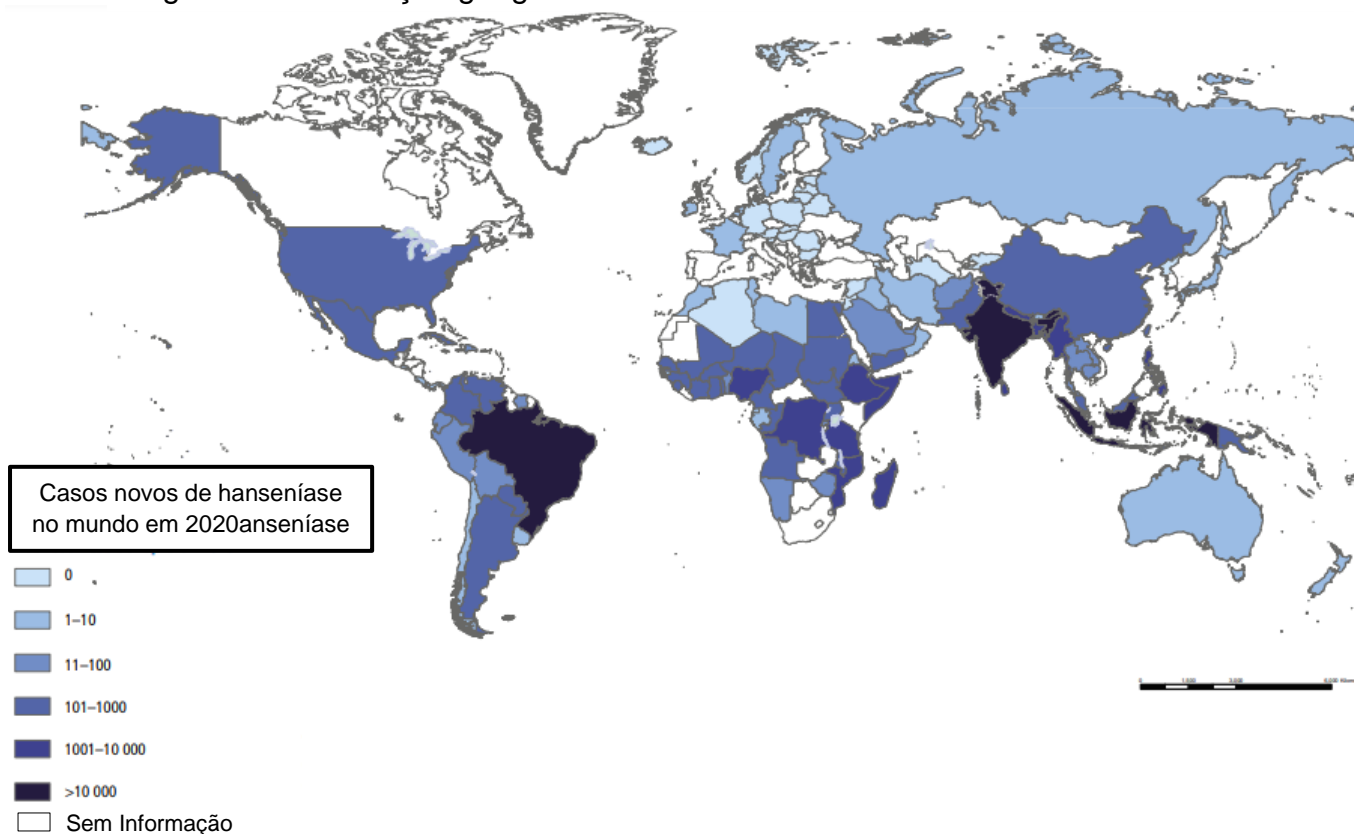
Embora curável, a hanseníase ainda está associada a preconceitos e estigmas sociais relacionados à morte e à mutilação, representando um problema significativo de saúde pública em várias partes do mundo, principalmente devido ao seu alto potencial incapacitante (GELUK, 2013; GARBIN et al., 2015; NORIEGA et al., 2016).

A hanseníase é a segunda doença micobacteriana infecciosa mais patogênica, precedida apenas pela Tuberculose, e embora a prevalência venha diminuindo nas últimas décadas devido principalmente à terapia multidroga (MDT/PQT), permanece endêmica em 13 países de baixa e média renda em todo o mundo, onde continua sendo uma das principais causas de neuropatia periférica e incapacidade. As tentativas de eliminar a doença têm enfrentado vários obstáculos, incluindo características do bacilo ML, como o longo período de incubação, o conhecimento limitado sobre o seu modo de transmissão e o difícil crescimento nos meios de cultura (GELUK, 2013; WHO, 2016; SMITH et al., 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência da hanseníase registrada no final de 2020 foi de 127.396 casos. Desses, 19.195 (15,1%) ocorreram na região das Américas e 17.979 foram notificados no Brasil, o que corresponde a 93,6% do número de casos novos das Américas. Brasil, Índia e Indonésia reportaram mais de 10.000 casos novos no ano de 2020 (Figura 1). Nesse contexto, o Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo, atrás apenas da Índia (WHO, 2021).

Ainda segundo os dados da OMS, do total de casos novos, 8.629 (6,8%) eram crianças e adolescentes menores de 15 anos e 7.198 casos novos foram diagnosticados com grau de incapacidade física (GIF) tipo 2, distribuídos nos 64 países que reportaram casos no mundo. Índia e Brasil foram os únicos países que diagnosticaram mais de 1.000 casos novos com GIF 2 no momento do diagnóstico, com 1.572 e 1.504 casos, respectivamente (WHO, 2021).

Figura 1 - Distribuição geográfica de casos novos de hanseníase no mundo em 2020.



Fonte: Adaptado do Relatório Epidemiológico da Organização Mundial da Saúde sobre hanseníase (WHO, 2021).

Em decorrência da epidemia de Covid-19, o diagnóstico e acompanhamento dos casos de hanseníase no Brasil foram prejudicados. Dados preliminares de 2020 mostram que foram registrados 13.807 casos novos no Brasil. Sendo que desse total 79,5% foram classificados como multibacilares. A distribuição é heterogênea no país, com maior concentração em estados da Região Norte e Centro-Oeste e em algumas regiões metropolitanas do Nordeste. Do total de casos novos, 672 (4,9%) foram

diagnosticados em menores de 15 anos e 1.108 (9,8%) tardiamente, com grau 2 de incapacidade (BRASIL, 2021).

No Estado de Minas Gerais, ao longo dos anos observou-se redução do número absoluto de casos novos de hanseníase, de 1.110 em 2016 para 694 casos notificados em 2020. Apesar da diminuição progressiva do número de casos notificados nos últimos anos, o cenário epidemiológico da doença no Estado é ainda preocupante. Alguns dados confirmam este panorama: 74% dos casos novos foram classificados como Multibacilar (MB) e desses, 13,25% já apresentavam GIF 2 no momento do diagnóstico; a detecção em menores de 15 anos (3,17%) e a persistência de municípios silenciosos (n= 627; 73,5%) (MINAS GERAIS, 2021).

De acordo com o relatório epidemiológico da Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares, no ano de 2020 o coeficiente de detecção de casos novos de hanseníase/100.000 habitantes foi de 15,7 na população em geral. Em relação a este mesmo indicador, em menores de 15 anos, o coeficiente foi de 1,8. Mesmo apresentando decréscimo de detecção ao longo dos anos, o município é classificado como “muito alto” em relação à força da endemia (GOVERNADOR VALADARES, 2021).

No município de Mantena, em 2016 foram notificados 27 casos (36,5%); em 2017, 26 casos (35,1%). Em relação a novos casos de hanseníase em menores de 15 anos, em 2016, foram 5 casos (83,3%) e em 2017, 1 caso (16,7%) (BRASIL, 2018).

Embora a hanseníase ocorra em todas as idades, é importante um olhar atento para os números de casos em menores de 15 anos, demonstrando um indicador de fonte ativa da infecção na comunidade, implicando em medidas de controle e monitoramento como, por exemplo, a busca ativa em escolas (BARRETO et al., 2017; VIEIRA et al., 2018).

Os mecanismos de transmissão da hanseníase, ainda não são totalmente elucidados. Estudos mais atuais corroboram que a principal via de transmissão ocorra de pessoa para pessoa através de gotículas respiratórias. A transmissão ocorre por exposição prolongada de uma pessoa suscetível com indivíduo não tratado com ML, especialmente paciente com hanseníase na forma MB, que apresentam alta carga bacilar, bem como fatores genéticos e socioeconômicos (SMITH et al., 2017; STEINMANN et al., 2017; PEDROSA et al., 2018).

Vários estudos mostraram que indivíduos consanguíneos de casos-índice que vivem por longos períodos, meses ou anos, na mesma casa (contatos) têm o maior

risco de desenvolver a doença. No estudo em questão, o risco de transmissão conjugal da hanseníase (de um cônjuge para outro) foi estimado entre 1 e 10% e acredita-se que ocorra em 3-5% dos cônjuges expostos à doença lepromatosa não tratada no parceiro (JOYCE, 2012).

Portanto, indivíduos com infecção subclínica têm importante papel na cadeia de transmissão, visto que eles podem carregar e transmitir o bacilo, pois estariam sem diagnóstico e tratamento adequados (MARTINS et al., 2010).

No Brasil, duas espécies de tatus silvestres, *Euphractus sexcinctus* e *Dasyus novemcinctus* foram identificadas como hospedeiros naturais de ML, mostrando que a transmissão zoonótica a humanos pode ocorrer devido à exposição direta através da caça ou consumo da carne infectada (FROTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2019). Em outros estudos foi encontrada uma associação entre o contato com *Dasyus novemcinctus* e o desenvolvimento da hanseníase em pessoas que vivem perto do habitat natural do tatu, sugerindo o potencial dessas espécies em disseminar a bactéria no meio ambiente (BRUCE et al., 2000; KERR et al., 2015; HONAP et al., 2018).

Estudo de Da Silva et al. (2018), avaliou o biomarcador anti-PGL-I em 146 indivíduos de uma cidade hiperendêmica localizada no oeste do estado do Pará. Os resultados constataram que indivíduos que fizeram a ingestão da carne de tatu com maior frequência (mais de uma vez por mês) mostraram níveis de anticorpos anti-PGL-I significativamente maiores do que aqueles cuja ingestão mensal foi menor. Portanto, pessoas que caçam, matam e comem a carne de tatu apresentam um risco maior de infecção pelo ML.

Outros estudos sugerem fontes ambientais como o solo de áreas endêmicas, água e contato de animais (tatus e esquilos vermelhos) próximo ao ser humano, como reservatórios temporários para o ML. No estudo de Tió-Coma et al. (2019), foram coletadas 73 amostras de solo de Bangladesh, Suriname e Ilhas Britânicas. Seus resultados identificaram DNA de ML em 16,0% das amostras de solo de casas de pacientes com hanseníase (Bangladesh), em 10,7% nos buracos dos tatus (Suriname) e 5% no habitat de esquilos vermelhos (Ilhas Britânicas). Estudo de Arraes et al. (2017), investigou a presença de ML viável em fontes naturais de água utilizadas pela população local em cinco municípios do estado do Ceará, nordeste do Brasil. Os resultados demonstraram que no total de 30 amostras de água analisadas, 23 (76%) apresentavam o ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) viável de ML. Sugerindo que

o ambiente tem um papel importante na manutenção da hanseníase endêmica na região do estudo.

Em 1981, a OMS recomendou que todos os pacientes registrados com hanseníase recebessem a terapia combinada com três medicamentos: rifampicina, clofazimina e dapsona, conhecido como Poliquimioterapia (PQT) (SMITH et al., 2017).

No Brasil, a Portaria nº 149 de 3 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016), define os critérios para tratamento conforme a classificação operacional e normas da OMS (Quadro 1).

Quadro 1 - Apresentação das cartelas para Poliquimioterapia para pacientes paucibacilares e multibacilares.

<i>Faixa</i>	<i>Cartela PB</i>	<i>Cartela MB</i>
Adulto	Rifampicina (RFM): cápsula de 300 mg (2)	Rifampicina (RFM): cápsula de 300 mg (2)
	Dapsona (DDS): comprimido de 100 mg (28)	Dapsona (DDS): comprimido de 100 mg (28)
	-	Clofazimina (CFZ): cápsula de 100 mg (3) e cápsula de 50 mg (27)
Criança	Rifampicina (RFM): cápsula de 150 mg (1) e cápsula de 300 mg (1)	Rifampicina (RFM): cápsula de 150 mg (1) e cápsula de 300 mg (1)
	Dapsona (DDS): comprimido de 50 mg (28)	Dapsona (DDS): comprimido de 50 mg (28)
	-	Clofazimina (CFZ): cápsula de 50 mg (16)

Fonte: Ministério da Saúde, 2016.

O esquema terapêutico para indivíduos paucibacilares ocorre com doses supervisionadas mensais, durante 6 meses de Dapsona (DDS) na dose de 100mg (1 comprimido) e Rifampicina (RFM) na dosagem de 600mg (2 comprimidos de 300mg) com doses diárias autoadministradas de Dapsona de 100mg por dia (BRASIL, 2016). Já para os indivíduos multibacilares o esquema de tratamento é diferente, envolvendo o acréscimo da Clofazimina (CFZ) e aumento no tempo de duração do tratamento que nesse caso serão de 12 meses com doses supervisionadas a cada 28 dias de Rifampicina (600mg, 2 comprimidos de 300mg), Clofazimina (300mg, 3 comprimidos de 100mg) e Dapsona (100mg, 1 comprimido de 100mg) e dose diária autoadministrada de clofazimina (50mg, 1 comprimido) e Dapsona (100mg, 1 comprimido). Ao final do tratamento é realizada nova avaliação dermatoneurológica e grau de incapacidade. Não havendo nenhuma alteração o paciente receberá alta por cura (BRASIL, 2016).

A partir de sete de Julho de 2021, a nota técnica 16/2021 da Coordenação Geral de Vigilância das Doenças em Eliminação, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis, Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, regulamenta a Poliquimioterapia única (PQT-U) que associa os fármacos Dapsona + Rifampicina + Clofazimina na apresentação de blísteres para o tratamento da hanseníase, mantendo-se os protocolos de tratamento de 06 (seis) meses para Paucibacilares e 12 (doze) meses para Multibacilares (BRASIL, 2021).

Embora a PQT tenha contribuído com a redução de casos em todo mundo, a detecção de novos casos a cada ano indica que a transmissão da hanseníase continua a acontecer (SMITH et al., 2017).

Uma estratégia para o controle da hanseníase, além do diagnóstico e tratamento precoces, envolve o monitoramento dos contatos domiciliares e sociais por meio da avaliação dermatoneurológica e da vacinação com o bacilo *Calmette-Guérin* (BCG) (BRASIL, 2016). Devido ao longo período de incubação do ML no hospedeiro, a população em geral deve ser mantida sob constante vigilância, particularmente em áreas endêmicas (DE SOUZA et al., 2016).

De acordo com o Guia Prático sobre a Hanseníase (BRASIL, 2017), define-se como contato domiciliar, toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido, conviva ou tenha convivido com o doente de hanseníase, no âmbito domiciliar, nos últimos cinco anos anteriores ao diagnóstico da doença, podendo ser familiar ou não. Já o 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 vizinhos, colegas de trabalho e de escola, entre outros, necessitando ser investigados de acordo com o grau e tipo de convivência.

A possibilidade da inclusão de testes imunológicos, sorológicos, nos exames clínicos dos contatos, pode contribuir para a identificação de indivíduos infectados, e que por meio de uma intervenção precoce, auxiliará favoravelmente o controle da doença (CARDONA-CASTRO et al., 2005; MIERAS et al., 2018).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

A maioria dos indivíduos é naturalmente resistente à hanseníase, mas apesar de haver mínima variação genética entre os isolados de ML, indivíduos susceptíveis podem manifestar formas completamente diferentes da doença, variando de imunidade celular forte em pacientes tuberculóides a respostas predominantemente humorais em lepromatosos (GELUK, 2013). Isso se deve ao fato de as diferentes formas da doença serem caracterizadas em parte pelos padrões de resposta imune do hospedeiro (AARÃO et al., 2018).

A classificação da hanseníase leva em consideração o amplo espectro de manifestações, segundo as peculiaridades clínicas, imunológicas e histopatológicas. Sendo aceitas três classificações: classificação de Madri (1953), classificação de Ridley e Jopling (1966) e a classificação operacional da OMS (1982).

A classificação de Madri tem como base as características clínicas e baciloscópicas, dividindo a hanseníase em dois grupos polares instáveis, indeterminado (I) e dimorfo (D) ou borderline (B) e dois tipos polares estáveis, tuberculóide (T) e virchowiano (V) ou lepromatoso (L). Atualmente esta classificação é adotada pelo Ministério da Saúde (MADRI, 1953; BRASIL, 2016; 2017).

Em 1966 Ridley e Jopling, utilizando o conceito espectral e baseado em critérios clínicos, baciloscópicos, imunológicos e histopatológicos propuseram cinco formas clínicas: Tuberculóide-Tuberculóide (TT) apresenta doença localizada, intensa resposta imune celular, poucos bacilos e lesões limitadas; Virchowiana-Virchowiana (VV), extrema suscetibilidade ao *M. leprae*, em que a proliferação disseminada do bacilo resulta em lesões de pele difusamente distribuídas e está associada a forte resposta humoral com anticorpos anti- *Mycobacterium leprae*. Na subdivisão dimorfa (D) em dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV), observam-se formas imunologicamente instáveis com evolução progressiva de DT para DV com redução da resposta imune mediada por célula acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosos, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos (RIDLEY E JOPLING, 1966; GOULART et al., 2002).

Em 1988, a OMS com intuito de simplificar a classificação e padronização terapêutica, estabeleceu uma classificação segundo o número de lesões. Sendo considerados como paucibacilares (PB), indivíduos com até cinco lesões cutâneas e/ou um tronco nervoso acometido e multibacilares (MB), indivíduos com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso acometido. No local onde o

exame baciloscópico é disponível, pacientes com resultado positivo são considerados MB, independentemente do número de lesões (WHO, 1988).

A hanseníase apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade, com período de incubação variando de sete meses a dez anos, sendo considerada uma das principais causas de incapacidades físicas, em razão do seu potencial de causar lesões neurais. Esse alto potencial incapacitante está diretamente relacionado ao poder imunogênico do ML (QUEIRÓS et al., 2016; BRASIL, 2018). A presença do ML nas terminações nervosas e células de *Schwann*, com consequente replicação, faz com que ocorra ruptura dessas células, desencadeando uma resposta inflamatória perineural que contribui para a destruição da mielina e consequente dano neural (AARÃO et al., 2018).

O dano do nervo periférico na hanseníase frequentemente resulta em disfunções sensoriais e motoras que levam a deformidades permanentes e/ou incapacidades. Estima-se que mais de um quarto dos pacientes com hanseníase apresenta algum grau de incapacidade e que cerca de metade desses pacientes apresentam incapacidade grau 2, correspondendo a danos neurológicos permanentes (PINHEIRO et al., 2018; AARÃO et al., 2018).

1.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA HANSENÍASE

1.4.1 Imunidade Inata

Evidências sugerem que a resposta imune inata, a primeira linha de defesa contra o ML, é decisiva na resposta contra o bacilo, e em última instância, no desfecho clínico (FONSECA et al., 2017; PINHEIRO et al., 2018). A maioria dos indivíduos expostos ao ML não desenvolvem a doença, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela resposta inata efetiva (MAZINI et al., 2016).

A principal característica do ML é sua capacidade de sobreviver dentro dos macrófagos, células dendríticas e células de *Schwann* do hospedeiro, utilizando para isso vários mecanismos para se internalizar e residir nessas células (NATH et al., 2015).

Os receptores de reconhecimento de padrões ("*pattern recognition receptors*" ou PRRs), tais como os receptores de reconhecimento do "tipo *Toll*" (*Toll-like receptors*

-TLR), receptores tipo NOD - domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeo contendo proteínas (NLRs), receptores de lectina tipo C, reconhecem padrões antigênicos moleculares associados aos patógenos ("*pathogens-associated molecular patterns*" ou PAMPs), durante a resposta da imunidade inata contra o bacilo (MODLIN, 2010; NATH et al., 2015). Após a interação de PAMPs com PRRs, a liberação de sinais intracelulares leva à indução de transcrição de genes importantes para ativação celular ou indução de fagocitose (FONSECA et al., 2017; PINHEIRO et al., 2018).

Krutzik et al. (2003), demonstraram que TLR2 e TLR1 são fortemente expressos em lesões da forma tuberculóide em comparação com a forma lepromatosa da doença. Esses dados fornecem evidências de que a expressão regulada e a ativação de TLRs no local da doença contribuem para a defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos. Além disso, ativação do TLR2/TLR1 por lipopeptídeos sintéticos do ML, desencadeiam a produção de fator de necrose tumoral (TNF- α), diferenciação de linfócitos T *helper* (Th1).

Diferentes moléculas lipoprotéicas que constituem o ML foram caracterizadas como ligantes e potentes estimuladores de TLRs, envolvendo principalmente TLR2. Ao ocorrer o reconhecimento do bacilo pelas células dendríticas, inicia-se uma cascata de sinalização com produção local de citocinas como a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12), que podem regular a inflamação, bem como manipular o posterior desenvolvimento da imunidade adaptativa, em direção a uma resposta Th1 ou Th2 através da atuação sobre os linfócitos T (KRUTZIK et al., 2003; SUZUKI et al., 2012; FONSECA et al., 2017; PINHEIRO et al., 2018).

1.4.2 Imunidade Adquirida - Celular e Humoral

A resposta imune adquirida envolve interação altamente específica de linfócitos, células dendríticas, macrófagos e fatores solúveis, como anticorpos liberados pelas células B, sendo categorizada em celular ou do tipo 1 e humoral ou do tipo 2 (NATH et al., 2015).

A diferenciação de células TCD4+ *naive* em células T auxiliares efetoras é iniciada pelo acoplamento de seu receptor de célula T (TCR) e moléculas co-estimulatórias, na presença de citocinas específicas produzidas pelo sistema imune inato após o encontro de patógenos. As citocinas interferon-gama (IFN- γ) e IL-12

iniciam a diferenciação de linfócitos T *helper* (Th1), que são caracterizadas pela alta produção de IFN- γ e são indispensáveis para a remoção de patógenos intracelulares. Em contraste, interleucina-4 (IL-4) desencadeia a diferenciação de linfócitos T *helper* (Th2). As células Th2 são fundamentais na organização da defesa contra patógenos extracelulares e, auxiliam as células B a produzir anticorpos. Para que ocorra a diferenciação de ambas as células Th1 e Th2, é necessário que as células do sistema imune inato respondem a antígenos microbianos, antígenos parasitários ou alérgenos (ARAÚJO, 2003; MORAES et al., 2006; SUZUKI, et al, 2012; VÁZQUEZ et al., 2014).

A resposta imunológica do tipo Th1 é induzida pelo reconhecimento de antígenos da parede do ML por meio do TLR2 levando à ativação de macrófagos e induzindo a produção inicial de IL-12 (SOUSA et al., 2007).

Com a produção de interleucina-2 (IL-2) haverá estímulo para o aumento de células T antígeno-específicas, resultando na redução da carga bacilar ou cura. Já a resposta imunológica do tipo Th2 produz as citocinas interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-10 (IL-10) e amplia a resposta humoral. A IL-4 estimula a produção de imunoglobulina E (IgE), e ambas IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem a ativação de macrófagos resultando em infecção progressiva (LASTÓRIA e ABREU, 2012; 2014).

A presença da IL-10 nas lesões suprime a produção de citocinas do tipo 1 por células TCD4, com uma redução significativa de IFN- γ e IL-2, resultando em uma resposta ineficiente ao ML (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

A polarização da resposta imune específica pelo ML é um elemento importante na patogênese da hanseníase e na determinação da manifestação clínica. A resposta de citocinas do tipo Th1 foi demonstrada em lesões de pacientes TT, enquanto uma resposta de citocinas do tipo Th2 foi associada a formas lepra lepromatosa (LL) (MODLIN, 2012).

Pacientes com a forma TT apresentam um perfil de citocinas relacionadas à resposta de linfócitos Th1, com citocinas inflamatórias: IFN- γ , IL-2, interleucina-15 (IL-15) e TNF- α , representando uma resposta com capacidade de contenção dos bacilos em granulomas bem formados e correlação negativa com o índice baciloscópico (IB) (SALGAME et al.,1992; BHAT; PRAKASH, 2012). Enquanto, a resposta imune de pacientes LL é caracterizada por um perfil Th2 com produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 e ativação de células T reguladoras (Tregs), produção de

anticorpos incluindo formação de complexos imunes e falha em restringir o crescimento do ML.

Por vários anos, a principal interpretação da resposta de defesa do hospedeiro foi fundamentada na caracterização do paradigma imune estabelecido entre os linfócitos Th1 e Th2. Porém, com os avanços no conhecimento da imunologia, surgiram novas abordagens, juntamente com o envolvimento de novas vias da resposta imune que mudaram a explicação do paradigma estabelecido das formas polares da doença, especialmente com a identificação de novos subtipos de linfócitos T como, Th9, Th17, Th22 e Tregs (MODLIN, 1994; SAINI et al., 2016; DE SOUSA et al., 2017).

A participação de células Th17 na hanseníase estariam envolvidas com a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-17 (IL-17A, IL-17), interleucina-21 (IL-21), interleucina-22 (IL-22) e interleucina-23 (IL-23), apresentando papel importante nas doenças autoimunes, na eliminação de patógenos e na patologia tecidual (SAINI et al., 2016; DE SOUSA et al., 2017).

Sabe-se que citocinas do padrão Th17 encontram-se aumentadas no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de contatos assintomáticos ou na borda da lesão de pele de pacientes do polo TT quando comparadas a pacientes do polo LL (SAINI et al., 2013; 2016). Em outros estudos, a dinâmica de resposta dos linfócitos Th17 tem sido sugerida como crucial para a modulação da atividade dos macrófagos, uma vez que, na forma tuberculóide, a IL-17 induz a produção de TNF- α , IL-6 e óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), levando à produção de intermediários reativos de oxigênio que destroem o bacilo (MARTINIUK et al., 2012; AARÃO et al., 2016).

As células Th17 desempenham importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas, especialmente nas superfícies de mucosas. A produção de IL-17 e IL-22 pelas células Th17 gera imunidade de mucosa por ativar a produção de peptídeos antimicrobianos e promover o recrutamento de neutrófilos. Contudo essa subpopulação de linfócitos TCD4⁺ (Th17) também está associada a diversas doenças autoimunes (KURTS, 2008).

Os contatos saudáveis apresentam maior expressão de células do perfil Th17 quando comparados com pacientes com hanseníase, sugerindo que após exposição ao ML este perfil está associado ao início da resposta imune adaptativa ao bacilo (SAINI et al., 2013).

Os linfócitos Th9 surgem da diferenciação de linfócitos Th0, e nas formas polares da doença, produzem citocinas como interleucina-9 (IL-9) e IL-10 que alteram o padrão da resposta imune. Enquanto que, na forma TT a IL-9 induz o desenvolvimento da resposta microbicida dos macrófagos através do sinergismo da resposta entre IFN- γ , IL-6 e IL-12 (FINIASZ et al., 2007; DE SOUSA et al., 2017). Além disso, na forma TT, a IL-9 regula negativamente a produção de IL-10, mostrando que a IL-9 tem um efeito pró-inflamatório. No entanto, na forma LL, a resposta dos linfócitos Th9 apresenta um comportamento distinto pelo qual a IL-9 inibe a produção de IL-4, bem como o IFN- γ e o TNF- α . Por outro lado, a IL-10 contribui para o desenvolvimento da resposta imunossupressora ao desativar a resposta microbicida dos macrófagos através da regulação positiva da produção de fator de crescimento (TGF- β) (DE SOUSA et al., 2017).

Os linfócitos Th22 foram recentemente reconhecidos como uma importante subpopulação envolvida na resposta imune a agentes infecciosos. Essas células fazem parte de um grupo de células TCD4+ que secretam isoformas da família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF- β), e citocinas como IL-22, TNF- α , IL-13 e IL-26. Porém, não produzem IL-17 ou IFN- γ (DE SOUSA et al., 2017).

Na hanseníase, aumento dos níveis de expressão de IL-22 tem sido observado na forma lepromatosa, participando dos mecanismos de maturação do fagolisossomo. O aumento do FGF- β na forma lepromatosa da doença reforça o papel crucial desse fator de crescimento no desenvolvimento da resposta reparadora, uma vez que essa forma clínica está associada a maior disseminação bacilar, maior dano tecidual e, conseqüentemente maior número de lesões (LIMA SILVEIRA et al., 2015; DE SOUSA et al., 2017).

Os linfócitos Treg representam outra subpopulação de linfócitos com o fenótipo CD4+ CD25+ FoxP3+, que também estão envolvidos na resposta imunopatológica na hanseníase (DE SOUSA et al., 2017). Palermo et al. (2012), relataram um número maior de Tregs, maior expressão de IL-10 e antígeno de linfócito T citotóxico-4 (CTLA-4) em lesões LL do que em lesões TT. O equilíbrio das respostas Th1/Th2, por si só, não explica totalmente a polarização nas formas clínicas na hanseníase. As células Tregs produtoras de TGF- β podem suprimir a função das células T efetoras. Dessa forma, ocorre aumento dessas células em pacientes LL estáveis, o que pode explicar a anergia associada a essa forma clínica (SADHU et al., 2016).

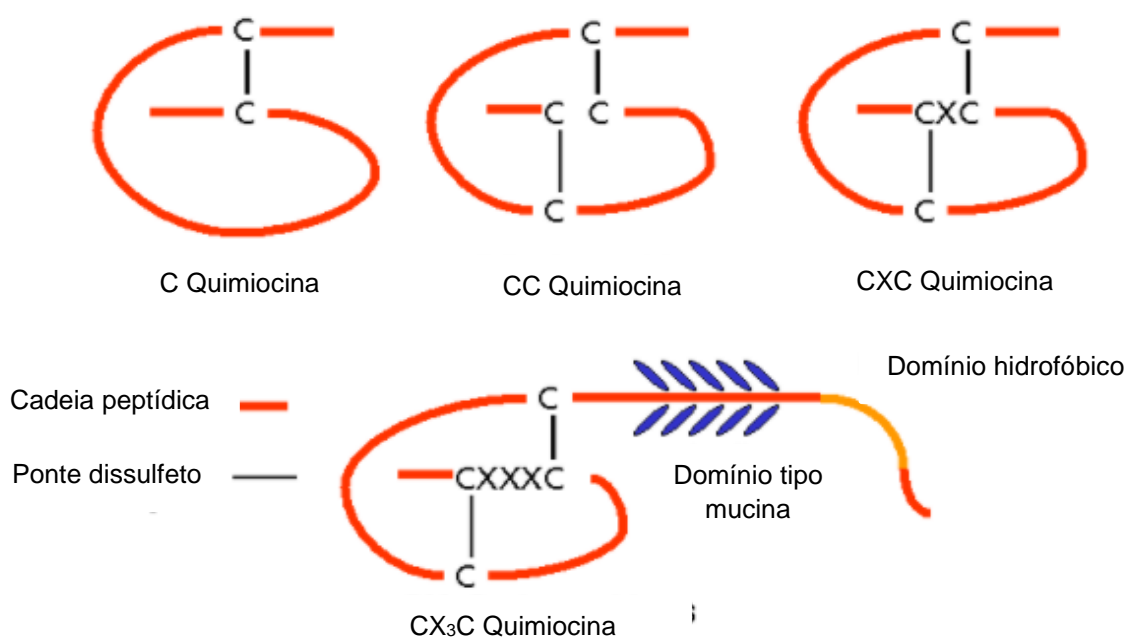
As citocinas e quimiocinas são dois importantes biomarcadores, que estão envolvidos na mediação e modulação das respostas do sistema imunológico. Vários tipos de superfamílias de citocinas são identificados: citocinas quimiotáticas (quimiocinas), interleucinas (IL), Interferon (IFN), fator estimulador de colônias (CSF), fator de transformação de crescimento (TGF) e fator de necrose tumoral (TNF). A principal diferença entre citocinas e quimiocinas é que as citocinas são pequenas substâncias proteicas secretadas pelas células do corpo, afetando outras células, enquanto as quimiocinas são uma das superfamílias das citocinas, contendo atividade quimiotática (BORISH; STEINKE, 2003; PALOMINO; MARTI, 2015).

As quimiocinas constituem uma grande família de pequenas citocinas, com peso molecular variando entre 7 e 15 kDa. Possuem constituição proteica e são capazes de coordenar a migração de grupos específicos de leucócitos, e, portanto, provavelmente estão envolvidas no direcionamento da infiltração celular nas várias formas de lesões hansênicas (KIRKALDY et al., 2003; PALOMINO; MARTI, 2015).

Algumas quimiocinas são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos, enquanto outras são consideradas pró-inflamatórias e sua liberação pode ser induzida durante uma resposta imune em um sítio de infecção (PALOMINO; MARTI, 2015).

A classificação das quimiocinas é baseada no número e disposição de resíduos de cisteína conservados na cadeia N-terminal. Desta forma, tal classificação nos leva a quatro famílias: C, C-C, C-X-C e C-X3-C (GUERREIRO et al., 2011; SAHINGUR e YEUDALL, 2015). A família C-C, tem suas cisteínas adjacentes, a C-X-C e C-X3-C, representa um ou três aminoácidos separando as cisteínas, e a família C, possui apenas um par de cisteínas, onde a letra C representa cisteína e X ou X3 representa um ou três aminoácidos, como apresentado na Figura 1.

Figura 2 – Estrutura das quimiocinas



Fonte: Adaptado de KOHIDAI, 2006.

Em geral, as quimiocinas CXC ativam principalmente neutrófilos, enquanto as quimiocinas CC são principalmente quimiotáticas para monócitos/macrófagos e linfócitos e desempenham um papel na mudança de classe de macrófagos M1 para M2 durante a transição da inflamação aguda para a crônica. As quimiocinas CC também são cruciais no desenvolvimento da imunidade adaptativa, propagando o recrutamento de linfócitos e a apresentação de antígenos (GUERREIRO et al., 2011; SAHINGUR; YEUDALL, 2015).

A quimiocina C-C ligante-2 (CCL2), também conhecida como proteína quimiotática de macrófago-1 (MCP-1), é uma das principais quimiocinas envolvidas na resposta do granuloma e é o quimioatratador e ativador mais importante para monócitos, recrutando linfócitos TCD4 e linfócitos T (MEDEIROS et al., 2015). Também está relacionada com o desenvolvimento de respostas do tipo Th2 para estimular a secreção de IL-4 (DESHMANE et al., 2009; PALOMINO e MARTI, 2015). Além disso, as células de *Schwann* são produtoras de CCL2 (MCP-1), atuando como um importante mediador de migração de macrófagos para o nervo periférico, ocasionando lesão experimental do nervo (FISCHER et al., 2008).

Uma diminuição da expressão de quimiocinas pode comprometer a ativação da resposta quimiotática do hospedeiro e assim, o ML poderia escapar da destruição

pelo sistema imunológico, contribuindo para o estabelecimento da infecção intracelular e conseqüentemente a disseminação da doença (GUERREIRO et al., 2013). Portanto, como há uma elevada resposta imune celular em contatos domiciliares de pacientes PB, o aumento dos níveis de CCL2, pode ser um fator protetor contra a hanseníase (GOULART et al., 2002)

Kirkaldy et al. (2003), investigando os mecanismos e o papel das quimiocinas e seus receptores envolvidos nas lesões cutâneas da hanseníase, observaram que a expressão das quimiocinas CCL2 (MCP-1) e CCL5 (RANTES), encontrava-se mais elevada nas lesões de pacientes BT que apresentavam reação hansênica em comparação com os pacientes BT que não apresentavam reação.

A importância da quimiocina CCL2 (MCP-1), e da citocina IFN- γ , também foram objetos de estudo de Geluk et al. (2012), como biomarcadores para distinguir a exposição ao ML na infecção subclínica.

Outra quimiocina investigada é a CXCL9 (MIG), pertencente à família CXC com papel importante na quimiotaxia de células imunes. É secretada por vários tipos de células, incluindo células imunes tais como linfócitos T, células NK (SMIT et al., 2003), células dendríticas (MUTHUSWAMY et al., 2008), macrófagos (IKEDA et al., 2014) e eosinófilos (TWOREK et al., 2013).

A quimiocina CXCL8 (IL-8), recruta predominantemente neutrófilos, monócitos e linfócitos T (PARK et al., 2003). Hasan et al. (2004), investigaram a resposta da CXCL8 em relação ao TNF- α em monócitos não infectados e infectados (BCG e ML) de pacientes virchowianos e controles saudáveis. Os autores encontraram níveis circulantes aumentados de CXCL8 e TGF- β , mas baixos níveis de TNF- α , em pacientes virchowianos. Concluíram que a IL-8 possui importante papel no recrutamento de células em pacientes com hanseníase apresentando infecções disseminadas.

Kirkaldy et al. (2003), relataram expressão das quimiocinas IL-8, MCP-1 e RANTES em biópsias de pele de lesões em todo o espectro da hanseníase, sugerindo um importante papel destas quimiocinas como recrutadoras de monócitos e linfócitos.

Outra quimiocina a ser considerada é a CXCL10, também conhecida como *Interferon Gamma-Induced Protein 10* (IP-10). Desempenha papel importante na inflamação, sendo secretada por macrófagos, células T e queratinócitos estimulados, promovendo a quimiotaxia de células T em locais de inflamação tecidual em resposta ao IFN- γ . Além disso, essa quimiocina induz o recrutamento de células efetoras do

tipo Th1 para locais de hipersensibilidade do tipo tardio, e têm sido identificadas em lesões de pacientes (KAPLAN et al., 1986)

Stefani et al. (2009), relataram que níveis séricos elevados de CXCL10 (IP-10) são observados em pacientes com reações hansênicas do tipo I. Estudo de Scollard et al. (2011), correlacionaram o aumento da expressão de CXCL10 no soro e em biópsias de pele de pacientes com reações hansênicas do tipo I (T1R), sugerindo um potencial papel dessa quimiocina como ferramenta de diagnóstico.

A quimiocina CCL5 (RANTES), atua como um quimiotático potente para muitos tipos de células, como monócitos, células NK, células T de memória, eosinófilos e células dendríticas (MOSER et al., 2004). Kirkaldy et al. (2003) demonstraram a elevação dessa quimiocina nas lesões de pele, sugerindo o papel da CCL5 na migração e ativação dos monócitos e células T nessas lesões.

Mendonça et al. (2007), avaliaram o papel das quimiocinas como marcadores de atividade de doença e identificaram níveis séricos elevados de MIP-1 α (CCL3), com atividade de recrutar e ativar macrófagos e linfócitos T e B, indicando o envolvimento dessa citocina nos granulomas das forma MB ou PB. Encontraram também níveis aumentados de eotaxina (CCL11) no plasma de pacientes com hanseníase em comparação com indivíduos não infectados, sugerindo que a dosagem dessa quimiocina poderia ser útil para auxiliar no diagnóstico de hanseníase.

A participação das quimiocinas nos eventos relacionados com as reações hansênicas é bastante evidenciado, entretanto existe uma escassez de informações no que se refere aos contatos de portadores de hanseníase. Nesse sentido, nosso estudo vem contribuir para ampliar o conhecimento do papel de marcadores imunológicos na infecção subclínica.

1.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Sabe-se que a detecção precoce e o tratamento da hanseníase associados aos resultados dos estudos das características genéticas, imunológicas e clínicas na infecção pelo ML são princípios fundamentais para auxiliar no controle da doença (BRASIL, 2016).

O Ministério da Saúde (MS) preconiza como estratégia para redução da infecção, a detecção precoce através da busca ativa de casos novos. Isso corresponde à vigilância de contatos domiciliares do doente de hanseníase e a cura

dos casos diagnosticados contribuindo para controlar a expansão da endemia e também prevenir as deformidades e incapacidades que estão associadas a impactos sociais, econômicos e psicológicos nos indivíduos (BRASIL, 2002; ARAÚJO, 2003; LANA et al., 2013; BRASIL, 2012).

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico. A avaliação clínica dos pacientes deve ocorrer através de anamnese clínica, exame geral e investigação dermatoneurológica para identificação de lesões ou áreas na pele com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos, alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas e, a presença de bacilos que pode ser confirmada na baciloscopia do esfregaço intradérmico ou na biópsia de pele (BRASIL, 2016).

A baciloscopia, o teste de intradermorreação (Mitsuda), a histopatologia, os testes imunológicos (sorologia e imunohistoquímica), genéticos (identificação de polimorfismos) e a eletroneuromiografia são ferramentas auxiliares que podem complementar o diagnóstico clínico (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Com o intuito de facilitar o diagnóstico e o tratamento da hanseníase, a OMS propôs uma classificação de acordo com o índice baciloscópico (IB), em paucibacilar (PB, IB menor que 2+) e multibacilar (MB, IB maior ou igual a 2+) (WHO, 1982). O IB foi proposto por Ridley e Jopling, em 1966 e baseia-se em uma escala logarítmica com variação entre 0 a 6. É o método de avaliação quantitativo mais correto e utilizado na leitura da baciloscopia em hanseníase (BRASIL, 2010).

Em pacientes com a forma tuberculóide, nos quais os bacilos são raros ou inexistentes, há uma limitação no uso da baciloscopia como exame auxiliar, uma vez que os resultados negativos não descartam a doença. Por isso, é necessário implementar ferramentas de diagnóstico precoce para obter um diagnóstico rápido e preciso (AMORIM et al., 2016).

O teste Mitsuda tem como objetivo avaliar a integridade da imunidade celular específica de um indivíduo ao ML. O teste não é diagnóstico, tem valor prognóstico e pode auxiliar na classificação da doença. A técnica consiste em injetar 0,1mL do antígeno integral de Mitsuda-Hayashi por via intradérmica, na face anterior do antebraço direito. Como respostas, o indivíduo poderá ter uma reação precoce ou tardia. A reação precoce, ou reação de Fernandez, é caracterizada por eritema e endurecimento local de 48 a 72 horas após a introdução do antígeno. Na reação tardia, ou

de Mitsuda, ocorre intensidade máxima por volta de 28 dias (LYON; LYON-MOREIRA, 2013; LYON; GROSSI, 2014).

Os resultados adotados para leitura da reação de Mitsuda foram formulados no Congresso Internacional em Tóquio (1948), a saber: negativo: ausência de resposta; duvidoso: infiltração com diâmetro menor que 5 mm e positivo: infiltração com diâmetro maior ou igual a 5 mm (LYON; GROSSI, 2014).

O exame histopatológico da pele ou nervos é frequentemente realizado para confirmação de casos com dificuldade de diagnóstico pela classificação de Ridley e Jopling (1966), quando há dúvida no diagnóstico diferencial com outras neuropatias, avaliação de episódios reacionais e acompanhamento de pacientes (ARAÚJO, 2003; LYON; GROSSI, 2014).

Em geral, o diagnóstico laboratorial é demorado, apresenta baixa sensibilidade e depende de amostragem invasiva e desconfortável para o indivíduo. Podendo gerar incertezas no fechamento do diagnóstico ou mesmo atrasos, comprometendo o início do tratamento e contribuindo para que pessoas infectadas desenvolvam piores condições e influencie negativamente a erradicação da hanseníase como um problema de saúde pública (LIMA et al., 2015).

Diante disso, as ferramentas de diagnóstico convencionais baseadas em características clínicas, contagem bacilar e histopatologia, não são suficientes para identificar indivíduos infectados e aqueles com infecção subclínica, levando a um diagnóstico tardio e dificultando a interrupção da cadeia de transmissão da doença.

O desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas, bem como os estudos de acompanhamento/monitoramento de contatos são necessários para definição de biomarcadores que contribuirão para a detecção precoce de casos de hanseníase.

A descoberta e elucidação da estrutura química do PGL-I em 1981, e mais tarde, a sua antigenicidade possibilitou um grande avanço da pesquisa em hanseníase, mostrando que pacientes no pólo LL produzem altos níveis de imunoglobulinas do tipo imunoglobulina M (IgM), reagindo contra esse antígeno. Enquanto pacientes no polo TT apresentam imunoglobulinas específicas em baixo nível de detecção, em torno de 30 a 60% em comparação ao polo LL, que é de 80 a 100% (CHO et al., 1983).

Posteriormente, Bühner-Sékula et al. (2003), propuseram o teste imunocromatográfico ou teste de fluxo lateral ou *ML Flow*, que tem como objetivo

detectar a IgM no soro de indivíduos contra o antígeno PGL-I do *Mycobacterium leprae*. O teste ML *Flow* foi desenvolvido como uma ferramenta simples, estável e rápida para duas aplicações, a saber: 1. Classificação correta de pacientes com hanseníase recém-diagnosticados e 2. Para identificação dos contatos de pacientes com hanseníase com risco aumentado de desenvolver hanseníase no futuro. Entretanto, a detecção de anticorpos IgM anti-PGL-I não pode ser utilizada como um teste de diagnóstico, mas pode ser utilizada como ferramenta auxiliar, uma vez que os resultados sorológicos podem ser considerados juntamente com os dados clínicos (BÜHRER-SÉKULA et al., 2007).

Com o advento da biologia molecular, surgiram expectativas para o diagnóstico da hanseníase por meio dos ensaios utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional ou PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Os trabalhos de Martinez et al. (2011; 2014), descrevem as técnicas de extração, amplificação e identificação do DNA do ML em amostras clínicas como sangue, secreção nasal, fragmento de tecido e urina de pacientes com hanseníase.

A PCR é uma importante ferramenta que possui alta especificidade diagnóstica e sensibilidade, que se baseia na amplificação de fragmentos de sequências genômicas do ML, sendo capaz de detectar 25 fg (10^{-15} g) de DNA da bactéria em diferentes amostras clínicas, como sangue e urina (MARTINEZ et al., 2014; TURANKAR et al., 2015).

Entre suas muitas aplicabilidades, a PCR permite confirmar casos iniciais de PB e hanseníase neural pura; indicar a presença de infecção subclínica nos contatos; monitorar tratamento; determinar a cura dos pacientes ou sua resistência aos medicamentos pela PQT; distinguir reação de recorrência e auxiliar na compreensão dos mecanismos de transmissão do ML (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Baseado na metodologia de PCR, um novo teste de diagnóstico foi desenvolvido por pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) em parceria com o Instituto Carlos Chagas (Fiocruz Paraná) e o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), ligado à Fiocruz e ao governo paranaense. O kit NAT hanseníase é o primeiro teste molecular comercial para doença desenvolvido no Brasil e o segundo exame autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esse registro, permite a comercialização do teste e é uma exigência para que o exame possa ser oferecido no Sistema Único de Saúde (SUS). Os pesquisadores ressaltam

a importância da aplicação de uma metodologia de ponta contra uma doença negligenciada (FIOCRUZ, 2021).

Várias outras técnicas imunológicas têm sido utilizadas para detectar componentes específicos do ML que possam auxiliar no diagnóstico precoce (MARTINS et al., 2012; MARTINEZ et al., 2014; LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Proteínas recombinantes do ML têm sido produzidas no IDRI (*Infectious Disease Research Institute*) associadas a dissacarídeo sintético semelhante ao PGL-1 e testadas em ensaios imunoenzimáticos ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). As proteínas denominadas (LID-1) e (NDO-LID) têm sido utilizadas em diversos testes para o diagnóstico precoce em hanseníase (DUTHIE et al., 2016; 2014; QIONG-HUA et al., 2013; FABRI et al. 2015; PENNA et al., 2016).

Entretanto, uma grande dificuldade em relação ao emprego dessas técnicas diz respeito às formas PB, nas quais os bacilos ou anticorpos específicos são dificilmente detectados na maioria dos casos (BANERJEE et al., 2010; MARTINEZ et al., 2014; SANDHIKA et al., 2016).

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Núcleo de Pesquisa em Hansenologia - NuPqHans/GV) têm mostrado a importância da utilização de ferramentas não só da biologia molecular como também da resposta imune, no estabelecimento de procedimentos para auxiliar no diagnóstico precoce da hanseníase principalmente entre os contatos domiciliares de casos índices (GOMIDES, 2014; SALDANHA, 2014; GAMA, 2017; MARÇAL, 2017).

Mais recentemente, Gama et al. (2018; 2019), utilizaram amostras de sangue e raspado intradérmico de casos de hanseníase e seus respectivos contatos domiciliares, para análise por qPCR (16S rRNA) e ELISA (anti NO-O-LID e LID-1). A análise integrada dos dados obtidos nesses estudos foi realizada por meio do algoritmo denominado *Random Forest* (floresta de decisão) com o objetivo de melhorar o desempenho dos testes para o diagnóstico de hanseníase. Os autores verificaram que isoladamente, a qPCR apresentou sensibilidade de 48,8% e especificidade de 100% no diagnóstico de casos de hanseníase. No ensaio de ELISA anti-ND-O-LID a sensibilidade alcançada foi de 57,9% e especificidade de 97,5%, enquanto que no ensaio de anti-LID-1, a sensibilidade e especificidade foram de 63,2% e 92,5%, respectivamente. Entretanto, os autores relataram que por meio da análise integrada dos dados pelo método *Random Forest*, obtiveram uma taxa de

sensibilidade de 81,6% e especificidade de 92,5% na predição de novos casos de hanseníase. Dessa forma, segundo os autores o modelo foi utilizado para o monitoramento de contatos domiciliares no período de 05 anos e identificaram entre os contatos, 02 doentes, mesmo antes do diagnóstico clínico.

Paralelamente, Marçal et al. (2018), avaliaram a resposta imune tanto humoral quanto celular de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares por meio do ensaio de ELISA. Estes autores utilizaram proteínas recombinantes do ML: LID-1, NDO-HSA e NDO-LID. Os antígenos LID-1 e NDO-LID destacaram-se, pois apresentaram boa acurácia em relação à detecção de anticorpos (Imunoglobulina G (IgG) total e subclasses, IgM) e citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10) nos grupos de pacientes com hanseníase. Os autores sugerem a utilização destes testes para auxiliar no diagnóstico precoce da hanseníase especialmente entre os contatos domiciliares.

Nesse sentido, a pesquisa na hanseníase tem sido priorizada para identificar marcadores específicos e desenvolver exames laboratoriais sensíveis para diagnóstico de casos assintomáticos. Assim, prevenir progressão da doença entre contatos, estabelecendo diagnóstico precoce e tratamento oportuno, são elementos fundamentais para interromper a cadeia de transmissão da hanseníase (LASTÓRIA; ABREU, 2014; LIMA et al., 2015).

1.6 COINFECÇÃO POR HEMILTOS E SUSCEPTIBILIDADE À HANSENÍASE

No Brasil, as infecções por helmintos coexistem com a hanseníase em muitas áreas endêmicas. As infecções por helmintos são predominantemente doenças da pobreza e afetam aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2016).

As complexas estruturas dos helmintos durante as infecções crônicas promovem alterações imunológicas que geralmente são caracterizadas por ativação de uma resposta Th2 (COLLEY; SECOR, 2014; CHATTERJEE; NUTMAN, 2015). Embora a resposta imune seja específica ao helminto, existem provas de que ativações não específicas podem influenciar o curso das coinfeções (CHATTERJEE; NUTMAN, 2015).

Com base na literatura, alguns estudos evidenciam que a coinfeção por helmintos ativaria uma resposta imune Th2 crônica, que aumentaria a probabilidade

de o indivíduo ter a doença MB. No estudo de Diniz et al. (2001; 2010), foi demonstrada uma associação entre infecções helmínticas transmitidas pelo solo e uma mudança para o extremo lepromatoso do espectro. Portanto, isso poderia aumentar o reservatório infeccioso na comunidade quando as coinfeções estão presentes.

O estudo realizado por Oktaria et al. (2016), confirmou que infecções por helmintos transmitidas pelo solo podem ter um papel na progressão para a forma mais grave da hanseníase, assim como, o desenvolvimento da reação hansênica do tipo II. Além disso, a infecção helmíntica pode alterar a resposta imune do hospedeiro e, portanto, ter um papel no curso de várias doenças (MANGAN et al., 2006).

Recentemente, um estudo de hanseníase e coinfeção pelo *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) desenvolvido pelo nosso grupo mostrou uma associação entre esquistossomose e a infecção pelo ML. Verificou-se uma maior probabilidade de infecção por *S. mansoni* em casos de hanseníase do que em indivíduos controles (assintomáticos sem história de hanseníase na família), com uma Razão de Chance (Odds Ratio) de (aOR = 3,37). Quando comparado com os contatos domiciliares, a associação foi ainda mais forte (aOR = 8,33). Foi confirmado também que a deficiência de vitamina D estava associada à hanseníase quando comparada aos controles (aOR = 4,74), mas não aos contatos (DENNISON et al., 2021).

1.7 ASPECTO GENÉTICO NA HANSENÍASE

Evidências científicas apoiam a hipótese de que a exposição ao ML não é condição única para desenvolvimento da hanseníase e que diferentes conjuntos de genes estão relacionados com a suscetibilidade do hospedeiro à doença (SAUER et al., 2015).

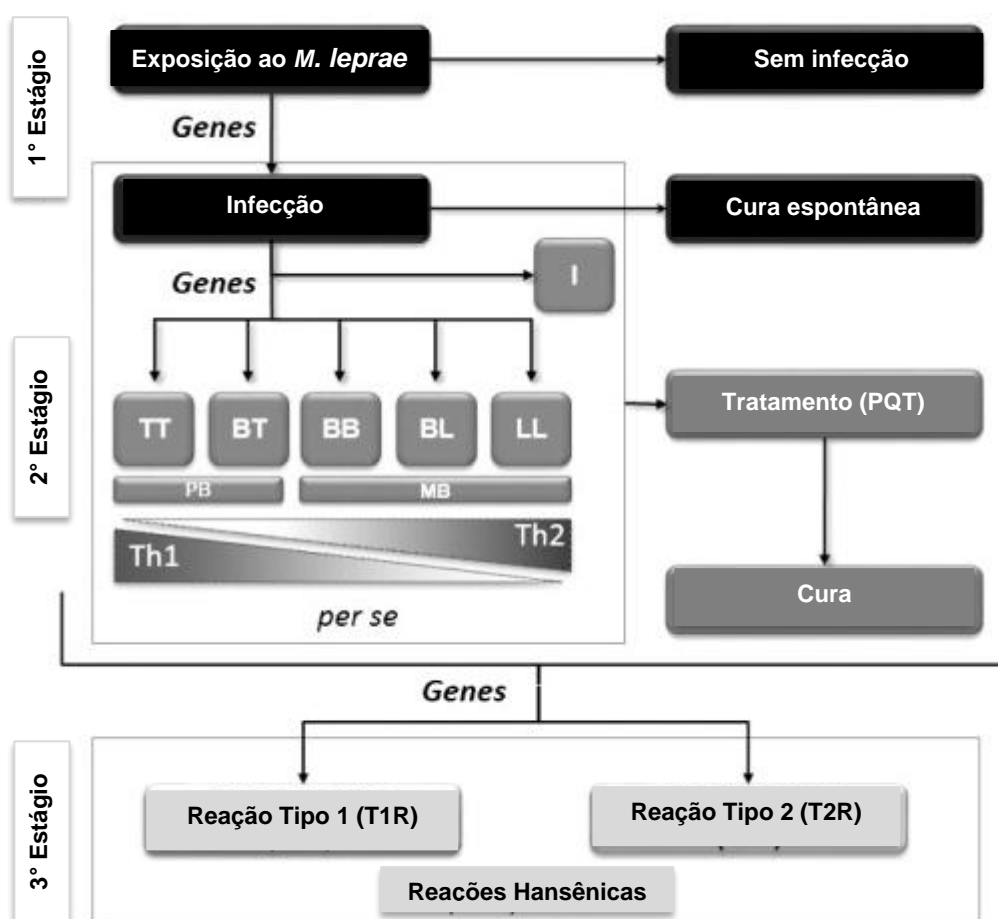
A genética desempenha um papel crucial no controle da suscetibilidade às doenças infecciosas, modulando a interação entre humanos e patógenos. Isso é particularmente evidente na hanseníase, uma vez que o agente etiológico, apresenta características não compatíveis com o amplo espectro de fenótipos da doença (CARDOSO et al., 2011; MAZINI et al., 2016; CAMBRI; MIRA, 2018).

Ao longo das últimas décadas, estudos genéticos de associação e ligação identificaram e confirmaram em populações distintas a importância de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP-*single nucleotide polymorphism*) em genes associados à

hanseníase, entre eles o TNF- α , TLR, LTA, HLADRB1, IL10, VDR e PARK2/PACRG. Esses genes estariam relacionados à suscetibilidade à doença em pelo menos dois momentos distintos: no desenvolvimento da doença *per se* e na determinação de suas diferentes formas clínicas (MIRA, 2006; CARDOSO et al., 2011; LASTÓRIA; ABREU, 2014; SAUER et al., 2015; CAMBRI e MIRA, 2018).

A Figura 2 demonstra o modelo de estágio esquemático de suscetibilidade genética à hanseníase.

Figura 3 – Um modelo de estágio esquemático de suscetibilidade genética à hanseníase



Fonte: Adaptado de Sauer et al., 2015.

Dentro deste contexto, destacam-se os TLRs que representam um grupo de receptores de reconhecimento padrão que desempenham um papel fundamental no sistema imunológico, detectando patógenos e iniciando uma cascata de sinalização

que resulta na secreção de citocinas inflamatórias, IFN tipo I, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos. Por sua vez, esses mediadores orquestram uma reação inflamatória e recrutam e ativam macrófagos e outras células efetoras da resposta imune inata. Os TLRs também contribuem para a ativação e maturação das células dendríticas que são essenciais para a iniciação e para moldar a resposta adaptativa das células T (KAWAI; AKIRA, 2010).

Vários estudos de associação genética foram realizados com TLR1, TLR2 e TLR4 e foram identificados diversos SNPs nesses genes que estão associados à hanseníase *per se* e às reações hansênicas (HART; TAPPING, 2012; MISCH et al., 2010; MARQUES et al., 2013).

Sabe-se que polimorfismos em *loci* específicos na família dos receptores TLR têm sido associados à hanseníase (CAMBRI e MIRA, 2018). As substituições de aminoácidos N248S e I602S no gene TLR1 foram associadas à susceptibilidade e à proteção contra a hanseníase, respectivamente. Em relação ao TLR2, verificou-se que os marcadores SNP 597 C/T (rs3804099) estavam associados à proteção, enquanto um microsatélite de 280 bp de comprimento do TLR2 foi associado com o risco de desenvolver reações hansênicas (BOCHUD et al., 2008).

Em seu estudo Marques et al. (2013), relataram associação de polimorfismo no gene TLR1 com hanseníase em diferentes populações brasileiras. Seus achados evidenciaram que o SNP N248S do TLR1 controla as respostas às micobactérias e contribui para a suscetibilidade à hanseníase. Além disso, esse polimorfismo regula as respostas imunológicas à estimulação por BCG.

Recentemente, Sartori et al. (2020) analisaram 19 marcadores genéticos distribuídos em 11 *loci* (14 genes) classicamente associados à hanseníase. Os autores sugerem que genes associados à suscetibilidade à hanseníase podem também desempenhar um papel importante na recorrência da doença.

O TLR4, está localizado no cromossomo 9q32–q33 e é expresso na superfície celular induzindo respostas imunes e inflamatórias subsequentes. Tem se mostrado um importante receptor de reconhecimento de LPS, derivado da membrana celular externa de bactérias gram-negativas. Apesar do LPS estar ausente nas membranas de micobactérias, estudos mostraram que *M. leprae* e *M. tuberculosis* são reconhecidos por TLR4 (MEANS et al., 1999; HART; TAPPING, 2012; MACIEL-FIUZA et al., 2022).

Diversos estudos de polimorfismo no gene desse receptor foram relatados, mostrando associações com susceptibilidade à hanseníase e que este efeito pode ser mediado pela modulação da sinalização de TLR4 pelo ML (ARBOUR et al., 2000; LORENZ et al., 2002; MILLER et al., 2005; BOCHUD et al., 2009).

Estudo de Agnese et al. (2002), demonstraram que mutações do TLR4 humano estão associadas a um aumento da incidência de infecção gram-negativa em uma população criticamente doente em risco.

Outros estudos relatam que semelhante ao TLR2, a função deficiente do TLR4 geralmente está associada ao aumento da suscetibilidade à infecção por micobactérias (HART; TAPPING, 2012).

Outras evidências relevantes em relação aos polimorfismos no TLR provêm dos estudos de Santana et al. (2017), que avaliaram o papel dos polimorfismos dos genes TLR1, TLR2 e TLR4. Os resultados demonstraram associação de polimorfismo no gene TLR2 e o aumento do risco de hanseníase *per se*. Além disso, esses autores verificaram a associação entre diferentes genótipos desses marcadores e níveis sorológicos de citocinas/quimiocinas. A citocina IL-17 aparece como um marcador imunológico regulado pelo polimorfismo dos três genes TLR avaliados. Já o TLR1 foi associado com produção diferencial de IL-12p40 e MCP-1 (CCL2). Outros marcadores séricos relevantes, como CXCL-10 e IL-6, parecem ser regulados por variantes de TLR2, enquanto que a IL-1 β está relacionada aos genótipos de TLR4.

As ferramentas descritas acima baseadas em métodos moleculares e sorológicos, possibilitam um direcionamento futuro para melhores estratégias para o diagnóstico precoce, tratamento e interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase.

2 JUSTIFICATIVA

A vigilância epidemiológica dos contatos é considerada uma das alternativas mais eficientes no controle da hanseníase. A busca ativa por novos casos entre os contatos é fundamental para a detecção precoce da doença, interrupção da cadeia de transmissão e prevenção de incapacidades, consequências do diagnóstico tardio (HACHER et al., 2012; BRASIL, 2016).

Os contatos de pacientes MB apresentam um risco de 5 a 10 vezes maior de desenvolver a doença do que a população em geral. E, contatos mais expostos que não desenvolvem a doença, podem ser portadores assintomáticos e disseminar o ML a indivíduos susceptíveis (GOULART; GOULART, 2008; ARAÚJO et al., 2016).

Gama et al. (2018), avaliando 43 casos e 113 contatos domiciliares, verificaram que 23,89% dos contatos assintomáticos apresentaram DNA bacilar em amostras de raspado dérmico e sangue, utilizando a qPCR. Os autores concluem que a qPCR pode estimar o risco de progressão da hanseníase entre contatos domiciliares e, portanto, ser considerada uma medida de triagem importante para protocolo quimioprolático.

O acompanhamento de contatos domiciliares tem sido o enfoque do nosso grupo de pesquisa NuPqHans/GV, nos últimos anos. Temos demonstrado a importância do uso de técnicas moleculares e sorológicas no monitoramento dos contatos domiciliares para o diagnóstico precoce da infecção subclínica (GAMA et al. 2018; 2019; 2020; MARÇAL et al.; 2018; 2020; DENNISON et al., 2021).

É importante ressaltar um dado recente do grupo que mostrou uma maior probabilidade de infecção por *S. mansoni* em casos de hanseníase do que em indivíduos controles, com um *Odds Ratio* Ajustado (aOR = 3,37- razão de chance). A associação foi ainda mais forte (aOR = 8,33) quando os contatos domiciliares foram comparados (DENNISON et al., 2021).

Esses dados reforçam a importância de introduzir abordagens inovadoras para identificação de biomarcadores especialmente no grupo de contatos de modo a definir um perfil indicador de infecção subclínica com maior acurácia.

Considerando que a proposta desse projeto é o acompanhamento de contatos domiciliares de paciente paucibacilar (CPB) e multibacilar (CMB), pressupõe-se que alterações qualitativas e/ou quantitativas de biomarcadores tais como, citocinas, quimiocinas e polimorfismo genético estejam associadas às manifestações da infecção hanseníase ao longo do tempo.

Portanto, nossa abordagem tem potencial de identificar precocemente, infecção subclínica, e promover medidas de imuniquimioprofilaxia mais direcionadas e eficazes para reduzir a incidência de novos casos de hanseníase e interromper a cadeia de transmissão, especialmente em áreas de alta endemicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil imunológico e parasitológico dos contatos de pacientes com hanseníase em um estudo de acompanhamento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas em sobrenadante de cultura de PBMC dos contatos domiciliares em diferentes tempos, durante o acompanhamento;
2. Verificar associação entre o polimorfismo genético no TLR4 e variáveis imunológicas no grupo de contatos estudados;
3. Avaliar os níveis de anticorpos anti-LID-1 (ML) e anticorpos anti-antígenos de *S. mansoni* no soro dos contatos monitorados;
4. Analisar a presença de DNA de ML por meio de qPCR no raspado dérmico auricular dos contatos monitorados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 GRUPO DE ESTUDO

A população-alvo deste estudo é composta de indivíduos residentes no município de Governador Valadares e no distrito de Limeira de Mantena, Minas Gerais. Estas regiões são descritas como endêmicas para hanseníase (GOVERNADOR VALADARES, 2017; MINAS GERAIS, 2019).

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram recrutados contatos com idade superior a 5 anos, de ambos os sexos, que apresentavam uma convivência estreita com os casos, como os membros da família que moram com o caso índice ou que moravam nas proximidades e mantinham contato semanal regular com o caso.

Os indivíduos foram convidados a participar do estudo, através do Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Controle Especial (CREDEN-PES) ou por meio do rastreamento de contatos de casos de hanseníase previamente conhecidos pela Estratégia de Saúde da Família (ESF) da comunidade rural de Limeira de Mantena, distrito do município de Mantena.

Todos os contatos foram avaliados clinicamente para garantir que não apresentassem sinais ou sintomas de infecção por hanseníase.

Como critérios de exclusão não foram incluídos pacientes com idade inferior a 5 anos, mulheres grávidas, história de diagnóstico de hanseníase, pacientes portadores de doença mental ou deficiência física e etnia indígena. Após a coleta em todos os três momentos, indivíduos que não tinham os dados completos foram também excluídos das análises.

Após considerados os critérios de inclusão e exclusão, os participantes foram apresentados à proposta da pesquisa e somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram incluídos no estudo.

A partir da inclusão no estudo, todos os participantes da pesquisa foram entrevistados para registro das informações socioeconômicas e condições de saúde (Anexo A).

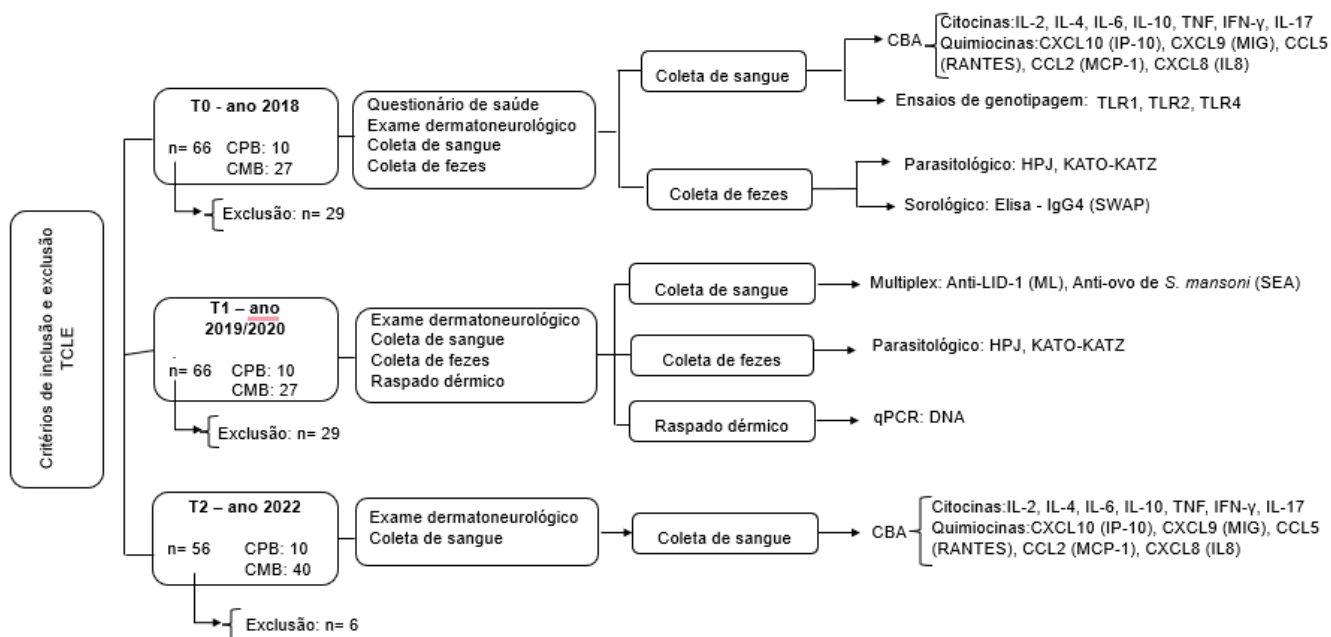
As informações contidas nos prontuários também foram coletadas. Os contatos foram examinados pela equipe do estudo para avaliação de possíveis condições clínicas que pudessem ser consideradas relevantes e/ou passíveis de influenciar as análises laboratoriais propostas.

4.3 DESENHO DO ESTUDO

O desenho proposto foi do tipo longitudinal/prospectivo, com coleta de dados de todos os contatos domiciliares em 2018 (tempo 0; T0), 2019/2020 (tempo 1; T1), 2022 (tempo 2; T2).

O exame dermatoneurológico foi realizado nos três momentos em todos os participantes do estudo por médico dermatologista, juntamente com os estudantes de Medicina do nosso grupo de pesquisa NuPqHans, devidamente treinados. Foram realizados nos T0, T1 e T2, exame de sangue e os exames de fezes foram realizados nos T0 e T1. A coleta de raspado dérmico ocorreu no T1. A representação das atividades está esquematizada na Figura 3.

Figura 4 – Representação esquemática do desenho experimental do estudo



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Todos os contatos domiciliares de casos de hanseníase que participaram do estudo anterior do nosso grupo de pesquisa foram convidados para este acompanhamento. As amostras coletadas desses contatos no ano de 2018 foram utilizadas para caracterizar o tempo zero (T0), do presente estudo.

No T0 e T1, foram incluídos 66 participantes, tendo sido excluídos 29 indivíduos por falta de dados em algumas variáveis. No T2, foram incluídos 56 indivíduos, tendo sido excluídos 6 indivíduos por apresentarem alguns dados incompletos.

Para as avaliações laboratoriais, os contatos foram submetidos à coleta de amostra de sangue venoso, raspado dérmico auricular e fezes. A coleta de sangue foi realizada por técnico treinado contratado pela coordenação da pesquisa. Os materiais utilizados nas coletas, armazenamento e transporte das amostras foram de responsabilidade da equipe de pesquisa, não tendo nenhum custo associado ao SUS e /ou Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares e entorno.

Os resultados laboratoriais considerados relevantes dentro da perspectiva clínica foram discutidos com a equipe de saúde das unidades responsáveis pela região de residência dos sujeitos da pesquisa, bem como com o coordenador da atenção primária do município de Governador Valadares e entorno.

4.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O Protocolo de Pesquisa e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram submetidos à Plataforma Brasil e encaminhados ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEP/UFJF), credenciado pelo CONEP. Este estudo foi aprovado pelo CEP/UFJF e protocolado sob o CAAE 56863016.6.1001.5147 (Anexo B).

4.5 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Os participantes receberam uma explicação da natureza e dos objetivos do estudo. Foi enfatizado que o estudo teria a finalidade de pesquisa, e que o voluntário não poderia esperar que houvesse qualquer efeito terapêutico. O voluntário também entendeu que ele (a) estava livre para se retirar a qualquer momento do estudo sem ser obrigado a fornecer o motivo de fazê-lo e sem que isto causasse qualquer prejuízo

no seu atendimento. Foi de responsabilidade dos investigadores a obtenção da assinatura do TCLE.

4.6 CONFIDENCIALIDADE

Os dados coletados no questionário bem como os resultados dos testes laboratoriais foram registrados na ficha de cada voluntário. Toda a informação obtida durante o estudo referente ao estado de saúde do voluntário esteve disponível exclusivamente para os investigadores, cuja obrigatoriedade de manutenção do sigilo é inerente à sua função. Cópias dos resultados dos testes laboratoriais realizados foram fornecidas aos participantes da pesquisa, ao final do estudo, e também quando solicitado. Orientações sobre a relevância dos achados foram também fornecidas para os participantes da pesquisa.

4.7 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS

Dados do Tempo 0 (CBA e ensaios de genotipagem), utilizados neste estudo, caracterizam-se como dados secundários, anteriormente obtidos por membros da equipe de pesquisa a que estamos incluídos (DE OLIVEIRA, 2020).

Em regime de colaboração e coautoria, fomos autorizados a utilizar esses dados a fim de acompanhar os contatos e incluir novos dados referentes aos tempos T1 e T2. Para fins de esclarecimento das técnicas utilizadas para obtenção desses dados secundários, temos a seguir os procedimentos realizados.

4.7.1 Coleta e preparo de material biológico

A coleta de sangue venoso de todos os participantes do estudo foi realizada por profissionais qualificados da área de saúde, respeitando as técnicas de biossegurança, tais como uso de luvas, material estéril e descartável. Toda coleta foi realizada no CREDEN-PES e na Unidade Básica de Saúde de Limeira de Mantena (UBS-LM).

Para a quantificação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de cultura de PBMC *in vitro*, foram coletados cerca de 30 mL de sangue em tubos com heparina

(VACUTAINER, *Grand Island, NY, USA*), e utilizado o sistema BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) com os seguintes Kits: *Human Cytokine Th1/Th2/Th17* e *Human Chemokine*.

O sangue total heparinizado foi adicionado em um volume de 1:2 em salina tampão fosfato (PBS) para separação das células por gradiente de densidade em *Ficoll Hypaque* (*GE Healthcare, Suécia*). Após centrifugação a 1350 rotações por minuto (RPM), por 45 minutos, à temperatura de 25° C, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram coletadas, lavadas três vezes com PBS (500g, por 10 minutos, a 4°C) e ressuspensas em meio RPMI suplementado (*Gibco Invitrogen Corporation 1640, EUA*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, *Gibco Invitrogen Corporation, EUA*), L-glutamina (*Gibco Invitrogen Corporation, EUA*) a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina (*Gibco Invitrogen Corporation, EUA*) a 100µg/mL (meio completo). Uma pequena alíquota desta suspensão celular foi diluída em azul de *Trypan* 0,4% (1:2) (*Biowhittaker, EUA*) e contada na câmara de *Neubauer* para a estimativa da concentração de células viáveis.

Culturas de PBMC *in vitro* foram realizadas em triplicatas (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços (*Falcon, BD*) durante 05 dias. Culturas sem estímulo (cultura controle/CC) e estimuladas com a suspensão do bacilo de ML, em uma proporção de 10 bacilos para cada célula, foram incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ (*Thermo Fisher*), em atmosfera úmida. Os sobrenadantes de cultura foram recuperados e mantidos congelados a -80°C, até a utilização.

4.7.2 Antígeno

Mycobacterium leprae, mortos por irradiação ($3,48 \times 10^8$ bacilos/mL), foram gentilmente cedidos pelo laboratório de hanseníase do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru/SP e utilizados na proporção de 10 bacilos para cada célula (PBMC) em cultura.

4.7.3 Determinação do nível de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de culturas de PBMC *in vitro* por citometria de fluxo

A partir dos sobrenadantes coletados das culturas descritas acima, foram quantificados os níveis de citocinas e de quimiocinas utilizando-se o método CBA da *Becton Dickinson-BD*. Esse sistema emprega uma mistura de sete esferas de

poliestireno para citocinas e cinco esferas de poliestireno para quimiocinas de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas e quimiocinas humanas. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17) e quimiocinas (IL8/CXCL8, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL10) empregando-se pequenos volumes de amostra.

Inicialmente as amostras de sobrenadante de cultura mantidas a -80°C foram descongeladas em banho maria à 37°C durante 2 minutos e centrifugadas a 500g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo. Alíquotas de 26 μ L de diluente G apenas (Controle Negativo), de 26 μ L dos padrões de citocinas, submetidos a diluição seriada com diluente G (reagente presente no *kit* CBA) e 26 μ L do sobrenadante de cultura, foram transferidas para placa de 96 poços. Em seguida, a cada poço da placa foi adicionado 18 μ L da mistura de esferas de captura, adsorvidas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 para *Human Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit* e anticorpos monoclonais anti-CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 para *CBA Human Chemokine Kit*, com subsequente incubação por 3 horas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 160 μ L da solução F ("*Wash buffer*", reagente presente no kit CBA). Em seguida, as placas de 96 poços foram centrifugadas a 200g, por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente descartado. Por fim, as esferas foram ressuspensas em 200 μ L de reagente F e imediatamente analisadas no FACS VERSE (BD Biosciences).

4.8 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM AMOSTRAS DE RASPADO INTRADÉRMICO AURICULAR DE CONTATOS

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit DNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). As amostras de raspado intradérmico auricular, acondicionadas em álcool a 70% foram descongeladas em temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 2.000RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 20 μ L de solução de proteinase K (600mAU/mL), 200 μ L de tampão fosfato salino (PBS) 1X e 200 μ L de tampão de lise AL (Qiagen).

Em seguida, o material foi incubado a 56°C por uma hora. Após a incubação, foram adicionados 200 μ L de etanol 96°GL e a solução foi agitada em vórtex por 10

segundos. Todo o material foi transferido para uma coluna DNeasy acoplada a um tubo coletor de 2mL. Posteriormente, foram centrifugadas a 6.000g por 1 minuto para eliminação do líquido e retenção de moléculas de DNA e eventualmente proteínas na coluna. O tubo coletor com a solução eluída foi descartado.

Outro tubo coletor foi acoplado à coluna DNeasy e adicionou-se 500µL do tampão de lavagem AW1 – Qiagen. Novamente a coluna foi centrifugada a 6.000g por 1 minuto. O tubo coletor com o material eluído foi descartado. Logo em seguida, foi adicionado o tampão de lavagem AW2 – Qiagen e um novo tubo coletor adaptado à coluna DNeasy, sendo centrifugado a 2.000g por 3 minutos, e descartado o tubo coletor.

Ao final, a coluna foi acoplada em outro tubo coletor e 100µL do tampão de eluição AE – Qiagen foram adicionados sobre a mesma. O sistema foi incubado por 1 minuto à temperatura ambiente e em seguida foi realizada uma centrifugação a 6000g por 1 minuto. Para maior eficiência na obtenção do DNA esta etapa foi repetida. A coluna DNeasy foi descartada obtendo-se DNA no tubo coletor.

A determinação da concentração de DNA no material eluído foi obtida por meio do espectrofotômetro NanoDrop 1000 *spectrophotometer* – *Thermo Scientific*. Após a dosagem do DNA o tubo foi congelado a -20°C até o momento do ensaio de qPCR.

4.8.1 Ensaio de PCR quantitativo em Tempo Real – qPCR

O ensaio de qPCR foi realizado utilizando o sistema de amplificação TaqMan® qPCR. O alvo de amplificação foi a região gênica 16S rRNA específica do ML. A sequência dos iniciadores (*Primers*) e a sequência da sonda que foram utilizadas no ensaio foram descritas por Martinez e cols. (2009) e estão apresentadas na Tabela 1:

Tabela 1 - Sequência dos primers e sonda utilizados na q-PCR

Gene	Descrição	Primer / Sonda	Sequência
16S rRNA	16S rRNA	ML16S rRNATaq-F	5'-GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC-3'
		ML16S rRNATaq-F	5'-CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT-3'
		ML16SrRNATaq-Sonda	5'-CAT CCT GCA CCG CA-3'

Fonte: Adaptado de Martinez et al. (2009).

Para a realização da qPCR, o DNA obtido foi descongelado em temperatura ambiente em um volume final de 25µL, contendo TaqMan 2X Master Mix, 20ng de DNA purificado, 500nM de cada primer e 500nM da sonda.

A solução foi preparada em duplicata e submetida à temperatura de 50°C por 2 minutos. Em seguida, à temperatura de 95°C por 10 minutos, e posteriormente 40 ciclos compreendendo a temperatura de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foi utilizado o termociclador 7000 *real-time PCR system* (Applied BioSystems, Carlsbad, CA, USA). A fluorescência emitida pela sonda foi analisada pelo *software* ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

O resultado da qPCR foi dado pelo número de ciclos (Ct) em que a curva de fluorescência acumulada ultrapassa a linha de corte e foram considerados positivos os valores de Ct menores que 38,50, como definido pela curva ROC. O valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de DNA presente na amostra. Entretanto, neste trabalho, o valor de Ct foi convertido para 1/Ct, de modo a se obter uma proporção direta do nível de DNA amplificado na amostra. A linha de corte da fluorescência emitida pela quebra da sonda, foi determinada automaticamente pelo *software*.

4.9 ENSAIO MULTIPLEX PARA ANÁLISE DE ANTICORPOS

O ensaio Multiplex foi realizado com o objetivo de avaliar os níveis de anticorpos anti-LID-1 (ML) e anti-antígeno solúvel de ovos de *S. mansoni* (SEA) no soro dos contatos domiciliares, participantes deste estudo. Foi utilizado o equipamento

LUMINEX xMAP MAGPIX (*Millipore Corporation*, Billerica, MA, USA), com o emprego de *beads* (esferas de poliestireno) magnéticas. Este ensaio foi realizado no laboratório de Imunologia de parasitas coordenado pelo Dr. Evan Secor no CDC/Atlanta.

Este ensaio foi realizado conforme descrito em Luminex Corporation (2012) e adaptado de outros trabalhos descritos na literatura (VAN GAGELDONK et al., 2008; AMBROSINO et al., 2010; ONDIGO et al., 2012; KERKHOF et al., 2015).

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

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

Em seguida, foram diluídos os anticorpos secundários/anti-IgG e anti-IgM (biotinilados) na seguinte proporção: 50ng/poço de IgG; 40ng/poço de IgG4 em Tampão A (PBS contendo BSA a 0,5%; Tween-20 a 0,05% e NaN₃ a 0,02%). Após a diluição, foram adicionados em cada poço da placa, 50µL dos anticorpos anti-IgG e anti-IgM por 45 minutos, temperatura ambiente, no agitador com velocidade de 700 RPM. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente por 3 vezes com PBST. Para completar a reação, 50µL de estreptavidina conjugada à ficoeritrina (SA-PE) foram adicionados e a placa incubada por 30 minutos, protegida da luz à temperatura ambiente, sob agitação (700RPM). Em seguida, a placa foi lavada novamente, três vezes com PBST e adicionado 50µL de tampão A em cada poço, e incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente, no agitador com velocidade de 700RPM e posteriormente lavada mais uma vez com PBST. Foram adicionados 100µL de tampão PBS em cada poço, e a placa foi agitada por aproximadamente 10 segundos e depois analisada usando o software Bio-Plex, leitor MAGPIX-Luminex de acordo com o protocolo do fabricante. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente, com pouca luminosidade e todas as amostras foram testadas em triplicata. Os resultados foram expressos em Intensidade Média de Fluorescência (MFI). E os

valores de corte (*cut-off*), foram utilizados para determinação de amostras positivas e negativas.

4.10 COLETA DE FEZES E ENSAIO SOROLÓGICO PARA *SCHISTOSOMA MANSONI*

A infecção pelo *S. mansoni* e/ou outros geo-helminhos foi definida pela presença de ovos em qualquer uma das três amostras de fezes analisadas pelo método de Kato Katz (K-K) (KATZ et al., 1972).

As amostras de fezes foram coletadas durante a consulta regular, após a assinatura do TCLE e, transportadas em potes contendo 10% de vapor de formaldeído (Coprosec®), que preserva amostras de fezes por até 30 dias à temperatura ambiente. O método K-K é considerado padrão-ouro e envolve a análise de duas lâminas de uma amostra fecal. Embora Minas Gerais seja uma região endêmica para a esquistossomose, a prevalência está em declínio e as infecções podem apresentar baixa intensidade. Portanto, o método K-K padrão pode subestimar a prevalência. Dessa forma, utilizamos uma variante dessa técnica para aumentar a sensibilidade do teste. As amostras de fezes coletadas foram misturadas e homogeneizadas no laboratório. Seis lâminas dessa mistura foram preparadas usando a técnica K-K. O restante dessa amostra foi processado pelo método de Hoffman-Pons-Janer 46 (HPJ), baseado em sedimentação espontânea (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934). O número de lâminas aumenta muito a sensibilidade do método (OLIVEIRA et al., 2019).

O método HPJ é utilizado em numerosos laboratórios por ser de fácil execução, baixo custo e eficaz no diagnóstico de infecções por protozoários e helmintos, incluindo *S. mansoni*. O exame foi feito no laboratório multiusuário da UFJF/GV, sob orientação e treinamento da Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga.

Outras infecções parasitárias foram investigadas como a ancilostomíase, ascaridíase, tricuriase e outras infecções causadas por protozoários (amebíase, giardíase, etc.) (COUTO et al., 2014). Entretanto no presente trabalho apenas os dados do *S. mansoni* foram analisados por causa da imuno regulação. Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico de infecções por *S. mansoni*, testes sorológicos também foram executados.

O teste sorológico foi realizado utilizando a IgG4 específica para antígeno de verme adulto: *soluble antigen preparation of adult schistosomes* (SWAP), por meio do

ensaio ELISA. Resumidamente a técnica consistiu em sensibilizar placas de 96 poços (*Nunc-Maxisorb Nagle Nunc International, Rochester, Nova Iorque, EUA*) durante a noite com 10µg/mL de SWAP em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,5) e bloqueado com PBS contendo albumina de soro bovino a 1% (BSA, Sigma). As amostras de soro dos participantes foram diluídas 1:100 em PBS contendo 0,1% de BSA e testadas em duplicata. O anticorpo ligado foi detectado por IgG4 anti-humano obtido de camundongo conjugado com biotina (Sigma) seguido por estreptavidina-fosfatase alcalina. O limiar da reatividade foi determinado pela média de absorbância mais 4 desvios padrão obtidos de amostras de soro de 2 voluntários saudáveis que haviam sido testados para infecção helmíntica por testes parasitológicos e moleculares. Esse ensaio foi realizado em colaboração com a professora Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa do laboratório de Imunohelmintologia, do Departamento de Parasitologia da UFMG.

Em nosso estudo, além dos métodos KK, HPJ e reatividade de IgG4 anti-SWAP, utilizamos o histórico de esquistossomose obtido de prontuários para caracterizar o perfil de infecção por *S. mansoni*. Essa caracterização foi necessária, uma vez que, os participantes do estudo apresentaram uma baixa carga parasitária. Corroborando com os nossos achados, Resende et al. (2019) utilizaram métodos parasitológicos tradicionais, sorológicos e moleculares para identificar indivíduos infectados com carga parasitária muito baixa e que não seriam diagnosticados apenas pelo método Kato-Katz.

4.11 ENSAIOS DE GENOTIPAGEM

Os dados relativos aos parâmetros genéticos fazem parte dos estudos do nosso grupo de pesquisa, cujos procedimentos estão descritos a seguir (DE SOUZA, 2021).

4.11.1 Coleta e preparo de material biológico para extração de DNA

Cerca de 3mL de sangue foram coletados dos participantes em tubos com Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) para extração de DNA genômico (gDNA) e posterior genotipagem dos polimorfismos de base única (*single nucleotide*

polymorphism ou SNPs). As amostras foram centrifugadas a 3000RPM por cinco minutos para separação da camada de leucócitos que foi retirada com o auxílio de micropipeta e microponteira com filtro, livres de DNase e RNase. Os leucócitos foram armazenados em microtubos de 1,5mL, livres de DNase e RNase, identificados e armazenados a -20°C. A extração do gDNA foi realizada com alíquota de 250µL da camada de leucócitos utilizando o *Illustra® blood genomicPrep Mini Spin Kit*, GE Healthcare, de acordo com instruções do fabricante. A quantificação e a determinação do grau de pureza do gDNA extraído foram realizados no espectrofotômetro *Nano Vue plus* (GE®). A amostra foi previamente incubada a 56°C durante cinco minutos em banho seco e homogeneizada posteriormente para garantir a solubilidade do gDNA. Dois microlitros da amostra de DNA foram depositados no espectrofotômetro previamente calibrado com tampão Tris-EDTA.

O grau de pureza foi determinado a partir das razões dos valores de absorbância nos comprimentos de onda A260/A280 e A260/A230. A razão A260/A280 representa a contaminação por proteínas, e o valor desta razão deveria estar entre 1,7 e 1,9. A razão de A260/A230 deveria estar no intervalo entre 1,5 e 2,5. Valores fora desses intervalos indicavam contaminação por compostos orgânicos e o gDNA era descartado. O gDNA foi armazenado a -20°C devidamente identificado. No momento de uso, o gDNA foi diluído para a concentração requerida nas reações.

4.11.2 Genotipagem dos SNPs selecionados

As amostras de gDNA extraídas foram diluídas para a concentração de 5,0ng/µL em água ultra-pura, livre de DNase e RNase. As variantes de baixa frequência (entre 0,01 e 0,05) e as variantes comuns (frequência > 0,05) de SNPs em genes selecionados por sua associação com o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (receptores do tipo *Toll*) e com o transporte do íon Ferro através da membrana citoplasmática (SLC11A1), foram genotipadas no grupo de estudo. Para os ensaios de genotipagens de SNPs foi utilizada a metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), baseada em fluorescência usando sondas TaqMan MGB e um par de iniciadores de PCR para detectar alvos SNPs específicos (*ThermoFisher®*) validados. Estes ensaios foram desenvolvidos na plataforma do sistema da *7500 Fast Real-Time PCR* (*Applied Biosystems®*).

As sondas que distinguiam os dois alelos do SNP, marcadas com fluoróforos VIC/MGB-NFQ (alelo um) ou FAM/MGB-NFQ (alelo dois), na concentração de 40x foram diluídas duas vezes em tampão TE (20,0µL de Tris 100mM e 2µL de EDTA 100mM). Em um microtubo, foram adicionados solução *Master Mix TaqMan® GTXpress™ Master Mix (2x)*, sonda (20x), água ultrapura, livre de DNase e RNase com volumes calculados para o volume total de ensaios e de acordo com as especificações do fabricante.

Seis microlitros desta mistura foram aliquotados em microplaca e adicionados, em cada poço correspondente a um teste individual, 20ng de DNA (4µL de gDNA a 5ng/µL). No equipamento *Termociclador 7500 Fast, (Applied Biosystems®)* foi definido o programa de amplificação nos seguintes ciclos de temperatura: Pré qPCR: 60°C por 1 minuto e 95°C por 20 segundos, seguindo-se de 40 ciclos a 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos e uma etapa final de 60°C por 1 minuto. Os resultados da amplificação e a determinação dos genótipos foram obtidos com auxílio da plataforma *Thermo Fisher Cloud*.

Vários SNPs foram analisados (rs4833095, rs3804099, rs1927914 e rs17235416 dos respectivos genes TLR1, TLR2, TLR4, mas apenas o SNP rs1927914 do gene TLR4 apresentou significância estatística (Anexo C) (DE SOUZA, 2021).

Dessa forma, para este estudo específico de acompanhamento de contatos, consideramos o modelo genético de dominância que pressupõe que a presença de apenas um alelo “A” seja suficiente para manifestar um determinado fenótipo, no caso a suscetibilidade à hanseníase. Baseado nessa informação, nossos dados preliminares mostraram que indivíduos homocigotos portadores do genótipo G/G adquirem fenótipo protetivo contra a hanseníase com cerca de três vezes menos chance (RC = 0,34) de manifestarem a doença do que os demais (genótipos A/G ou A/A) (Anexo C).

Verificou-se que de uma amostra de 93 contatos do estudo de suscetibilidade genética, o genótipo A/A foi encontrado em 27 indivíduos (29%), A/G, 56 indivíduos (60,2%) e G/G, 10 indivíduos (10,8%) (Anexo D).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

O banco de dados foi organizado usando o *software* Epi Data 2.1a. Ao final da etapa de coleta, os dados foram exportados e analisados com auxílio do *software*

GraphPad Prism 8.0[®] (San Diego, CA, EUA), em que também foram elaborados os gráficos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

No presente estudo foram utilizadas as seguintes estratégias de análise dos dados: análise convencional, análise de assinaturas de citocinas e quimiocinas, sobreposição de curvas de assinaturas, confecção dos diagramas de Venn e gráficos de radar.

4.12.1 Análise convencional

A análise estatística convencional foi utilizada para caracterizar os subgrupos de contatos considerando a produção de quimiocinas e citocinas em sobrenadantes de culturas de PBMC *in vitro*. Os dados foram verificados se havia ou não distribuição normal (Gaussiana), e foi aplicado o teste Shapiro-Wilk para verificação do padrão de distribuição das variáveis, utilizando-se para dados paramétricos, o teste t de Student e o teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos (Figuras 5, 7, 10 e 11).

4.12.2 Análise de assinatura de citocinas e quimiocinas

A análise de assinatura de quimiocinas e citocinas foi realizada conforme descrito em estudos anteriores (LUIZA-SILVA et al., 2011; COSTA-SILVA et al., 2014; QUEIROZ, et al., 2019; SILVEIRA-NUNES et al., 2020). Esta análise tem sido utilizada para detectar pequenas alterações dos níveis de quimiocinas e citocinas não evidenciadas por abordagens estatísticas convencionais.

A metodologia consiste em converter valores quantitativos de produção de quimiocina/citocina em dados categóricos. Os participantes do estudo foram “categorizados” como ALTOS e BAIXOS produtores de quimiocina/citocina, utilizando o valor da média ou mediana intrínseca (conforme os dados sejam paramétricos ou não paramétricos) como ponto de corte (*cut-off*) específico para cada quimiocina/citocina. A média ou mediana foi denominada intrínseca, pois os valores foram obtidos de cultura de PBMC *in vitro* não estimulada ou estimulada com ML.

Para o cálculo da média/mediana intrínseca, inicialmente fez-se o somatório de valores do conjunto total de dados, ou seja, soma de valores de cada quimiocina/citocina para todos os contatos (CPB e CMB). Com base nesses valores,

foi estabelecido o ponto de corte. Os indivíduos que possuíam níveis de quimiocina/citocina maiores ou iguais à média/mediana intrínseca foram categorizados como altos produtores (*HIGH*) para aquele marcador específico. Os indivíduos que possuíam níveis de quimiocina/citocina menores do que a média/mediana intrínseca foram considerados baixos produtores (*LOW*) (Figuras 6A e 12A).

Além disso, realizou-se a montagem e sobreposição de curvas ascendentes da assinatura das quimiocinas/citocinas para identificar mudanças no perfil global das mesmas. Essa análise permitiu observar o comportamento e a hierarquia da produção de quimiocinas/citocinas, e dessa forma, contribuiu para o estabelecimento do perfil imunológico dos participantes do estudo. Utilizou-se a categorização funcional das citocinas consideradas pró-inflamatórias (IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2) e citocinas regulatórias (IL-4 e IL-10). Produções relevantes foram consideradas quando a porcentagem de indivíduos altos produtores de quimiocina/citocina foi maior a 50% (Figuras 6B, 12B, 13, 14A, 15A e 16A).

4.12.3 Diagrama de Venn

Os Diagramas de Venn são ferramentas muito utilizadas na bioinformática e tem como objetivo ilustrar as interações entre conjuntos de dados compartilhados. São comumente representados como círculos que se cruzam parcialmente para descrever conjunto de interseções (\cap) (LAM et al., 2016). Para a confecção dos diagramas de Venn para análise da coinfeção neste estudo (Figura 14B, Figura 15B e Figura 16B) utilizou-se o *software Bioinformatics & Evolutionary Genomics*, disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

4.12.4 Gráficos de radar

Os gráficos de radar foram utilizados para demonstrar a assinatura de quimiocinas/ citocinas de contatos de pacientes com hanseníase após cultura não estimulada e estimulada com *M. leprae* de acordo com os genótipos do TLR4 rs1927914 (Figura 8).

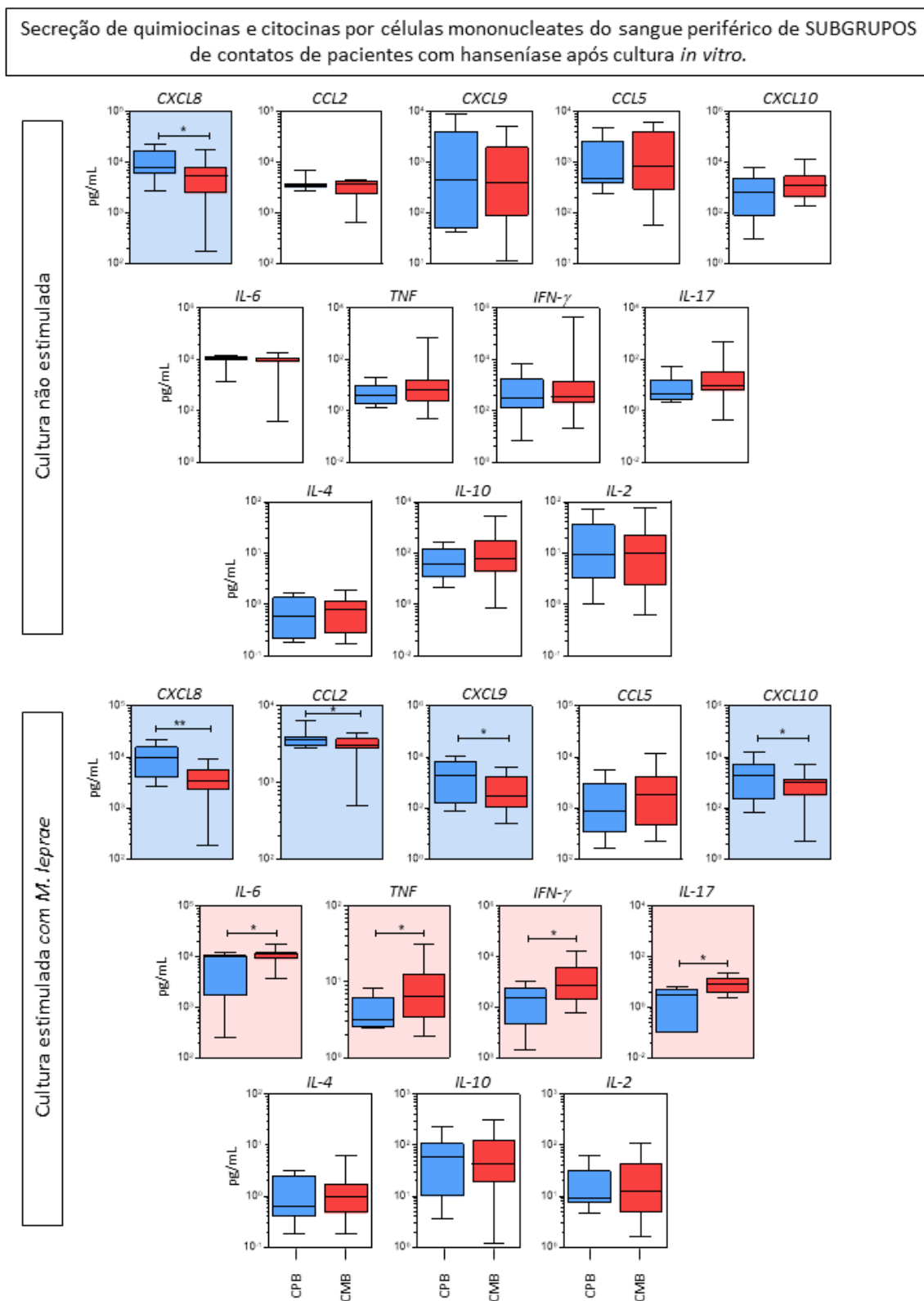
No gráfico de radar, cada eixo representa a frequência (%) de indivíduos considerados altos produtores de quimiocinas/citocinas. Os valores de cada eixo podem ser unidos para formar uma área poligonal central que representa o balanço geral dos resultados. O aumento ou diminuição da área poligonal central reflete uma maior ou menor contribuição no perfil imunológico em cada grupo, bem como o caráter de susceptibilidade genética dada pelo polimorfismo do gene do TLR4.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO*.

Os resultados demonstraram que na cultura não estimulada, os CPB apresentaram secreção significativamente maior da quimiocina CXCL8 em relação aos CMB. Por outro lado, na cultura estimulada observou-se uma maior produção das quimiocinas CXCL8, CCL2, CXCL9 e CXCL10, pelo grupo CPB. Diferentemente com relação à produção de citocinas, ocorreu um aumento significativo de IL-6, TNF, IFN- γ e IL -17 no grupo de contatos de MB (Figura 5).

Figura 5 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

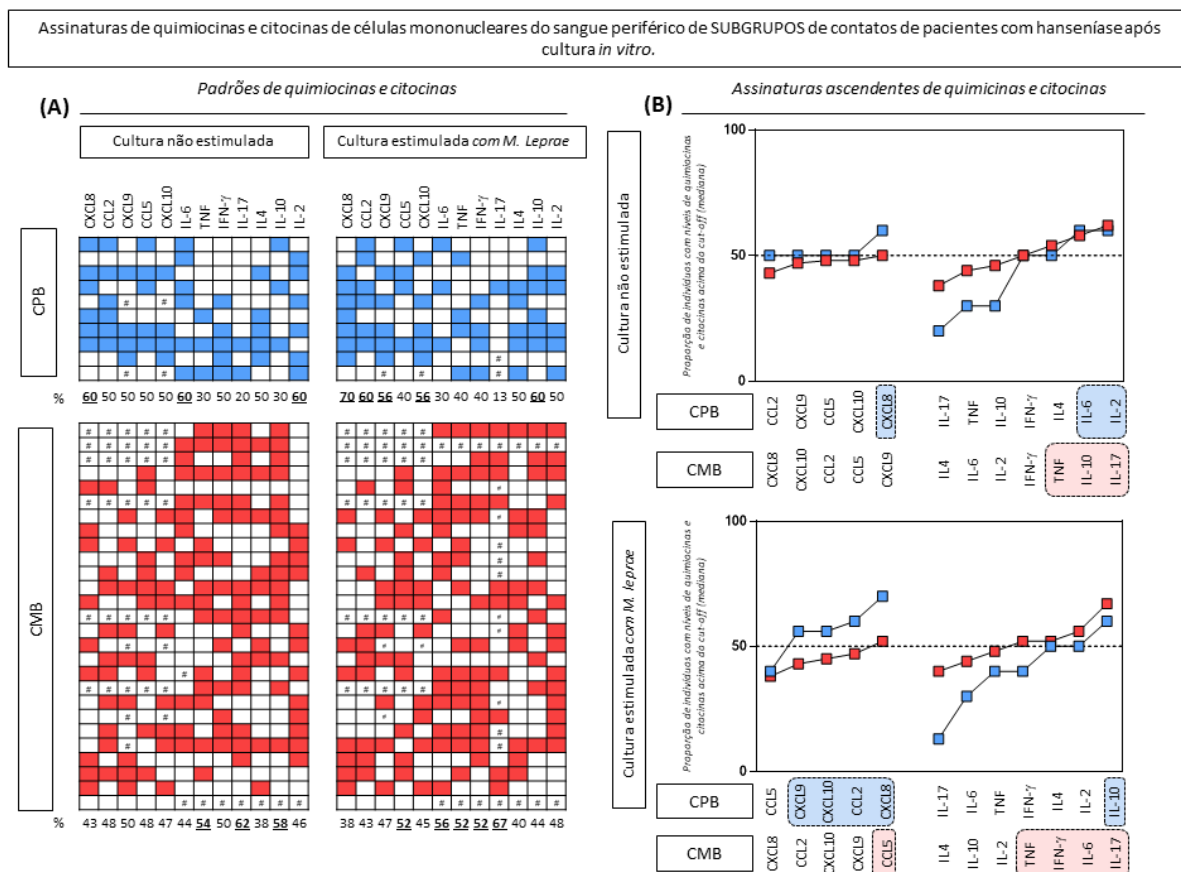
Figura 5. Visão panorâmica de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura *in vitro*. Análise de CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-2, IL-10 foi realizada após cultura *in vitro* de PBMC de CPB (■, n=10) e CMB (■, n=27), na ausência de estímulo endógeno (cultura não estimulada) e na presença do antígeno do *M. leprae* (cultura estimulada). Os resultados são apresentados no format boxplot, indicando os valores medianos (min-max) das concentrações de quimiocinas e citocinas (pg/mL). A análise comparativa entre os subgrupos foi realizada pelo Teste de *Mann-Whitney*. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas por linhas de conexão com (*) e cores (■, ■).

5.2 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO*.

A análise complementar desses resultados, mediante conversão em dados categóricos de assinaturas de quimiocinas e citocinas, apontou diferenças adicionais entre CMB e CPB não detectadas na análise das variáveis contínuas (Figura 6).

Na cultura não estimulada, observou-se maior proporção de indivíduos CPB considerados altos respondedores, ou seja, valores acima de 50% para CXCL8, IL-6 e IL-2. Por outro lado, a maior proporção de CMB ocorreu em relação às citocinas TNF- α , IL-10 e IL-17. Na cultura estimulada pelo *M. leprae*, ocorreu um aumento da proporção de CPB em relação às quimiocinas CXCL9, CXCL10, CCL2, CXCL8 e citocina IL-10. Ao contrário, a proporção de CMB com alta secreção de quimiocinas foi representada apenas pela CCL5. Entretanto, observou-se maior proporção com relação à produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL -17 nesse grupo (Figura 6).

Figura 6 – Assinaturas de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 6. Assinatura de quimiocinas e citocinas em contatos após cultura de PBMC *in vitro* e CPB (■) e CMB (■). A análise da assinatura de quimiocinas e citocinas foi realizada conforme descrito em materiais e métodos. Variáveis contínuas expressas em pg/mL foram convertidas em dados categóricos utilizando os valores da mediana intrínseca para a cultura não estimulada (CXCL8 = 6.014 pg/ mL; CCL2 = 3.481 pg/ mL; CXCL9 = 400 pg/ mL; CCL5 = 822 pg/ mL; CXCL10 = 1.214 pg/mL; IL-6 = 10.938 pg/mL; TNF = 5 pg/mL; IFN- γ = 297 pg/mL; IL-17 = 6 pg/mL; IL-4 = 1 pg/mL; IL-10 = 54 pg/mL; IL-2 = 9 pg/ mL) ou cultura estimulada com *M. leprae* (CXCL8 = 4.319 pg/ mL; CCL2 = 3.114 pg/ mL; CXCL9 = 324 pg/ mL; CCL5 = 1.005 pg/mL; CXCL10 = 1.224 pg/mL; IL-6 = 10.847 pg/mL; TNF = 4 pg/mL; IFN- γ = 363 pg/mL; IL-17 = 6 pg/mL; IL-4 = 1 pg/mL; IL-10 = 55 pg/mL; IL-2 = 13 pg/mL) como *cut-off*. A proporção de participantes com níveis elevados de quimiocinas e citocinas foi calculada para cada grupo de estudo e os dados apresentados através do diagrama de cores, sendo os quadrados coloridos os altos produtores, sem cor baixos produtores e com o símbolo (#) dados faltosos (A) e curvas ascendentes sobrepostas (B). A estatística foi realizada para calcular a frequência de “altos produtores de quimiocinas e citocinas”. Proporção de participantes com valores de quimiocinas e citocinas acima do *cut-off* e superior a 50% foi destacada com negrito e sublinhado no diagrama de cores (A), bem como através da linha tracejada e plano de fundo colorido nas curvas ascendentes (B).

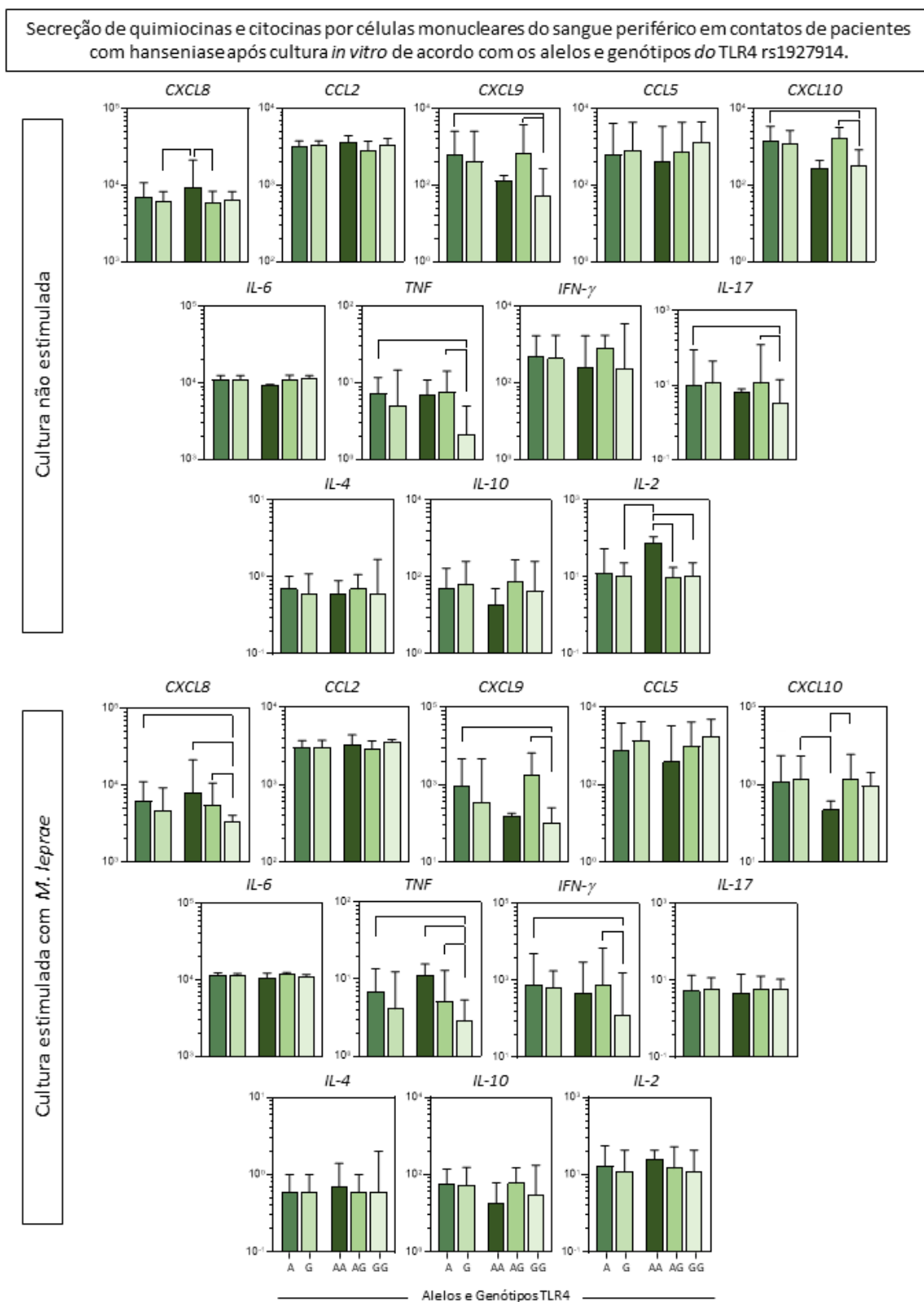
5.3 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO* DE ACORDO COM OS ALELOS E GENÓTIPOS DO TLR4 RS1927914.

Com o intuito de verificar uma associação entre o polimorfismo TLR4 rs1927914 e o perfil de resposta imune de contatos, o padrão de síntese de quimiocinas e citocinas por PBMC após estímulo antigênico *in vitro* foi avaliado em contatos apresentando diferentes perfis (A vs G e AA vs AG vs GG).

Como apresentado na Figura 6, os resultados demonstraram uma associação entre o polimorfismo TLR4 rs1927914 e o perfil de resposta imune dos contatos

Por outro lado, o alelo A e o genótipo AA foram associados à maior secreção de quimiocinas e citocinas por PBMC, independentemente da condição de cultura, conforme mostrado na Figura 6.

Figura 7 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de contatos de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro* de acordo com alelos e genótipos do TLR4 rs1927914.



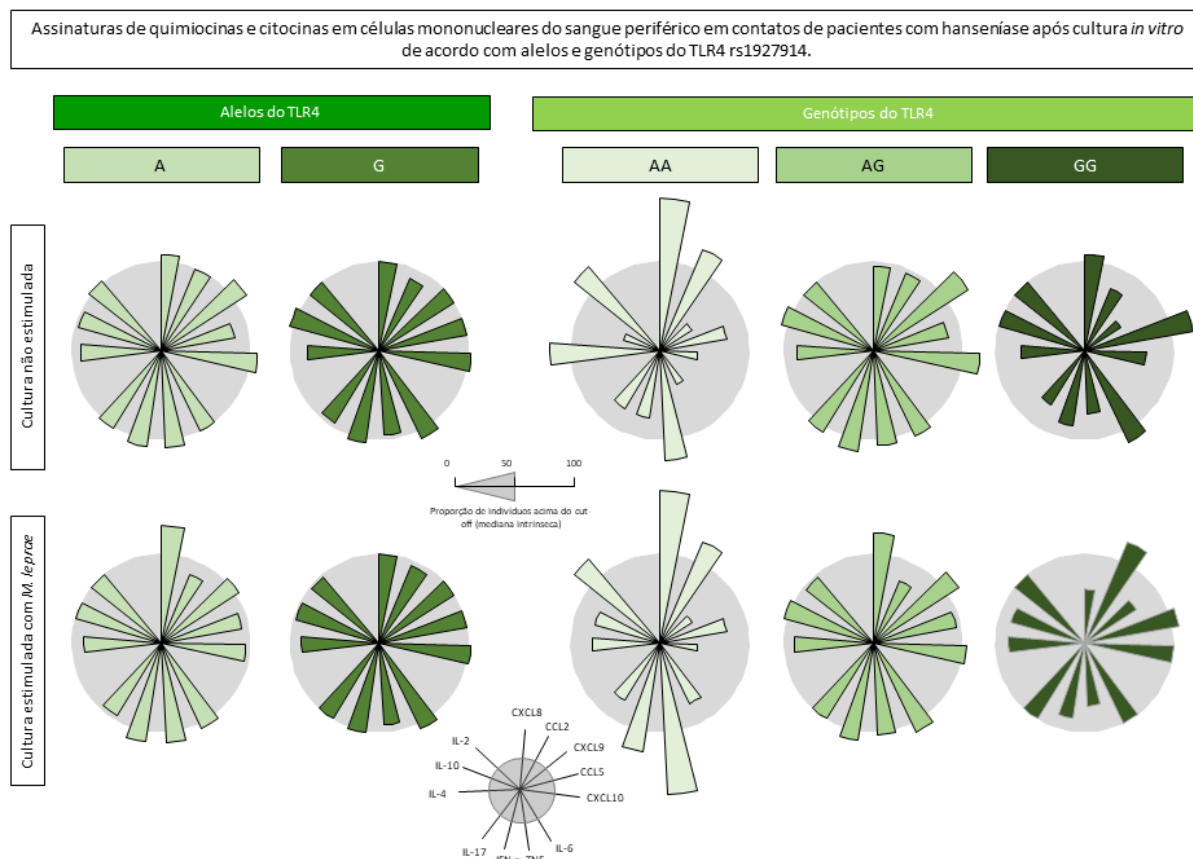
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 7. Visão panorâmica de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura *in vitro*. Análise de CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-2, IL-10 foi realizada após cultura *in vitro* de PBMC de indivíduos com alelos A (■) e G (□) e Genótipos AA (■) AG (■) e GG (□), na ausência de estímulo endógeno (cultura não estimulada) e na presença do antígeno do *M.leprae* (cultura estimulada). Os resultados são apresentados no format boxplot, indicando os valores medianos (min-max) das concentrações de quimiocinas e citocinas (pg/mL). A análise comparativa entre os subgrupos foi realizada pelo Teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas por linhas de conexão.

5.4 ANÁLISE DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO* DE ACORDO COM OS ALELOS E GENÓTIPOS DO TLR4 RS1927914

A análise complementar, mediante conversão de dados contínuos em parâmetros categóricos, confirmou ainda mais esses achados. Verificou-se uma maior produção de quimiocinas, especialmente a CXCL8 e da citocina TNF nos indivíduos que apresentam o genótipo AA, independente da condição da cultura, seja estimulada ou não estimulada (Figura 8).

Figura 8 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de contatos de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro* de acordo com os alelos e genótipos do TLR4 rs1927914 – Gráfico de Radar.



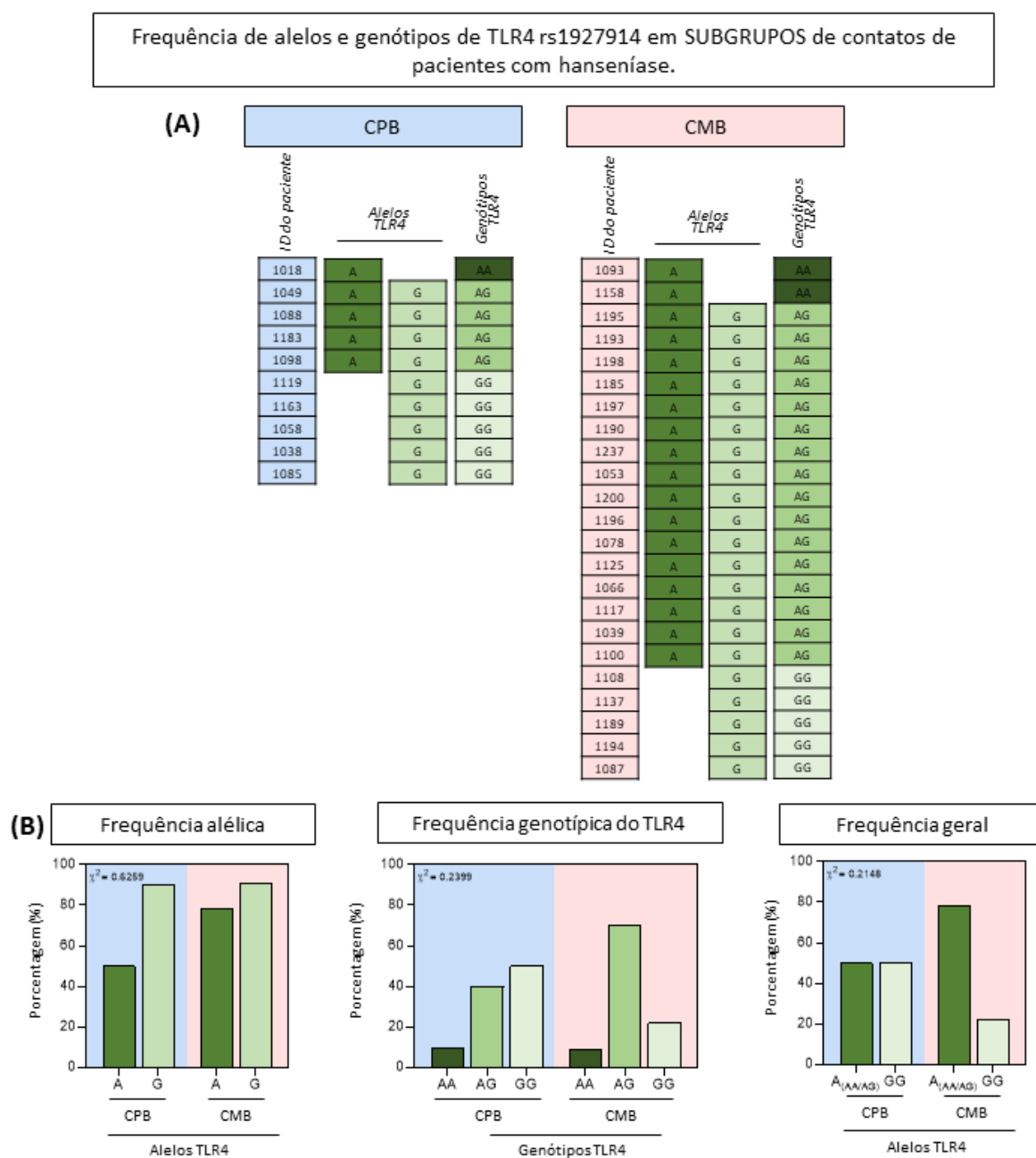
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 8. O Gráfico de radar representa a frequência da assinatura de quimiocinas e citocinas em contatos de pacientes com hanseníase com alelos A (■) e G (□) e Genótipos AA (■) AG (□) e GG (□), após cultura não estimulada e estimulada com *M. leprae*. Cada eixo exibe a proporção desses marcadores em relação aos genótipos do TLR4 rs1927914. Os valores de cada eixo são unidos para formar a área poligonal central que representa o balanço geral de quimiocinas e citocinas. O aumento ou a diminuição das áreas do polígono central refletem a contribuição maior ou menor do equilíbrio de quimiocinas e citocinas. As frequências iguais a 50% foram consideradas relevantes.

5.5 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DOS GENÓTIPOS TLR4 RS1927914 EM SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE

A análise do polimorfismo TLR4 rs1927914 não mostrou diferenças significativas nas frequências alélicas e genóticas entre CPB e CMB (Figura 9).

Figura 9 – Frequência de alelos e genótipos de TLR4 rs1927914 em subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 9. (A) Representação dos participantes do estudo em relação ao TLR4. (A) A Figura apresenta a identificação dos contatos (ID) dos subgrupos de CPB (□) e CMB (□) em relação aos alelos do TLR4 A (■) e G (□) e dos genótipos AA (■) AG (■) e GG (□). (B) A Figura mostra a frequência dos alelos do TLR4 (A e G), genótipos (AA, AG, GG) e frequência geral do alelo A (AA e AG) e alelo GG, no subgrupo de CPB e CMB, respectivamente. A análise estatística utilizando o teste qui-quadrado (χ^2) não mostrou diferença significativa entre os alelos e genótipos dos respectivos subgrupos CPB e CMB.

5.6 ANÁLISE DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO* DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS DO TLR4 RS1927914.

Em uma abordagem final do primeiro momento do estudo, foram obtidas diferenças significativas na produção de algumas quimiocinas e citocinas de contatos dos grupos CPB e CMB, como descrito a seguir.

Os resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos CPB AA/AG vs CPB GG e CMB AA/AG vs CMB GG, especialmente para os marcadores CXCL8, IL-6, TNF e IL-17 na cultura estimulada (Figura 10).

É importante ressaltar a maior produção de IL-17 do grupo CMB AA/AG em relação ao grupo CPB AA/AG.

Figura 10 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro* de acordo com os genótipos do TLR4 rs1927914.

Secreção de quimiocinas e citocinas em células mononucleares do sangue periférico em SUBGRUPOS de contatos de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro* de acordo com os genótipos do TLR4 rs1927914.

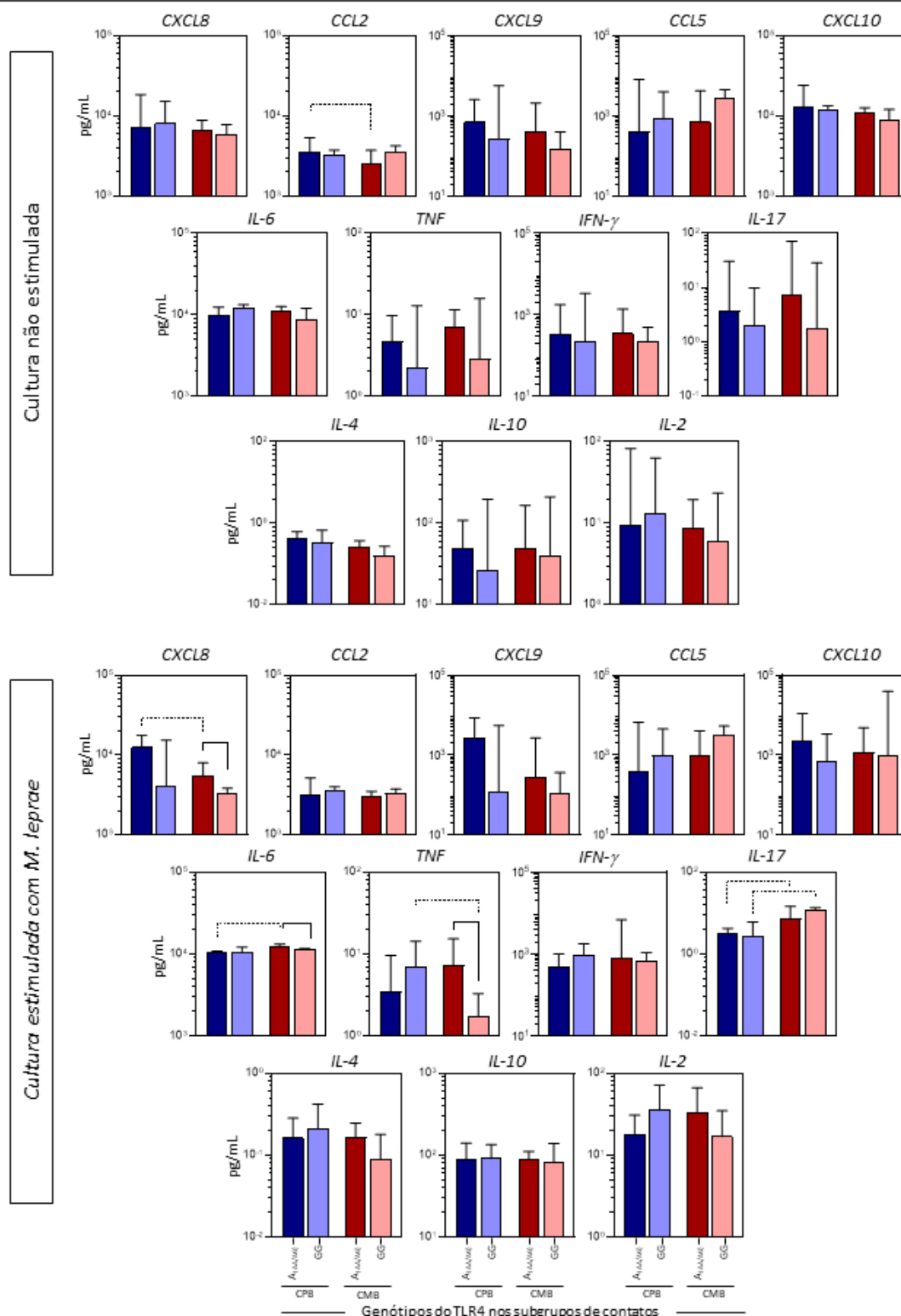


Figura 10. *Visão panorâmica de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura in vitro.* Análise de CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-2, IL-10 foi realizada após cultura *in vitro* de PBMC de indivíduos do grupo CPB com alelos A_(AA/AG) (■) e GG (□) e indivíduos do grupo CMB com alelos A_(AA/AG) (■) e GG (□), na ausência de estímulo endógeno (cultura não estimulada) e na presença do antígeno do *M.leprae* (cultura estimulada). Os resultados são apresentados no *formato boxplot*, indicando os valores medianos (min-máx) das concentrações de quimiocinas e citocinas (pg/mL). A análise comparativa entre os subgrupos foi realizada pelo Teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas por linhas de conexão.

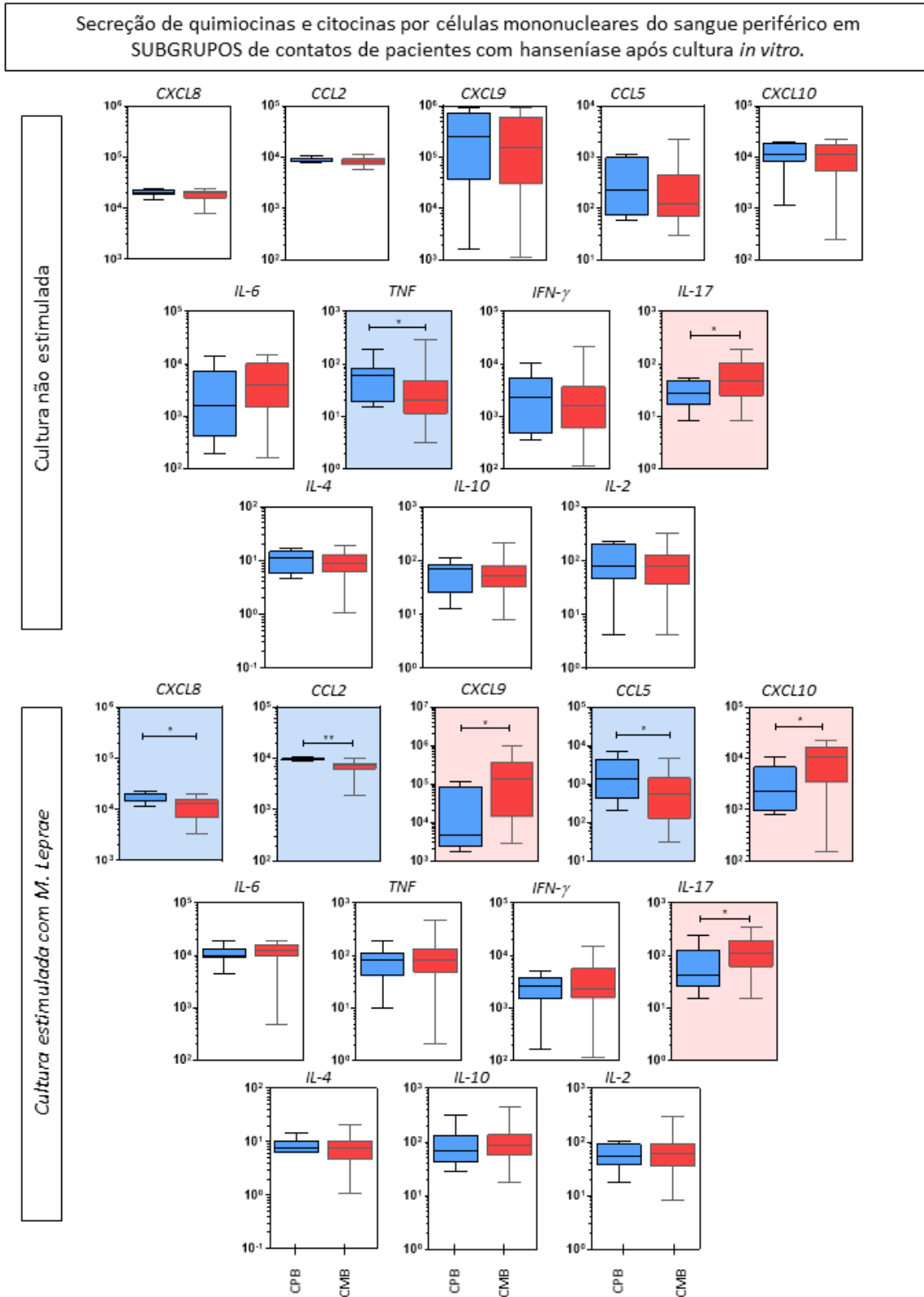
5.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO* – FOLLOW-UP.

Com o objetivo de fazer o acompanhamento dos contatos ao longo do tempo (*follow-up*), foi realizada análise da produção de quimiocinas e citocinas por PBMC.

Os resultados demonstraram que na cultura estimulada, o grupo CMB apresentou níveis significativamente mais elevados das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e, interessante, níveis mais elevados da citocina pró-inflamatória IL-17 comparando com o grupo CPB.

Na cultura não estimulada, é relevante apontar para a maior produção da IL-17 pelo grupo CMB (Figura 11).

Figura 11 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro* - *follow-up*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 11. *Visão panorâmica de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura in vitro.* Análise de CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10, IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-2, IL-10 foi realizada após cultura *in vitro* de PBMC de CPB (■, n=10) e CMB (■, n=40), na ausência de estímulo endógeno (cultura não estimulada) e na presença do antígeno do *M.leprae* (cultura estimulada). Os resultados são apresentados no format boxplot, indicando os valores medianos (min-max) das concentrações de quimiocinas e citocinas (pg/mL). A análise comparativa entre os subgrupos foi realizada pelo Teste de *Mann-Whitney*. Diferenças significativas ($p < 0,05$) estão indicadas por linhas de conexão com (*) e cores (■, ■).

5.8 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCIAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO* – *FOLLOW-UP*.

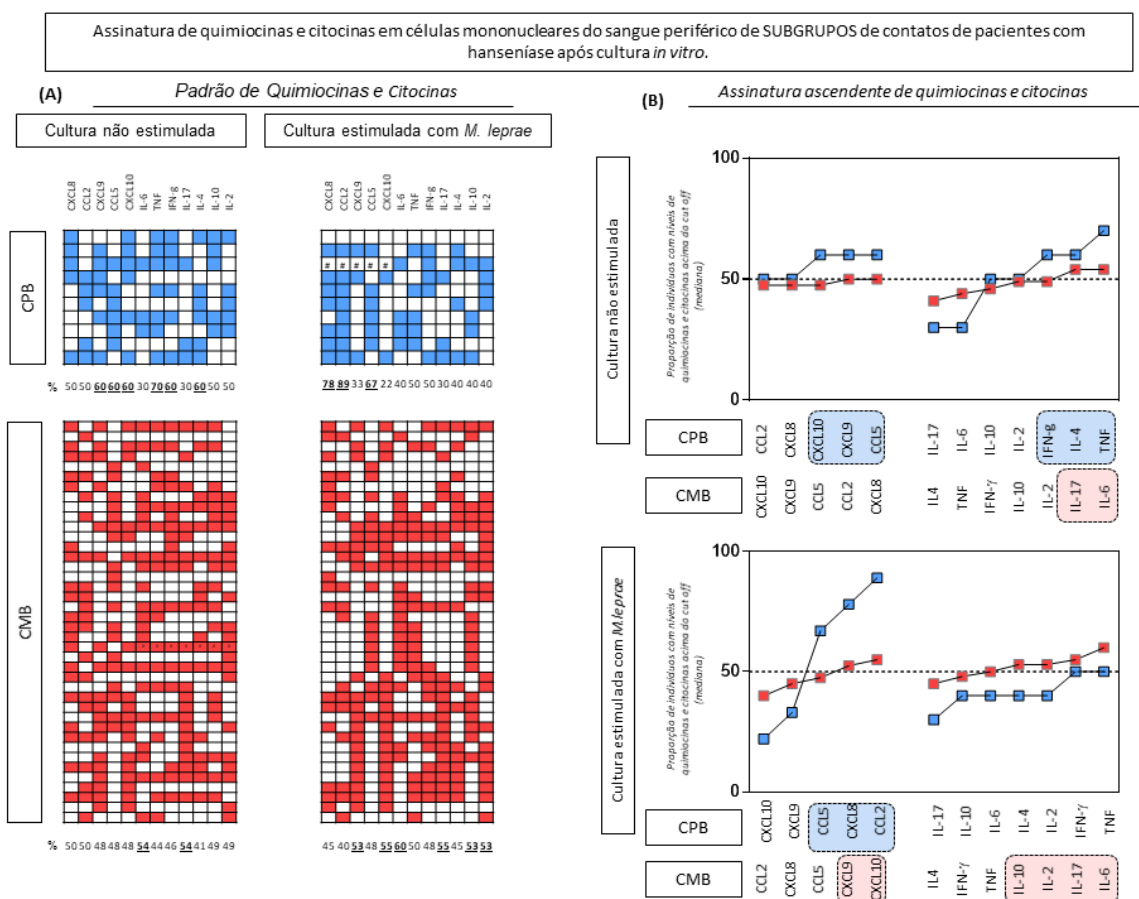
A análise complementar desses resultados, mediante conversão em dados categóricos de assinaturas de quimiocinas e citocinas, apontou diferenças adicionais entre CMB e CPB não detectadas na análise das variáveis contínuas (Figura 12).

Na cultura não estimulada, observou-se maior proporção de indivíduos CPB considerados altos respondedores, ou seja, valores acima de 50% para CXCL10, CXCL9, CCL5, IFN- γ , IL-4, TNF. Por outro lado, indivíduos do grupo CMB tiveram alta produção de citocinas IL-17 e IL-6.

Na cultura estimulada pelo *M. leprae*, houve modificação do perfil de resposta em que ocorreu maior proporção de indivíduos do grupo CPB com produção de quimiocinas CCL5, CXCL8, CCL2 acima do *cut off*. Ao contrário, indivíduos do grupo CMB tiveram alta secreção das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 e de citocinas pró-inflamatórias IL-10, IL-2, IL -17 e IL-6 (Figura 12).

É importante realçar que tanto na cultura não estimulada e estimulada ocorreu uma maior proporção de CMB com alta secreção de IL-17 e IL-6, indicando um perfil inflamatório nesse grupo.

Figura 12 – Assinaturas de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro* - *follow-up*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 12. Assinatura de quimiocinas e citocinas em contatos após cultura de PBMC *in vitro* de CPB (■) e CMB (■). A análise da assinatura de quimiocinas e citocinas foi realizada conforme descrito em materiais e métodos. Variáveis contínuas expressas em pg/mL foram convertidas em dados categóricos utilizando os valores da mediana intrínseca para a cultura não estimulada (CXCL8 = 19.812 pg/mL; CCL2 = 8.425 pg/mL; CXCL9 = 137.331 pg/mL; CCL5 = 162 pg/mL; CXCL10 = 11.536 pg/mL; IL-6 = 3.099 pg/mL; TNF = 21 pg/mL; IFN- γ = 1.488 pg/mL; IL-17 = 40 pg/mL; IL-4 = 9 pg/mL; IL-10 = 51 pg/mL; IL-2 = 78 pg/mL) ou cultura estimulada com *M. leprae* (CXCL8 = 13.674 pg/mL; CCL2 = 7.585 pg/mL; CXCL9 = 15.003 pg/mL; CCL5 = 818 pg/mL; CXCL10 = 5.376 pg/mL; IL-6 = 11.414 pg/mL; TNF = 83 pg/mL; IFN- γ = 2.126 pg/mL; IL-17 = 56 pg/mL; IL-4 = 8 pg/mL; IL-10 = 79 pg/mL; IL-2 = 59 pg/mL) como *cut-off*. A proporção de participantes com níveis elevados de quimiocinas e citocinas foi calculada para cada grupo de estudo e os dados apresentados através do diagrama de cores (A) e curvas ascendentes sobrepostas (B). A estatística foi executada para calcular a frequência de “altos produtores de quimiocinas e citocinas”. Proporção de participantes com valores de quimiocinas e citocinas acima do *cut-off* e superior a 50% foi destacada com negrito e sublinhado no diagrama de cores (A), bem como através da linha tracejada e plano de fundo colorido nas curvas ascendentes (B).

5.9 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS SUBGRUPOS DE CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO* – TEMPO 0 (T0) VS TEMPO 2 (T2).

Dando continuidade ao estudo do acompanhamento dos contatos ao longo do tempo (T0 e T2) foi realizada a análise comparativa da produção de quimiocinas e citocinas por PBMC.

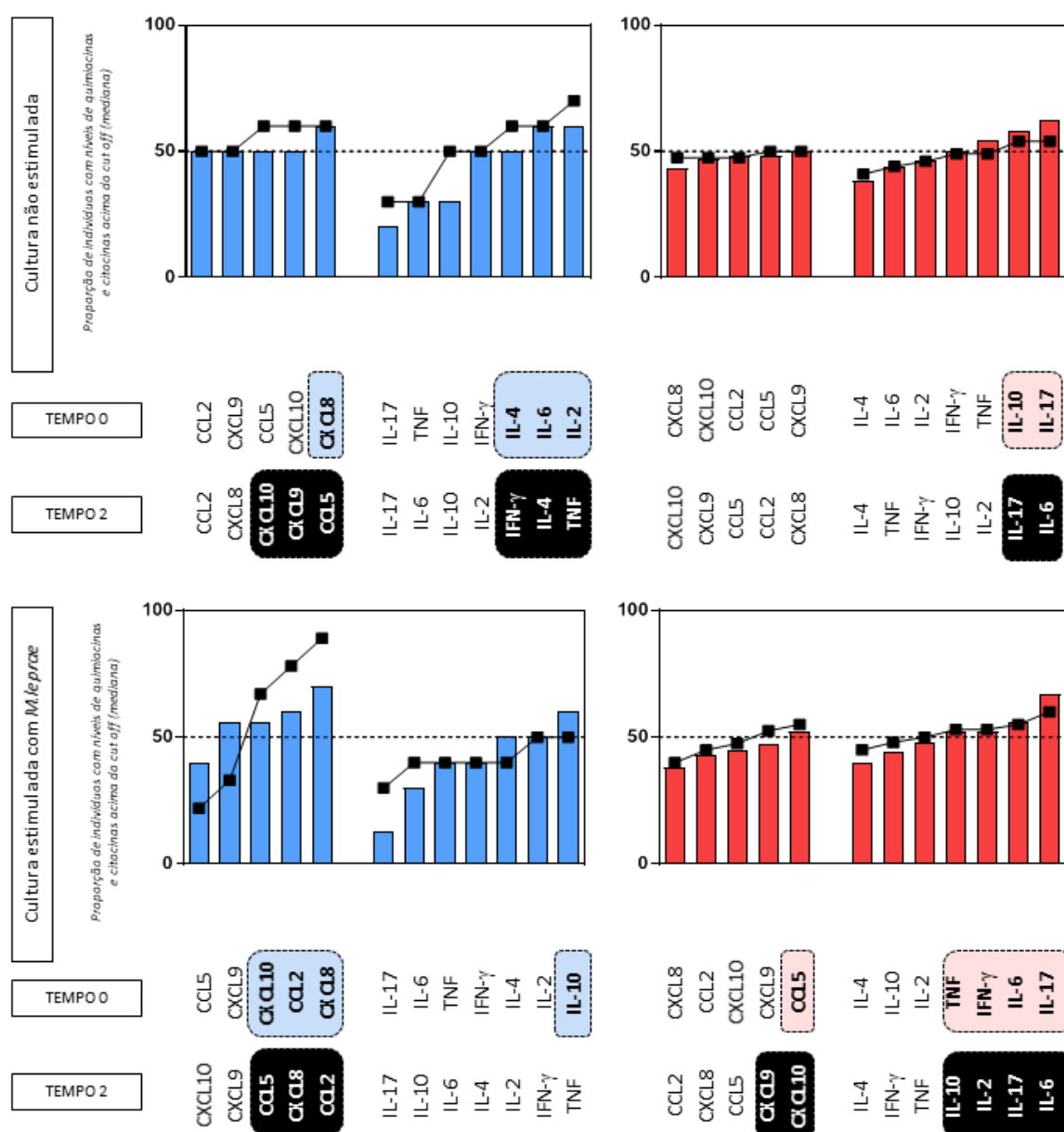
Os resultados demonstraram que na cultura não estimulada, os indivíduos do grupo CPB no T2 apresentaram maior proporção de produção de quimiocinas CXCL10, CXCL9 e CCL5 e de citocinas IFN- γ , IL-4 e TNF. Quanto ao grupo CMB, verificou-se maior proporção de produção de citocinas IL-17 e IL-6.

Na cultura estimulada, foi interessante observar que o grupo CPB no T2 apresentou importante produção de quimiocinas CCL5, CXCL8, CCL2. Os resultados detectados no grupo CMB indicaram maior proporção de produção de quimiocinas CXCL9, CXCL10 e das citocinas IL-10, IL-2, IL-17 e IL-6. Vale ressaltar que tanto no T0 quanto no T2, os CMB se destacaram pela maior produção de citocinas IL-17 e IL-6, indicando um perfil inflamatório neste grupo (Figura 13).

Figura 13 – Secreção de quimiocinas e citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos subgrupos de contatos de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro* - Tempo 0 (TO) vs Tempo 2 (T2).

Assinaturas de quimiocinas e citocinas em células mononucleares do sangue periférico de SUBGRUPOS de contatos de pacientes com hanseníase após acompanhamento.

Assinatura ascendente de quimiocinas e citocinas



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 13. *Comparação da assinatura de quimiocinas e citocinas em contatos após acompanhamento.* A análise da assinatura de quimiocinas e citocinas foi realizada no tempo zero (T0 = barras coloridas) e após 2 anos de acompanhamento (T2 = curva ascendente preta), na ausência de estímulo endógeno (cultura não estimulada) e na presença do antígeno do *M.leprae* (cultura estimulada) em PBMC de CPB (■) e CMB (■). A estatística foi executada para calcular a frequência de “altos produtores de quimiocinas e citocinas”. Proporção de participantes com valores de quimiocinas e citocinas acima do cut-off e superior a 50% foi destacada através da linha tracejada e plano de fundo colorido nas curvas ascendentes.

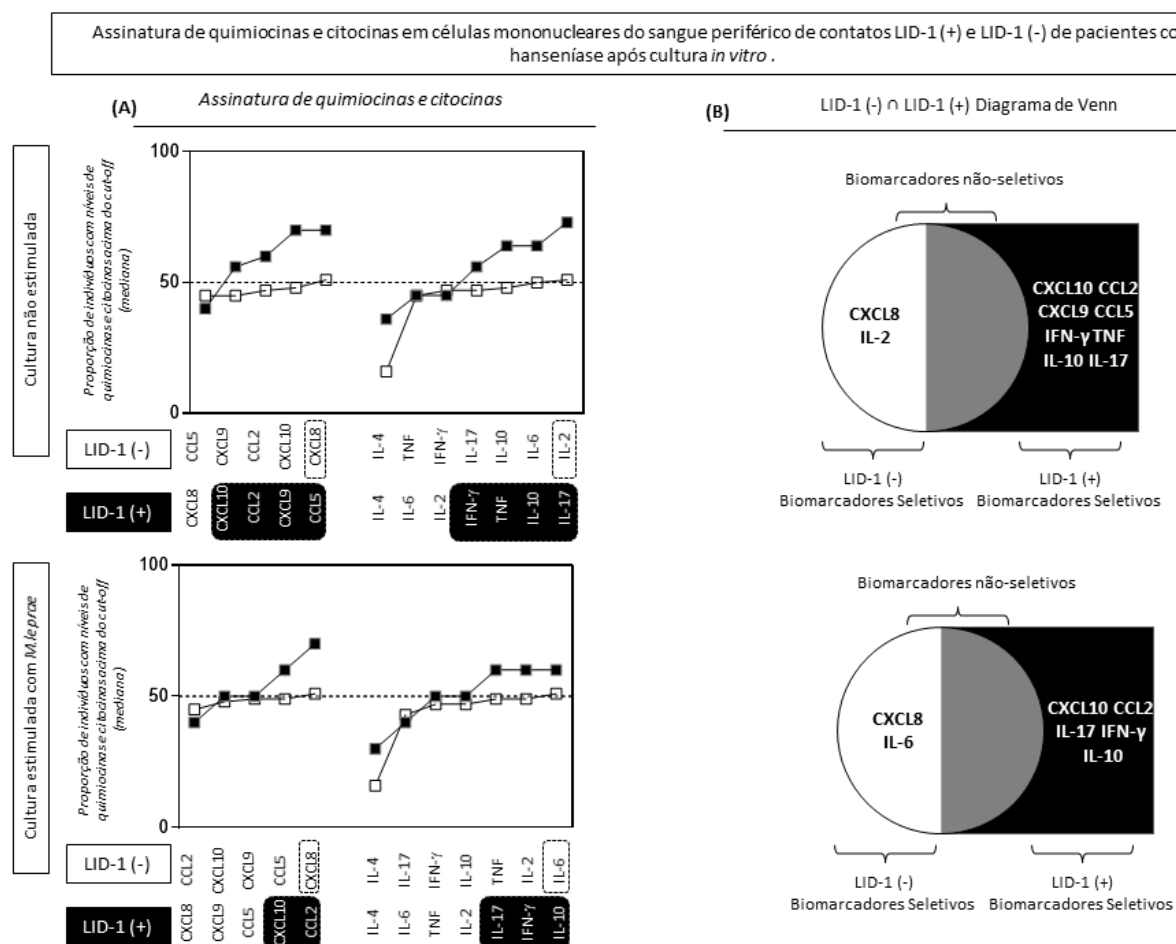
5.10 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO* DE ACORDO COM A RESPOSTA AO LID-1(+) E LID-1(-).

A presença de uma infecção por *S. mansoni* associada ou não aos parâmetros imunológicos do estudo (quimiocinas e citocinas) foi investigada. Os resultados foram considerados agrupando indivíduos com resposta positiva ou negativa para LID-1, bem como indivíduos com resposta positiva ou negativa para *S. mansoni* e por fim o grupo de indivíduos apresentando resposta positiva tanto para LID-1, quanto para *S. mansoni* e respostas negativas para ambos.

Na cultura não estimulada, os resultados mostraram que os indivíduos LID-1(+) apresentaram maior produção das quimiocinas CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5 e de citocinas IFN- γ TNF, IL-10 e IL-17. Por outro lado, na cultura estimulada observou-se maior produção de CXCL10, CCL2 e de IL-17, IFN- γ e IL-10.

Portanto quando se comparou o perfil de resposta imune do grupo LID-1(+) vs LID-1(-) considerando tanto cultura não estimulada quanto estimulada, verificou-se que os marcadores de maior interesse para distinguir esses dois grupos seriam o CCL2 e IL-17 (Figura 14).

Figura 14 – Assinatura de quimiocinas e citocinas em células mononucleares do sangue periférico de contatos LID-1(+) e LID-1(-) de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

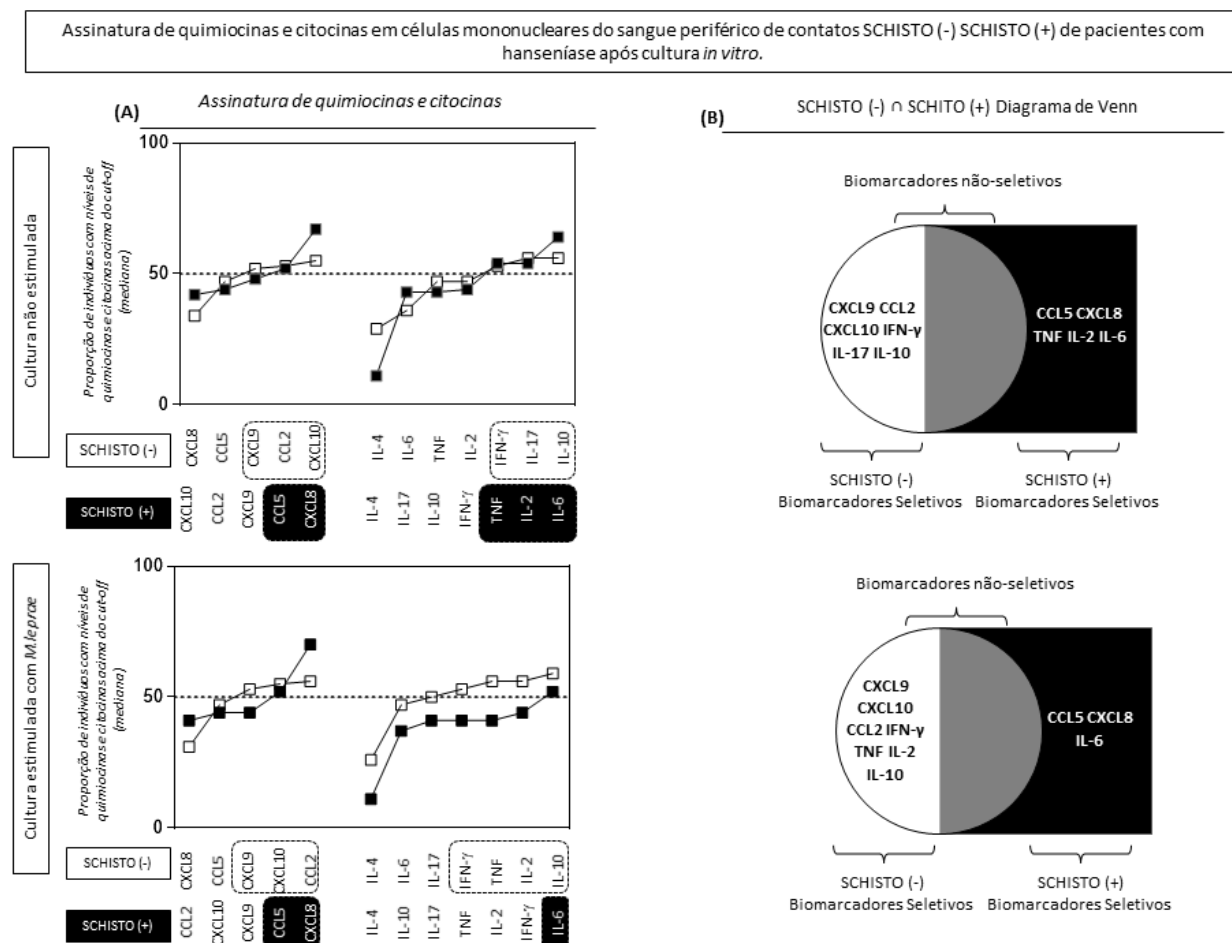
Figura 14. Assinatura de quimiocinas e citocinas em contatos LID-1(-) e LID-1(+). (A) Curvas ascendentes sobrepostas foram construídas para selecionar quimiocinas e citocinas com proporção de contatos LID-1(-) (□) e LID-1(+), acima do cut-off e superior a 50% em cada grupo. (B) Diagrama de Venn foi empregado para identificar o conjunto de quimiocinas e citocinas seletivamente aumentadas no grupo LID-1(-) quando comparado com o grupo LID-1(+). Esses atributos foram destacados em negro.

5.11 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO* DE ACORDO COM A RESPOSTA AO SCHISTO(+)/SCHISTO(-).

Na cultura não estimulada, os resultados mostraram que os indivíduos Schisto(+) apresentaram maior produção das quimiocinas CCL5, CXCL8 e de citocinas TNF, IL-2 e IL-6.

Interessantemente, na cultura estimulada por *M. leprae*, ocorreu maior produção das quimiocinas CCL5, CXCL8 e da citocina IL-6. Esse resultado mostra a importância da seleção dos componentes antigênicos utilizados em cultura de PBMC *in vitro*, uma vez que não detectamos praticamente diferenças relevantes entre a cultura estimulada e não estimulada, quando comparados os grupos infectados ou não pelo *S. mansoni* (Figura 15).

Figura 15 – Assinatura de quimiocinas e citocinas em células mononucleares do sangue periférico de contatos SCHISTO(-) e SCHISTO(+) de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 15. Assinatura de quimiocinas e citocinas em contatos SCHISTO(-) e SCHISTO(+). (A) Curvas ascendentes sobrepostas foram construídas para selecionar quimiocinas e citocinas com proporção de contatos SCHISTO(-) (□) e SCHISTO(+), acima do *cut-off* e superior a 50% em cada grupo. (B) Diagrama de Venn foi empregado para identificar o conjunto de quimiocinas e citocinas seletivamente aumentadas no grupo SCHISTO(-) quando comparado com o grupo SCHISTO(+). Esses atributos foram destacados em negro.

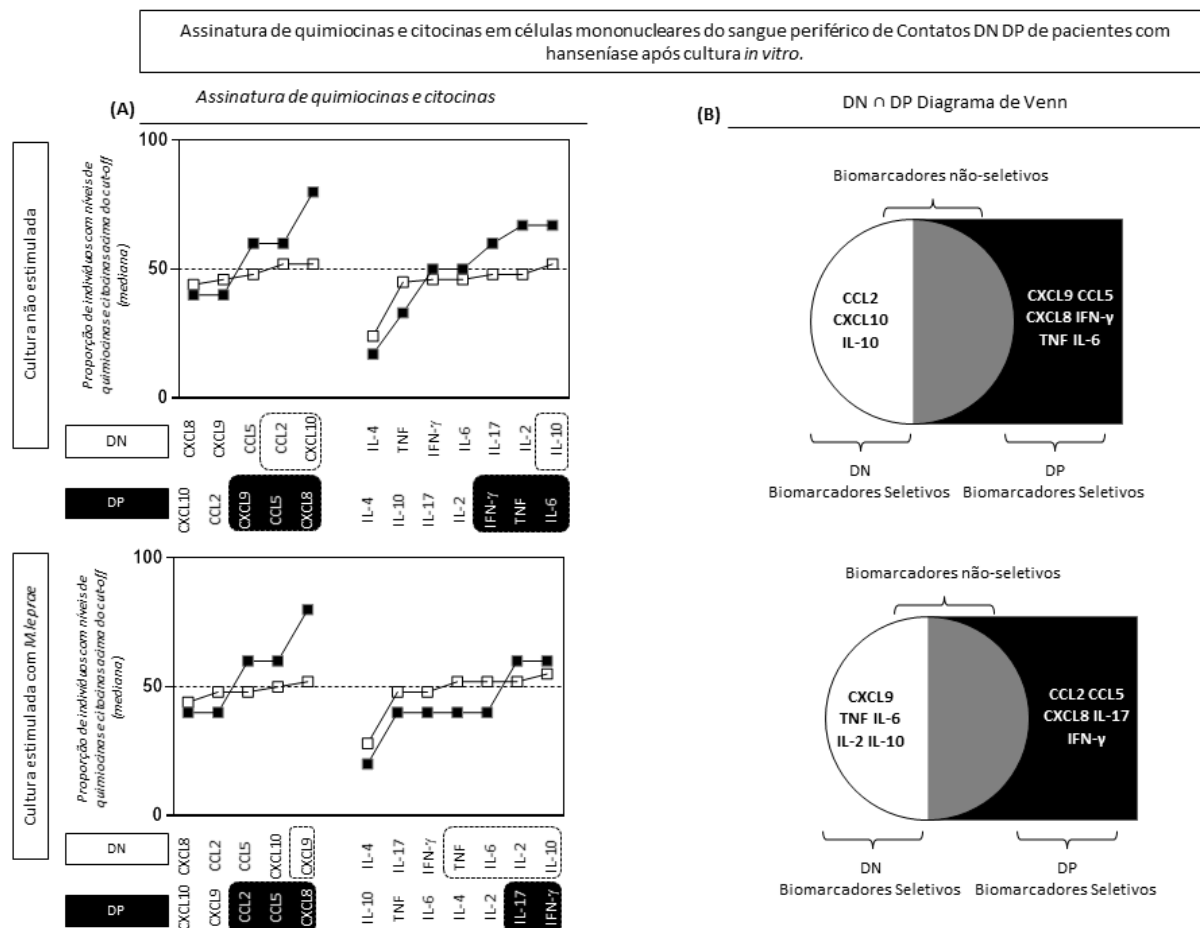
5.12 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE APÓS CULTURA *IN VITRO* DE ACORDO COM A RESPOSTA AO LID-1(+)/SCHISTO(+) E LID-1(-)/SCHISTO(-).

Na cultura não estimulada, os resultados mostraram que os indivíduos LID-1(+)/Schisto(+) apresentaram maior produção das quimiocinas CXCL9, CCL5, CXCL8 e de citocinas IFN- γ , TNF e IL-6. Na cultura estimulada por *M. leprae*, ocorreu maior produção das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8 e das citocinas IL-17 e IFN- γ .

Vale ressaltar que tanto na cultura não estimulada como na estimulada ocorreu maior produção das quimiocinas CCL5, CXCL8 e das citocinas inflamatórias como IL-17 e IFN- γ para o grupo LID-1(+)/Schisto(+).

Esse resultado reforça o fato de que indivíduos que possuem anticorpo anti-LID-1(+), apresentam um perfil inflamatório com predominância das citocinas IFN- γ , TNF, IL-17 e IL-6 (Figura 16).

Figura 16 – Assinatura de quimiocinas e citocinas em células mononucleares do sangue periférico de contatos DN DP de pacientes com hanseníase após cultura *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

Figura 16. Assinatura de quimiocinas e citocinas em contatos Duplo negativos (DN) - LID-1(-)/SCHISTO(-) e Duplo positivos (DP) - LID-1(+)/SCHISTO(+). (A) Curvas ascendentes sobrepostas foram construídas para selecionar quimiocinas e citocinas com proporção de contatos DN (□) e DP (■), acima do *cut-off* e superior a 50% em cada grupo. (B) Diagrama de Venn foi empregado para identificar o conjunto de quimiocinas e citocinas seletivamente aumentadas no grupo Duplo negativo quando comparado com o grupo Duplo positivo. Esses atributos foram destacados em negro.

5.13 DETECÇÃO DE DNA DE ML EM RASPADO DÉRMICO DE CONTATOS POR MEIO DA qPCR.

A presença de DNA de ML em amostras de raspado intradérmico do lóbulo da orelha foi avaliada pela técnica de qPCR em 66 indivíduos no T1. Observou-se que 100% dos contatos não apresentaram DNA de ML nas amostras de raspado dérmico.

Vale considerar que a coleta de raspado intradérmico realizada nesse grupo de contatos no T1 ocorreu aproximadamente um ano após o T0. Dessa forma os casos/pacientes já haviam sido tratados e, portanto, uma provável redução da carga de exposição dos contatos ao *M. leprae*, contribuiu para os resultados negativos da qPCR.

6. DISCUSSÃO

Já é consenso na literatura que a estratégia de erradicar a hanseníase vai muito além do que apenas o diagnóstico precoce, tratamento adequado e acompanhamento da adesão do paciente ao tratamento até o processo de cura. É necessário prevenir a transmissão da doença, por meio de uma rede ativa e atuante de vigilância epidemiológica, com o intuito de monitorar e identificar contatos de pacientes e populações com alto risco de desenvolver a hanseníase (CARDONA-CASTRO et al., 2005; SMITH et al., 2016; MIERAS et al., 2018; VAN HOOIJ et al., 2020).

Contatos domiciliares de casos de hanseníase podem apresentar infecção subclínica, e estarem envolvidos ativamente na disseminação e propagação do ML para indivíduos susceptíveis em regiões endêmicas, contribuindo com isso para a manutenção da cadeia de transmissão da doença (ARAÚJO et al., 2012).

Diversos estudos ao longo dos anos evidenciaram que contatos próximos a pacientes com hanseníase têm maior probabilidade de desenvolver a doença do que a população em geral, especialmente quando os pacientes possuem altas cargas bacilares, como a forma MB (SALES et al., 2011; SMITH et al., 2017; STEINMANN et al., 2020; PEDROSA et al., 2018).

Teixeira et al. (2020), analisaram os fatores de risco em 42.725 contatos domiciliares de pacientes com hanseníase no Brasil, mostrando que esses indivíduos podem ter risco aumentado de adquirir a doença, especialmente em famílias com casos MB e contatos mais idosos.

Estudos têm apontado para a seleção de um conjunto de biomarcadores sorológicos e celulares de infecção subclínica que resultem em um diagnóstico preciso, antes da manifestação clínica da doença. Dessa forma, prevenindo o surgimento de sequelas e deformidades físicas, além de interromper a cadeia de transmissão da doença. Ferramentas como análise de perfil de quimiocinas e citocinas utilizadas em nosso estudo, têm sido propostas como estratégia. Porém, os resultados ainda não apresentam respostas padronizadas que possibilitem seu uso regular no monitoramento, necessitando de mais investigações (HASAN et al., 2004; GELUK et al., 2012; NATH et al., 2015; QUEIROZ, et al., 2019).

Neste contexto, com o intuito de caracterizar o perfil imunológico e parasitológico dos contatos de pacientes com infecção pelo *M. leprae*, o presente estudo analisou o perfil de quimiocinas e citocinas e a relação com o polimorfismo

genético e a presença de coinfeção. Por meio da citometria de fluxo, foram analisados sobrenadantes de culturas de PBMC *in vitro* para sete citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17) e cinco quimiocinas (CXCL8/IL8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10).

Assim, analisando o perfil de resposta entre contatos de caso paucibacilar (CPB) vs contatos de caso multibacilar (CMB) no tempo 0 (T0), importantes resultados foram obtidos, destacando-se um perfil de citocinas pró-inflamatórias (IL-17 e TNF- α) relevante nos indivíduos do grupo CMB. Por outro lado, no grupo CPB foi maior a produção de quimiocinas CXCL8, CCL2, CXCL9 e CXCL10.

Para verificar como esses resultados se comportariam em uma abordagem categórica (Figura 7), diferente da análise contínua (Figura 8), confirmamos os dados obtidos anteriormente. O qual constatou-se no grupo CMB, alta secreção da quimiocina CCL5, e uma importante produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-17. Nossos dados confirmam o que já vem sendo descrito na literatura, da utilização de quimiocinas e citocinas como importantes biomarcadores na detecção de infecção subclínica (GELUK et al., 2012; MARTINS et al., 2012; SAINI et al., 2013); bem como na avaliação da efetividade do tratamento e na indicação de reações hansênicas (MENDONÇA et al., 2007; SCOLLARD et al., 2011; MADAN; AGARWA; CHANDER, 2011; CASSIER-COSTA et al., 2017; QUEIROZ et al., 2019).

A resposta imune do hospedeiro frente ao bacilo determina a evolução clínica na hanseníase, que varia de uma forte resposta pró-inflamatória (Th1/Th17) levando ao controle bacteriano comum nos indivíduos PB e uma resposta imune anti-inflamatória (Th2) produzindo altos níveis de anticorpos, mas incapaz de controlar a bactéria, encontrada nos pacientes MB (SAINI et al., 2013; NATH et al., 2015).

Uma das principais funções das células Th17 é a neutrofilia, que ocorre através da secreção da quimiocina CXCL8, e por ação direta da IL-17 secretada no local quando ocorre ativação dos neutrófilos recrutados. A remodelação, reparo de tecidos e produção de proteínas antimicrobianas são outros papéis importantes dessa citocina (PELLETIER et al. 2010; SAINI et al., 2013, 2020; SADHU e MITRA, 2018).

Os estudos em relação à citocina IL-17 na hanseníase apresentam resultados controversos, com alguns indicando baixa produção no soro e baixa expressão *in situ*, enquanto outros mostram uma expressão aumentada nas lesões da hanseníase (DA MOTTA-PASSOS et al., 2012; TROMBONE et al., 2012).

Mais recentemente, Aarão et al., (2016) observou maior participação da IL-17 na forma Tuberculóide (TT) da doença. Sendo essa expressão explicada pelo comportamento dessa citocina no polo de resistência da doença. Nesse sentido, vários relatos ao longo dos anos têm demonstrado que o aumento da produção de IL-17 desencadeia resposta inflamatória associada à ação de citocinas como TNF- α , IL-6 e secreção de enzimas que induzem a produção de intermediários reativos de oxigênio, como a iNOS. Como resultado, tem-se a ativação de uma resposta microbicida mediada por macrófagos na forma resistente da doença, além de estimular linfócitos Th1.

Segundo Saini et al. (2013), a expressão de IL-17 e IFN- γ em contatos domiciliares saudáveis expostos à infecção pelo ML foi maior do que quando comparado com os indivíduos doentes, sugerindo um papel importante dessas citocinas como potencial biomarcador de infecção precoce. Além disso, os autores relataram que a expressão dessas citocinas em lesões de pele foi menor do que em PBMC estimuladas por antígeno, o que pode estar relacionado às diferenças no número de células nas lesões ou às respostas de memória mais fortes nas células circulantes. No entanto, os dados de Santana et al. (2017), demonstraram uma produção significativa de IL-17 em soros de pacientes com hanseníase, quando comparado com indivíduos controles do estudo, indicando o envolvimento de uma resposta pró-inflamatória.

Anteriormente, outros estudos relataram uma resposta protetora quando observado aumento de IL-17 e IL-1 β nos pacientes com a forma tuberculóide da doença. A citocina IL-1 β estaria regulando a polarização de Th17 e sua interação com IL-23, com isso amplificando as respostas da citocina Th17 (SADHU et al., 2016). Além disso, estudo de Madam et al. (2011), verificaram níveis elevados de IL-1 β em pacientes multibacilares, enquanto que, estudo de Santos et al. (2017), indicou que as citocinas IL-1 β e IL-17A estão associadas à forma PB e contribuem para o controle da infecção pelo *M. leprae*.

Em relação à citocina IL-6, já é consenso na literatura quanto às suas funções próinflamatórias, que afetam desde a imunidade até o reparo tecidual e metabolismo. Também promove a diferenciação de células B, estimulando IL-17 e inibindo células T reguladoras. Apresenta-se elevada na hanseníase, e tem sido demonstrado níveis aumento no desenvolvimento de Eritema Nodoso Hansênico (ENH) e também nas

reações hansênicas do tipo 1 (BELGAUMKAR et al., 2007; STEFANI et al., 2009; ARANGO DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Um estudo realizado por Cassirer-Costa et al. (2017), com o objetivo de identificar biomarcadores para o diagnóstico precoce e para a discriminação entre as diferentes formas da doença, analisou níveis séricos de várias citocinas, entre elas a IL-6. Os resultados demonstram que no polo VV houve maior expressão dos níveis séricos de IL-6 em comparação com pacientes do polo TT e indivíduos não infectados, sugerindo que a IL-6 pode desempenhar um papel importante na patogênese da doença.

Embora nossos dados estejam relacionados a um grupo de contatos assintomáticos sem manifestações clínicas evidentes, considera-se a possibilidade de uma infecção subclínica nesses indivíduos, especialmente naqueles do grupo CMB, que apresenta risco de adoecimento mais elevado devido à maior exposição ao bacilo, além de apresentarem um perfil de citocinas pró-inflamatórias coerente com uma resposta imune adaptativa específica ao *M. leprae* nas culturas estimuladas.

Com relação às quimiocinas, diversos estudos citam seu papel nas reações hansênicas. No entanto, a literatura é escassa em relação aos contatos. No presente estudo foi observado maior frequência de altos produtores de quimiocinas no grupo CPB quando comparado ao grupo CMB.

A quimiocina CXCL10(IP-10), é secretada sob condições pró inflamatórias em resposta ao IFN- γ , por vários tipos de células, incluindo leucócitos, monócitos, neutrófilos ativados, células epiteliais, células endoteliais, células estromais e queratinócitos (LUSTER; RAVETECH, 1987; LIU et al., 2011). Alguns estudos têm mostrado que essa quimiocina está envolvida na patogênese da hanseníase e que níveis circulantes de CXCL10 são elevados em pacientes com reação do tipo 1 (STEFANI et al., 2009; SCOLLARD et al., 2011).

Ferreira et al. (2021), ao analisarem a CXCL10 e seu papel no monitoramento da resposta ao tratamento em pacientes com hanseníase, observaram que os indivíduos que não reduziram o índice baciloscópico após a PQT apresentaram diminuição dos níveis séricos de CXCL10 (IP-10) no momento da alta por cura. O que não foi observado nos soros dos pacientes que apresentaram redução da carga bacilar após 12 doses de PQT. Isso sugere que níveis mais altos de CXCL-10 são importantes para o controle da carga bacilar. Além disso, uma análise das respostas imunes celulares contra antígenos do *M. leprae* revelou que células de pacientes que

apresentaram redução do índice baciloscópio após a liberação da PQT aumentaram a produção de CXCL10 em resposta ao *M. leprae*.

Recentemente Tió-Coma et al. (2019), em um trabalho de assinaturas de RNA no sangue total de pacientes com hanseníase identificaram e indicaram os genes associados às quimiocinas MCP-1 (CCL2) e CXCL10 como biomarcadores para o diagnóstico precoce das reações hansênicas. Anteriormente, Medeiros et al. (2015) em um estudo imuno-histoquímico mostrou que a quimiocina MCP-1 estava presente em nervos acometidos pela hanseníase, sendo esta quimiocina também associada ao depósito excessivo de matriz extracelular, o que pode estar relacionado a danos nos nervos.

Segundo Geluk et al. (2012), as quimiocinas MCP-1 (CCL2) e MIP-1 β podem potencialmente distinguir respostas imunes ao patógeno daquelas induzidas durante a exposição assintomática ao ML. Outros resultados encontrados nesse estudo foram relacionados a IP-10 (CXCL10), que foi correlacionada com a exposição ao *M. leprae* e, portanto, com o risco de infecção e sua subsequente transmissão. Esses dados corroboram com os de Van Hooij et al. (2016, 2018), em que a quimiocina IP-10 (CXCL10) foi indicada como marcador celular mais significativo para identificar pacientes com hanseníase borderline-lepromatosa e lepro-lepromatosa, bem como, borderline-tuberculóide e tuberculóide em populações de baixa a alta endemicidade.

Outra análise importante do nosso estudo foi em relação ao polimorfismo do gene TLR4 rs1927914, em que foi investigado o perfil de síntese de quimiocinas e citocinas por PBMC em contatos apresentando diferentes alelos e genótipos (A vs G e AA vs AG vs GG), respectivamente. Em geral, o genótipo GG foi associado à menor secreção de quimiocinas e citocinas por PBMC em culturas não estimuladas ou estimuladas por *M. leprae*. Por outro lado, o alelo A e o genótipo AA foram associados à maior secreção de quimiocinas e citocinas por PBMC, independentemente da condição de cultura.

Sabe-se o *M. leprae* e outras espécies de micobactérias, como *M. tuberculosis*, são ricos em vários agonistas para membros da família TLR, incluindo TLR1, 2 e 4 (HART; TAPPING, 2012). E que interações entre componentes bacterianos, fúngicos e virais e TLRs, ativam a via de NF- κ B, conduzindo a produção quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, bem como as moléculas coestimuladoras necessárias para a ativação de células T (MEDZHITOV et al. 1997, TAYLOR et al., 2012).

Diferente dos nossos resultados, um estudo sorológico conduzido por Santana et al. (2017), indicou associação entre o alelo T do marcador rs3804099 no gene TLR2 e a suscetibilidade à hanseníase. Nesse estudo, em relação ao gene TLR4 (rs1927914), os autores não encontraram associação significativa ($p=0,051$). Entretanto, foi observado que o alelo G pode ser um fator de proteção contra o desenvolvimento de reações hansênicas.

Resultados conflitantes em estudos genéticos podem ocorrer por diferentes razões. Uma delas seria a diversidade étnica, ou seja, frequências alélicas para TLR, diferentes nas populações, quando comparado à população brasileira. A literatura tem apontado para a contribuição das variações nos genes dos TLR com a suscetibilidade à hanseníase em diferentes populações. Sendo que, variantes nestes genes foram relacionadas com aumento do risco de hanseníase ou reações hansênicas (MIRA et al., 2004; MISCH et al., 2008; WONG et al., 2010; MARQUES et al., 2013; SANTANA et al., 2017). Enquanto alguns *locus* afetam a suscetibilidade intrínseca à hanseníase (*hanseníase per se*), outros modulam fatores de risco para as formas paucibacilares ou multibacilares da doença ou para o desenvolvimento de reações hansênicas (MIRA et al., 2004).

Outros polimorfismos em alelos TLR e a suscetibilidade à hanseníase também tem sido descritos, como os do gene TLR1. Estudo de Marques et al. (2013), documentaram uma associação significativa entre o alelo S (N248S, rs48033095) com a doença em diferentes populações brasileiras, que foram analisados tanto separadamente quanto em metanálise. Os autores destacam a importância de se considerar que outros alelos ou haplótipos no gene TLR1 possam contribuir para a suscetibilidade à doença na população brasileira.

Analisando os resultados do presente trabalho utilizando o rs1927914 do gene TLR4 e parâmetros imunológicos, verificou-se maior produção de quimiocinas, especialmente a CXCL8 e da citocina TNF nos indivíduos que apresentam o genótipo AA, independente da condição da cultura, estimulada ou não pelo ML. Além disso, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos CPB AA/AG vs CPB GG e CMB AA/AG vs CMB GG, especialmente para os marcadores CXCL8, IL-6, TNF e IL-17 na cultura estimulada. É importante ressaltar a maior produção de IL-17 do grupo CMB AA/AG em relação ao grupo CPB AA/AG.

Diante desse resultado hipotetiza-se a presença de uma resposta inflamatória importante no grupo CMB AA/AG. Esse dado vem de encontro à literatura que

confirma o maior risco de adoecimento dos contatos de pacientes MB. Sendo assim, considerando o perfil inflamatório desses indivíduos do grupo CMB associado ao perfil genético (AA/AG) de suscetibilidade à hanseníase, reforça-se a hipótese de que esses participantes possam estar apresentando uma infecção subclínica.

Os dados apresentados corroboram com os achados de Santana et al. (2017), em relação ao polimorfismo do gene TLR4, em que os autores observaram maior produção de IL-1 β e IL-17 entre portadores do alelo A no SNP rs1927914. A IL-1 β é essencial para a amplificação da resposta imune específica das células T e seus níveis tendem a diminuir após a poliquimioterapia (MOUBASHER et al., 1998). Esta citocina também é produzida em altas concentrações em pacientes multibacilares (MADAN; AGARWA; CHANDER, 2011).

Embora as análises de quimiocinas e citocinas por Santana et al. (2017) tenham sido realizadas no soro de pacientes com hanseníase, os autores verificaram diferenças que apontam para um papel funcional para alguns marcadores. No caso de TLR1, foram encontradas alterações significativas para IL-17 e MCP-1 para os marcadores rs4833095 e rs5743551 e IL-12p40 para rs4833095.

Por outro lado, Libraty et al. (1997) utilizaram culturas de PBMC estimuladas com o antígeno do *M. leprae* e mostraram aumento da produção da citocina IL12p40 nas células dos pacientes em relação aos controles, destacando o mecanismo no qual o IFN- γ regularia negativamente a IL-10 pela indução de IL-12.

Sampaio et al. (1991) verificaram maior produção de IFN- γ induzida pelo *M. leprae* nos contatos multibacilares em comparação aos contatos paucibacilares. Além disso, a porcentagem de indivíduos apresentando produção de IFN- γ em resposta aos estímulos do antígeno do *M. leprae in vitro* foi maior entre os contatos domiciliares e ocupacionais, sugerindo alta frequência de sensibilização. Esses dados reforçam a presença do IFN- γ como citocina pró-inflamatória em pacientes com hanseníase e reafirmam a hipótese do presente trabalho de que os contatos de MB possam estar iniciando uma resposta inflamatória mediante a exposição à uma carga bacilar maior.

Em adição, outros estudos também mostraram a participação das citocinas IL-6 e IL-17 relacionadas ao gene TLR2. Neste caso, os portadores do alelo T produziram níveis mais elevados dessas citocinas. Esse alelo também foi associado ao aumento do risco de hanseníase na população estudada (KRUTZIK et al., 2003; BOCHUD et al., 2008; SANTANA et al., 2017).

A partir das análises do primeiro momento (T0) que mostraram um perfil inflamatório no grupo CMB, a próxima questão foi verificar como estaria o perfil imunológico desses indivíduos após dois anos de acompanhamento (T2). Os resultados mostraram que na cultura estimulada o grupo CPB no T2 apresentou importante produção de quimiocinas CCL5, CXCL8, CCL2. Já no grupo CMB, houve maior produção de quimiocinas CXCL9, CXCL10 e citocinas IL-10, IL-2, IL-17 e IL-6. Vale ressaltar que tanto no T0 quanto no T2, os indivíduos do grupo CMB se destacaram pela maior produção de citocinas IL-17 e IL-6, indicando um perfil inflamatório neste grupo.

Entre as quimiocinas destaca-se a presença de CXCL8 pelo grupo CPB no T2 em cultura estimulada. Em contrapartida, Queiroz et al. (2019; 2021) relataram níveis similares dessa quimiocina entre casos-índice e seus contatos domiciliares, sendo importante considerar que os dados desse estudo foram obtidos utilizando soro dos participantes. Como afirmaram os autores, a ausência de estimulação das células com antígenos do *M. leprae* pode ter influenciado na similaridade do perfil sérico de citocinas e quimiocinas.

Entretanto, no presente estudo, utilizando sobrenadante de cultura de PBMC estimulada com *M. leprae*, foram detectadas diferenças importantes entre os contatos de PB e MB. Portanto, corrobora com os estudos que utilizaram estimulação *in vitro*, os quais indicam a potencialidade de algumas quimiocinas e citocinas, tais como CCL2 (MCP-1) e IFN- γ na avaliação da infecção subclínica (GELUK et al., 2012). Segundo esses autores, a produção de IFN- γ induzida por proteínas específicas de *M. leprae* pode identificar indivíduos altamente expostos ao *M. leprae* e, portanto, com maior risco de desenvolver doença e/ou transmitir a bactéria. Tais resultados estão em concordância com os dados encontrados, que mostraram produção importante de IFN- γ em contatos de pacientes MB (CMB).

É importante ressaltar que estudos anteriores realizados por Hatta et al. (1995), identificaram *M. leprae* em amostras de mucosa nasal em contatos de pacientes na Indonésia. Esse resultado vem de encontro aos dados obtidos por Geluk et al. (2012), reforçando a presença de infecção subclínica associada à resposta de IFN- γ específica para essa bactéria em contatos.

Martins et al. (2012), demonstraram redução progressiva dos níveis de IFN- γ em resposta aos peptídeos sintéticos específicos do *M. leprae* entre os contatos de

pacientes multibacilares quando comparados com indivíduos menos expostos. Esses autores sugerem que uma modulação da produção de IFN- γ pode ocorrer devido ao aumento da carga bacilar, durante a infecção ou à maior exposição ao *M. leprae*. Esses achados reforçam que uma grande proporção de pacientes com hanseníase provavelmente adquire a infecção pelo *M. leprae* de indivíduos infectados, mas ainda não notificados ou mesmo daqueles que apresentam infecção subclínica.

Para atender ao objetivo relacionado aos níveis de anticorpos anti-LID-1 (ML) e anti-antígenos de *S. mansoni* no soro dos contatos monitorados, investigou-se a participação de coinfeção associada a hanseníase. Os resultados foram considerados agrupando indivíduos LID-1(+)/LID-1(-), Schisto(+)/Schisto(-) e LID-1(+)/Schisto(+) e LID-1(-)/Schisto(-).

Na cultura estimulada observou-se maior produção de CXCL10, CCL2 e de IL-17, IFN- γ e IL-10. Quando se comparou o perfil de resposta imune do grupo LID-1(+) vs LID-1(-) considerando tanto cultura não estimulada quanto estimulada, verificou-se que os marcadores de maior interesse para distinguir esses dois grupos foram o CCL2 e IL-17.

Quanto à análise do grupo Schisto(+)/Schisto(-), na cultura estimulada por *M. leprae*, ocorreu maior produção das quimiocinas CCL5, CXCL8 e da citocina IL-6. Esse resultado mostra a importância da seleção dos componentes antigênicos utilizados em cultura de PBMC *in vitro*, uma vez que não foram encontradas diferenças relevantes entre a cultura estimulada e não estimulada, quando comparados os grupos infectados ou não pelo *S. mansoni*.

Por fim, em relação ao grupo LID-1(+)/Schisto(+) e LID-1(-)/Schisto(-), observou-se que tanto na cultura estimulada por *M. leprae*, como não estimulada ocorreu maior produção das quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8 e das citocinas IL-17 e IFN- γ . Esse resultado reforça o fato de que indivíduos que possuem anticorpo anti-LID(+), apresentam um perfil inflamatório com predominância das citocinas IFN- γ , TNF, IL-17 e IL-6.

Sabe-se que os helmintos intestinais provocam forte resposta sistêmica Th2 ou regulam positivamente a atividade de células T reguladoras, que normalmente estão associadas à imunidade Th1 enfraquecida (COOPER et al., 2000; BORKOW et al., 2000). A ativação e manutenção de resposta imune do tipo Th1, fundamental para uma resposta bem-sucedida contra micobactérias, pode ser prejudicada em pacientes

coinfectados por forte resposta Th2 e/ou regulação positiva de Treg mediada por vermes intestinais. Portanto, é possível que a infecção por helmintos intestinais possa facilitar uma infecção subsequente pelo *M. leprae* ou sua progressão para formas mais graves de hanseníase (GOULART et al., 2002; DINIZ et al., 2010).

A indução de mecanismos imunomoduladores tem sido usada para explicar dados epidemiológicos que relatam associação inversa entre a exposição a infecções por helmintos e doenças inflamatórias crônicas humanas, incluindo hanseníase (MAIZELS; MCSORLEY, 2016; MCSORLEY et al., 2014; OKTARIA et al., 2016). Os helmintos são potentes indutores de mecanismos reguladores capazes de reduzir processos inflamatórios e doenças autoimunes (MAIZELS; MCSORLEY, 2016; WEBB et al., 2016).

Em relação à esquistossomose, Phillips et al. (2017), demonstraram associação entre hanseníase e essa doença, em Minas Gerais, por meio de dados referentes à sobreposição geoespacial e temporal. Dados de casos novos de infecções por *M. leprae* e *S. mansoni* no período de 2007 a 2014 foram obtidos do sistema de informação de agravos de notificação no Brasil (SINAN). Os autores verificaram risco relativo de 6,80 vezes mais chances da ocorrência de hanseníase em bairros com residentes diagnosticados com esquistossomose. As taxas de incidência de hanseníase aumentaram com as taxas de incidência correspondentes de esquistossomose e as tendências temporais de ambas as infecções foram semelhantes.

Em um estudo recente do nosso grupo, foi detectada associação entre hanseníase e esquistossomose. Foi confirmada a ocorrência de um maior risco (aOR= 8,33) de desenvolver a doença entre os indivíduos considerados contatos e infectados pelo *S. mansoni* (DENNISON et al., 2021).

Interessantemente, dados de Diniz et al. (2010) mostraram associação entre hanseníase multibacilar e helmintos transmitidos pelo solo. Nesse estudo, demonstrou-se que os helmintos podem modular a resposta imune gerando uma fraca resposta mediada por células e, portanto, favorecer a forma mais grave da doença. Os autores demonstraram que a frequência de células expressando citocinas intracelulares Th2, como IL-4 e IL-10, em leucócitos de pacientes com hanseníase coinfectados com helmintos intestinais foi maior do que a de pacientes não infectados. Curiosamente, embora a frequência de células expressando IL-4 e IL-10 intracelulares estivesse elevada em culturas estimuladas por enterotoxina B de *Staphylococcus*

(SEB) de pacientes lepromatosos, esses pacientes apresentaram o menor nível de IFN- γ intracelular.

Por outro lado, no presente trabalho, considerando o grupo LID-1(+)/Schisto (+), foi observada uma resposta inflamatória com produção de IFN- γ e IL-17. Embora os resultados não tenham mostrado associação entre esquistossomose e hanseníase, acredita-se que diferentemente do estudo de Diniz et al. (2010), a presença de resposta imune Th1 nesse grupo seja sugestivo de infecção subclínica e de apresentarem perfil coerente com a forma clínica PB. Tais estudos merecem maiores investigações tanto no contexto das coinfeções quanto na apresentação clínica da hanseníase.

Finalmente, os dados relativos à presença de DNA de ML em amostras de raspado intradérmico pela técnica de qPCR, foram negativos. Vale ressaltar que a coleta de raspado intradérmico ocorreu aproximadamente dois anos após o tratamento dos casos-índice. Portanto, uma provável redução da carga de exposição dos contatos ao *M. leprae*, pode ter contribuído para os resultados negativos da qPCR.

A detecção de DNA do ML em raspado intradérmico por meio da qPCR favorece o diagnóstico precoce, auxiliando na interrupção da cadeia de transmissão (MARTINEZ et al., 2014).

Gama et al. (2018), observaram que 23,89% dos contatos assintomáticos apresentaram DNA bacilar em amostras de raspado intradérmico utilizando a qPCR. e acrescentaram que após acompanhamento de um ano, três indivíduos foram diagnosticados com hanseníase. Os autores concluíram que o método pode ser utilizado para estimar o risco de progressão para doença entre os contatos domiciliares, e consideram a qPCR como potencial método de triagem para um protocolo quimioprolático. Sabe-se que a hanseníase tem um longo período de incubação e que os sintomas clínicos são difíceis de detectar nos estágios iniciais da doença. Portanto, resultados positivos de raspado intradérmico para qPCR são extremamente relevantes no acompanhamento de contatos.

Por ser um procedimento invasivo, a coleta de amostras de raspado intradérmico no presente estudo foi limitada apenas a um sítio específico (lóbulo da orelha direita), acredita-se que uma maior frequência de positividade para qPCR poderia ser alcançada se outros locais de coleta pudessem ser utilizados, como é padrão para microscopia de esfregaço (BRASIL, 2010).

É importante ressaltar que os estudos de acompanhamento de contatos com uma abordagem voltada para análise de parâmetros imunológicos e genéticos são limitados. Desta forma, mais estudos são necessários para compreender a participação das quimiocinas, citocinas, polimorfismo genético e coinfeção nesses indivíduos e as possíveis alterações que possam confirmar uma infecção subclínica.

7. CONCLUSÃO

Os resultados confirmaram que no grupo de contatos CMB houve maior produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-17 e IFN- γ . Enquanto o grupo CPB apresentou maiores níveis de quimiocinas de modo geral, destacando CXCL8 e CCL2.

Ao analisar os parâmetros imunológicos associados aos genótipos, concluiu-se que os indivíduos que possuem o alelo A (AA/AG) de modo geral apresentaram níveis elevados de quimiocinas e citocinas. Sendo que a IL-17 se destacou, reforçando o papel dessa citocina no contexto da hanseníase.

O estudo permitiu ainda constatar que os indivíduos com genótipos de susceptibilidade (AA/AG) e do grupo CMB, apresentaram maior produção de citocinas pró-inflamatórias. Embora os participantes desse grupo não tenham manifestado sintomas clínicos da hanseníase, durante o acompanhamento, acredita-se que pelos resultados apontados, existe alto risco de adoecimento.

Sabe-se que o tempo de acompanhamento pode não ter sido suficiente nesse estudo. A hanseníase é uma doença de evolução lenta, de um modo geral levando de 5 a 7 anos para o desenvolvimento de sintomas. Portanto, em relação a hipótese inicialmente formulada de que alterações qualitativas ou quantitativas de biomarcadores em contatos de pacientes com hanseníase estivessem associadas à doença, foi relativamente confirmada.

Esses dados reforçam a importância de mais estudos de acompanhamento em contatos, afim de confirmar a utilização de biomarcadores tais como citocinas, quimiocinas, bem como fatores genéticos (polimorfismo no gene TLR4) como ferramentas diagnósticas complementares.

Dessa forma, a integração de métodos imunológicos e moleculares para detecção de infecção subclínica em contatos, torna-se relevante.

REFERÊNCIAS

- AARÃO, T.L.DE S. et al. Nerve Growth Factor and Pathogenesis of Leprosy: Review and Update. **Front. Immunol.**, v.9, n. 939, 2018.
- AARÃO, T.L.R. et al. Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy. **Microb. Pathog.**, v. 90, p. 64–68. 2016.
- AGNESE, D. M. et al. Human *toll-like receptor 4* mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 10, p. 1522-1525, nov. 2002.
- ALCAIS, A. et al. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current opinion in immunology**, v. 17, p. 44-48, 2005.
- AMBROSINO, E. et al. A multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies against 15 Plasmodium falciparum and Anopheles gambiae saliva antigens. **Malaria Journal**, v. 9, p. 317, 2010.
- AMORIM, F. M. et al. Identifying leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-NDO. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 9, 2016.
- ARANGO DUQUE, G.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 491, 2014.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no brasil. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 36, n. 3, p. 373-382, 2003.
- ARAÚJO, S. et al. Molecular evidence for the aerial route of infection of Mycobacterium leprae and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1412-1420, 2016.
- ARAÚJO, S. et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, supl.1, Rio de Janeiro, 2012.
- ARBOUR, N. C. et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nature genetics**, v. 25, n. 2, p. 187-191, 2000.
- ARRAES, M. L. B. M. et al. Natural environmental water sources in endemic regions of northeastern Brazil are potential reservoirs of viable Mycobacterium leprae. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 12, p. 805-811, 2017.
- BANERJEE, S. et al. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts – A pilot study from India. **BMC Infect Dis.**, v. 10, n. 1, p. 252, 2010.
- BARRETO, J.G., et al. Leprosy in Children. **Curr Infect Dis Rep.**, v.19, n.23, 2017.

BELGAUMKAR, V. A. et al. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. **Leprosy review**, v. 78, n. 3, p. 223-230, 2007.

BHAT, Ramesh Marne; PRAKASH, Chaitra. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2012, 2012.

BOCHUD, P.Y. et al. Polymorphisms in *Toll-like receptor 4* (TLR4) are associated with protection against leprosy. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 28, n. 9, p. 1055-1065, 2009.

BOCHUD, Pierre-Yves et al. *Toll-like receptor 2* (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 2, p. 253-261, 2008.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S460-S475, 2003.

BORKOW, G. et al. Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. **The Journal of clinical investigation**, v. 106, n. 8, p. 1053-1060, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças e Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Nota Técnica nº 16/2021**; Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. DATASUS. Informação em Saúde. Situação Epidemiológica. **Hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde; [s.n.]. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br>. Acesso em: 09 de abril de 2020.

BRASIL. DATASUS. Ministério da Saúde. **Hanseníase em Minas Gerais**. Dados preliminares.2018. Brasília. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/dhdat.exe?hanseniase/hantfmg18.def>. Acesso em: 09 de abril de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação-Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação. **Estratégia Nacional para o Enfrentamento da Hanseníase - 2019-2022**. 2019. [versão preliminar]. Brasília: Ministério da Saúde.: [s.n.]. Disponível em: <https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/27/Estrategia-Nacional-CGHDE-Consulta-Publica-27mar.pdf>. Acesso em: 09 de abril de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional** [recurso eletrônico].2016. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <http://biblioteca.cofen.gov.br/wp-content/uploads/2022/01/diretrizes-vigilancia-atencao-eliminacao-hanseniase.pdf>. Acesso em: 10 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Guia para o controle da hanseníase**. 2002. Caderno de atenção básica. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_controle_hanseníase_cab10.pdf. Acesso em: 09 maio 2020.

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 em Doenças Transmissíveis. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_integrado_acoes_estrategicas_hanseníase.pdf. Acesso em: 09 de maio de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional**.

Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 58 p. Disponível em:

http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/diretrizes_para_eliminacao_hanseníase_-_manual_-_3fev16_isbn_nucom_final_2.pdf. Acesso em: 09 de abril de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia prático sobre a hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 68 p. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseníase.pdf. Acesso em: 09 de abril de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase**. 2010. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Disponível em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseníase.pdf. Acesso em: 09 abr. 2020.

BRUCE, S. et al. Armadillo exposure and Hansen's disease: an epidemiologic survey in southern Texas. **Journal of the American academy of dermatology**, v. 43, n. 2, p. 223-228, 2000.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Leprosy review**, v. 78, p. 70-79, 2007.

CAMBRI, G.; MIRA, M. T. Genetic susceptibility to leprosy—From classic immune-related candidate genes to hypothesis-free, whole genome approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1674, 2018.

CARDONA-CASTRO, N. M. et al. Infection by *Mycobacterium leprae* of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post-elimination leprosy region of Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 703-707, 2005.

CARDOSO, C. C. et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 533-549, 2011.

CHATTERJEE, S.; NUTMAN, T. B. Helminth-induced immune regulation: implications for immune responses to tuberculosis. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 1, p. e1004582, 2015.

CHO, S.N. et al. 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.

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 347-357, 2014.

COOPER, P. J. et al. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 4, p. 1207-1213, 2000.

COSTA-SILVA, M. F. et al. Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. **Molecular immunology**, v. 57, n. 2, p. 74-85, 2014.

COUTO, L. D. et al. Neglected tropical diseases: prevalence and risk factors for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in a region of Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 6, p. 363-371, 2014.

DA MOTTA-PASSOS, I. et al. Decreased RNA expression of interleukin 17A in skin of leprosy. **European Journal of Dermatology**, v. 22, n. 4, p. 488-494, 2012.

DA SILVA, M. B. et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006532, 2018.

DE OLIVEIRA, L. B. P. **Identificação de parâmetros imunológicos, nutricionais e parasitológicos (*S. Mansoni*) em um estudo caso-controle associado à hanseníase**. 2020. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Programa multicêntrico de pós-graduação em bioquímica e biologia molecular – PMBQBM, Universidade Federal de Juiz de fora campus Governador Valadares, Governador Valadares, 2020.

DE SOUSA, J. R. et al. Leprosy as a complex infection: breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1635, 2017.

DE SOUZA, M. L. M. **Reconhecimento de padrões moleculares, clínicos e imunológicos para criação de algoritmo da suscetibilidade e evolução clínica da Hanseníase baseado em inteligência artificial**. 2021. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Programa multicêntrico de pós-graduação em bioquímica e biologia molecular – PMBQBM, Universidade Federal de Juiz de fora campus Governador Valadares, Governador Valadares, 2021.

DE SOUZA, V.N, et al. Advances in leprosy immunology and the field application: a gap to bridge. **Clinics in dermatology**, v. 34, n. 1, p. 82-95, 2016.

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

DESHMANE S.L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res.**, v. 29, n. 6, p 313-326, 2009.

DINIZ, L. M. et al. do intestinal nematodes increase the risk for multibacillary leprosy?. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 6, p. 852-854, 2001.

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

DUTHIE, M. S. et al. 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.

DUTHIE, M. S. et al. Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3267-3275, 2016.

FABRI, A.C.O.C. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

FINIASZ, M. R. et al. IL-9 promotes anti-Mycobacterium leprae cytotoxicity: involvement of IFN γ . **Clinical & Experimental Immunology**, v. 147, n. 1, p. 139-147, 2007.

FISCHER, S. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is a pathogenic component in a model for a hereditary peripheral neuropathy. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 37, n. 2, p. 359-366, 2008.

FONSECA, A. B. de L et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2017.

FROTA, C. C. et al. *Mycobacterium leprae* in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 209-213, 2012.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Fiocruz cria teste molecular para hanseníase inédito no Brasil**. Agência Fiocruz de Notícias, 2021. Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/noticia/fiocruz-cria-teste-molecular-para-hansenise-inedito-no-brasil>. Acesso em: 09 de abril de 2022.

GAMA, R. S. et al. A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007400, 2019.

GAMA, R. S. et al. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2018.

GAMA, R. S. et al. Prospects for new leprosy diagnostic tools, a narrative review considering ELISA and PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1-7, 2020.

GAMA, R.S. **Análise integrada de métodos moleculares e sorológicos para diagnóstico de Hanseníase e monitoramento de contatos domiciliares**. Juiz de Fora (MG), 2017. 120f. Tese de doutorado (Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora. 2017.

GARBIN, C. A. S. et al. The stigma and prejudice of leprosy: influence on the human condition. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 194-201, 2015.

GELUK, A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. **Expert opinion on medical diagnostics**, v. 7, n. 3, p. 265-274, 2013.

GELUK, A. et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 10, p. 4782-4791, 2012.

GOMIDES, T.A.R. **Monitoramento molecular de contatos domiciliares de indivíduos com hanseníase**. Governador Valadares (MG), 2014. 55f. Dissertação de mestrado (Programa de Mestrado em Ciências Biológicas: Imunologia) - Núcleo de Pesquisa em Imunologia, Universidade Vale do Rio Doce. 2014.

GOULART, I. M. B. et al. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 363-375, 2002.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of dermatological research**, v. 300, n. 6, p. 269-290, 2008.

GOVERNADOR VALADARES. Prefeitura Municipal. Secretaria Municipal de Saúde. Departamento de Atenção à Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Plano municipal de ação para enfrentamento da hanseníase. Governador Valadares: Prefeitura Municipal, 2021, 17p.

GRIFFITHS, W. J.; WANG, Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 7, p. 1882-1896, 2009.
GRIFFITHS, William J. et al. On the future of “omics”: lipidomics. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 34, n. 3, p. 583-592, 2011.

GUERREIRO, L. T. A. et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e64748, 2013.

GUERREIRO, R. et al. As quimiocinas e os seus receptores: Características e funções fisiológicas. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. 4, p. 967–976, 2011.

HASAN, Z. et al. Leprosy Patients with Lepromatous Disease Have an Up-regulated IL-8 Response That Is Unlinked to TNF-alpha responses. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases**, v. 72, p. 35-44, 2004.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation-concentration method in *schistosomiasis mansoni*. **PR J Publ Hlth Trop Med** 9: 283-298. 1934.

HONAP, T. P. et al. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006190, 2018.

IKEDA, A. et al. Progression of autoimmune hepatitis is mediated by IL-18-producing dendritic cells and hepatic CXCL9 expression in mice. **Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 224-236, 2014.

JOYCE, M. P. Historic aspects of human susceptibility to leprosy and the risk of conjugal transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 17-21, 2012.

KATZ, N. et al. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on *Toll-like receptors*. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, maio 2010.

KERKHOF, K. et al. Implementation and application of a multiplex assay to detect malaria-specific antibodies: a promising tool for assessing malaria transmission in Southeast Asian pre-elimination areas. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2015.

KERR L. et al. Interação homem-tatu no Ceará, Brasil: potencial de transmissão de *Mycobacterium leprae*. **Acta Trop.**, v. 152, p. 74-79, 2015.

KIRKALDY, A. A. et al. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 134, n. 3, p. 447–453, 2003.

KOHIDAI, I. Structure of chemokine families. 2006. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1278111>. Acesso em: 10 de agosto de 2020.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of *Toll-like receptors 2* and 1 in human leprosy. **Nature medicine**, v. 9, n. 5, p. 525-532, 2003.

KURTS, C. Th17 cells: a third subset of CD4+ T effector cells involved in organ-specific autoimmunity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 3, p. 816-819, 2008.

LAM, F. et al. VennDiagramWeb: a web application for the generation of highly customizable Venn and Euler diagrams. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2016.

LANA, Francisco Carlos Félix et al. Deformities due to leprosy in children under fifteen years old as an indicator of quality of the leprosy control programme in Brazilian municipalities. **Journal of tropical medicine**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

LASTÓRIA, J.C.; ABREU, M. A. M. M. de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects-part 1. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205-218, 2014.

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

LIBRATY, D. H. et al. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 2, p. 336-341, 1997.

LIMA SILVEIRA, E. et al. New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 4, p. 729-730, 2015.

LIMA, E. O. et al. Skin imprinting in silica plates: a potential diagnostic methodology for leprosy using high-resolution mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 7, p. 3585-3592, 2015.

LORENZ, E. et al. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. **Archives of internal medicine**, v. 162, n. 9, p. 1028-1032, 2002.

LUIZA-SILVA, M. et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 873-883, 2011.

LUMINEX CORPORATION. Description and operation of the luminex technology. Austin: Texas, USA; p. 20, 2012.

LUMINEX CORPORATION. **Fundamental assay techniques protein training (CN-0164-01)**. 2012. Disponível em: <http://www.cvent.com/events/luminex-learning-customer-education-event/eventssummary-2476c07b727540f6a1c1bdb34e400694.aspx>. 2012. Acesso em: 09 maio 2020.

LUMINEX CORPORATION. **xMap technology**. 2012. Disponível em: <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/#>. 2012_. Acesso em: 09 de maio de 2020.

LUSTER, A. D.; RAVETCH, J. V. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. 4, p. 1084–1097, 1 out. 1987.

LYON S., LYON-MOREIRA H. Marcadores Biológicos na Hanseníase. In: Lyon S., Grossi MAF. **Hanseníase**, Rio de Janeiro: Medbook; 2013.

LYON S.; GROSSI, M. A. Diagnóstico e Tratamento da Hanseníase. In: ALVES, E.D. **Hanseníase: AVANÇOS E DESAFIOS**. – Brasília: NESPROM, p.141-169, 2014.

MACIEL-FIUZA, M. F. et al. Evaluation of Polymorphisms in *Toll-Like Receptor* Genes as Biomarkers of the Response to Treatment of Erythema Nodosum Leprosum. **Frontiers in medicine**, v. 8, p. 713143, jan. 2022.

MADAN, N. K.; AGARWAL, K.; CHANDER, R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 371-382, 2011.

MADRI. Memoria del VI Congreso Internacional de Leprología. Memoria del VI Congreso Internacional de Leprologia. **Anais Madri: Asociacion Internacional de La Lepra**, 1953.

MAHAPATRA, S. et al. A metabolic biosignature of early response to anti-tuberculosis treatment. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2014.

MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH 17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.

MARÇAL, P. H. F. et al. Functional biomarker signatures of circulating T-cells and its association with distinct clinical status of leprosy patients and their respective household contacts. **Infectious diseases of poverty**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2020.

MARÇAL, P. H. F. et al. 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.

MARÇAL, P.H.F. **Reatividade sorológica e resposta de citocinas aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA em pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares de regiões endêmicas do Rio de Janeiro e Minas Gerais.** Juiz de Fora (MG), 2017. 104f. Tese de Doutorado (Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora. 2017.

MARQUES, C. S. et al. *Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection.* **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 1, p. 120-129, 2013.

MARTINEZ, A. N. et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2124-2130, 2009.

MARTINEZ, A. N. et al. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 4, p. e2655, 2014.

MARTINEZ, T. S. et al. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clinical microbiology and infection**, v. 17, n. 11, p. 1653-1658, 2011.

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

MARTINS, A. C. da C. et al. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 76, n. 5, p. 579-87, 2010.

MARTINS, M. V. S. B. et al. Pathogen-specific epitopes as epidemiological tools for defining the magnitude of *Mycobacterium leprae* transmission in areas endemic for leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 4, p. e1616, 2012.

MAZINI, P.S., et al. Gene Association with Leprosy: A Review of Published Data. **Front. Immunol.**, v.6, n.658, 2016.

MEANS, T. K. et al. Human *toll-like receptors* mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3920-3927, 1999.

MEDEIROS, M. F. et al. CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, v. 23, n. 3, p. 220-229, 2015.

MENDONÇA, V. A. et al. Differentiation of patients with leprosy from non-infected individuals by the chemokine eotaxin/CCL11. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 3, p. 547-550, 2007.

MIERAS, L. F. et al. An enhanced regimen as post-exposure chemoprophylaxis for leprosy: PEP++. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2018.

MILLER, S. I. et al. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 36-46, 2005.

MINAS GERAIS. **Boletim epidemiológico – Hanseníase em Minas Gerais**. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais Coordenação de Hanseníase. n. 1 v. 1. 2021. Disponível em: <https://www.saude.mg.gov.br/hanseniaase>. Acesso em: 08 de abril de 2022.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado da Saúde. **Plano de Enfrentamento da Hanseníase em Minas Gerais, 2019-2022**. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Coordenadoria Estadual de Controle da Hanseníase 2019, Belo Horizonte: UFMG, 2019.

MIRA, M. T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 4, p. 1124-1131, 2006.

MISCH, E. A. et al. Leprosy and the human genome. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 74, n. 4, p. 589-620, dez. 2010.

MODLIN, R. L. Innate immunity: ignored for decades, but not forgotten. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 882-886, 2012.

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

MODLIN, Robert L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 828-832, 1994.

MORAES, M. O. et al. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy review**, v. 77, n. 3, p. 189–202, set. 2006.

MOSER, B. et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends in immunology**, v. 25, n. 2, p. 75-84, 2004.

MUTHUSWAMY, R. et al. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. **Cancer research**, v. 68, n. 14, p. 5972-5978, 2008.

NATH, I. et al. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 90-98, 2015.

NORIEGA, L. F. et al. Leprosy: ancient disease remains a public health problem nowadays. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 4, p. 547-548, 2016.

OKTARIA, S. et al. Soil-transmitted helminth infections and leprosy: a cross-sectional study of the association between two major neglected tropical diseases in Indonesia. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2016.

OLIVEIRA, I. V. P. de M. et al. Armadillos and leprosy: from infection to biological model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 2019.

ONDIGO, B.N. et al. Standardization and validation of a cytometric bead assay to assess antibodies to multiple Plasmodium falciparum recombinant antigens. **Malaria journal**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2012.

PALERMO, M. L. et al. 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.

PALOMINO, D.C.T.; MARTI, L.C. Chemokines and immunity. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469-473, 2015.

parasitológicos (S. Mansonii) em um estudo caso-controle associado à hanseníase. 2020. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Programa multicêntrico de pós-graduação em bioquímica e biologia molecular – PMBQBM, Universidade Federal de Juiz de fora campus Governador Valadares, Governador Valadares, 2020.

PARK, J. S. et al. Interleukin-8 production in tuberculous pleurisy: role of mesothelial cells stimulated by cytokine network involving tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β . **Scandinavian journal of immunology**, v. 57, n. 5, p. 463-469, 2003.

PEDROSA, V.L. et al. Leprosy among schoolchildren in the Amazon region: A cross-sectional study of active search and possible source of infection by contact tracing. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006261, 2018.

PELLETIER, M. et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 115, n. 2, p. 335-343, 2010.

PENNA, M. L. F. et al. Anti-PGL-1 positivity as a risk marker for the development of leprosy among contacts of leprosy cases: systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004703, 2016.

PINHEIRO, R. O. et al. Innate immune responses in leprosy. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 518, 2018.

QIONG-HUA, P. et al. Early revelation of leprosy in China by sequential antibody analyses with LID-1 and PGL-I. **Journal of tropical medicine**, v. 2013, 2013.

QUEIRÓS, M. I. et al. Clinical and epidemiological profile of leprosy patients attended at Ceará, 2007-2011. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 3, p. 311-317, 2016.

QUEIROZ, E. A. et al. Immunological biomarkers of subclinical infection in household contacts of leprosy patients. **Immunobiology**, v. 224, n. 4, p. 518-525, 2019.

RESENDE, Samira D. et al. Modulation of allergic reactivity in humans is dependent on *Schistosoma mansoni* parasite burden, low levels of IL-33 or TNF- α and high levels of IL-10 in serum. **Frontiers in Immunology**, p. 3158, 2019.

RIDLEY, D.S., JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.**, v. 34, n. 3, p. 255–273, 1966.

ROMÃO, E. R.; MAZZONI, A. M. Perfil epidemiológico da hanseníase no município de Guarulhos, SP. **Rev Epidemiol Control Infect**, v. 3, n. 1, p. 22-27, 2013.

SADHU, S. et al. Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004338, 2016.

SADHU, S.; MITRA, D. K. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 604, 2018.

SAHINGUR, S. E.; YEUDALL, W. A. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 214, 2015.

SAINI, C. et al. A distinct double positive IL-17A+/F+ T helper 17 cells induced inflammation leads to IL17 producing neutrophils in Type 1 reaction of leprosy patients. **Cytokine**, v. 126, p. 154873, 2020.

SAINI, C. et al. Leprosy reactions show increased Th17 cell activity and reduced FOXP3+ Tregs with concomitant decrease in TGF- β and increase in IL-6. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004592, 2016.

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

SALDANHA, L.V.R. **IgM anti PGL-1 em casos e contatos de hanseníase em Governador Valadares: um estudo de acompanhamento.** Governador Valadares (MG), 2014. 76f. Dissertação de mestrado (Programa de Mestrado em Ciências Biológicas: Imunologia) - Núcleo de Pesquisa em Imunologia, Universidade Vale do Rio Doce. 2014.

SALES, A. M. et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e1013, 2011.

SALGAME, P. et al. Evidence for functional subsets of CD4+ and CD8+ T cells in human disease: lymphokine patterns in leprosy. **Chem Immunol**, v. 54, p. 44-59, 1992.

SAMPAIO, E. P. et al. Mycobacterium leprae-induced interferon- γ production by household contacts of leprosy patients: association with the development of active disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 5, p. 990-993, 1991.

SANDHIKA, W. et al. Detection of mycobacterium leprae in formalin-fixed paraffin-embedded sample by fite-faraco staining and polymerase chain reaction. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 231-236, 2016.

SANTANA, N. de L. et al. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 260-268, 2017.

SANTOS, M. B. et al. Distinct roles of Th17 and Th1 cells in inflammatory responses associated with the presentation of paucibacillary leprosy and leprosy reactions. **Scandinavian journal of immunology**, v. 86, n. 1, p. 40-49, 2017.

SARTORI, P. V. U. et al. Human genetic susceptibility of leprosy recurrence. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2020.

SAUER, M. E. D. et al. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. **Clinics in dermatology**, v. 33, n. 1, p. 99-107, 2015.

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

SILVEIRA-NUNES, G. et al. Hypertension is associated with intestinal microbiota Dysbiosis and inflammation in a Brazilian population. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 258, 2020.

SMIT, Martine J. et al. CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi-and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 1959-1965, 2003.

SMITH, C. S. et al. Multidrug therapy for leprosy: a game changer on the path to elimination. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. e293-e297, 2017.

SMITH, Cairns S. et al. Time to define leprosy elimination as zero leprosy transmission?. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 16, n. 4, p. 398-399, 2016.

SOUSA, A. L. O. M. et al. *Mycobacterium leprae* DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 5, p. 829-833, 2007.

STEFANI, M. M. et al. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC infectious diseases**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2009.

STEINMANN, P. et al. A comprehensive research agenda for zero leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2020.

STEINMANN, P. et al. Innovative tools and approaches to end the transmission of *Mycobacterium leprae*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. e298-e305, 2017.

SUZUKI, K. et al. Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. **The Journal of dermatology**, v. 39, n. 2, p. 121-129, 2012.

TEIXEIRA, C. S. S. et al. Incidence of and factors associated with leprosy among household contacts of patients with leprosy in Brazil. **JAMA dermatology**, v. 156, n. 6, p. 640-648, 2020.

TIÓ-COMA, M. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in soil: multiple needles in the haystack. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2019.

TROMBONE, A. P. et al. T helper cytokines expression in leprosy forms and reactional states: serum and in situ analysis. **The Journal of Immunology**. v. 188, n. 1, maio 2012.

TURANKAR, R.P. et al. Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples. **International journal of mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 54-59, 2015.

TWOREK, D. et al. MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) and I-TAC (CXCL11) concentrations after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. **Archives of medical science: AMS**, v. 9, n. 5, p. 849, 2013.

VAN GAGELDONK, P. G. M. et al. Development and validation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of serum antibodies to Bordetella pertussis, diphtheria and tetanus. **Journal of immunological methods**, v. 335, n. 1-2, p. 79-89, 2008.

VAN HOOIJ, A. et al. Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil, China and Ethiopia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17920, 18 2018.

VAN HOOIJ, A. et al. Household contacts of leprosy patients in endemic areas display a specific innate immunity profile. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1811, 2020.

VAN HOOIJ, A. et al. Quantitative lateral flow strip assays as user-friendly tools to detect biomarker profiles for leprosy. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

VÁZQUEZ, C. M. P. et al. Micronutrients influencing the immune response in leprosy. **Nutricion hospitalaria**, v. 29, n. 1, p. 26-36, 2014.

VIEIRA, M. C. A. et al. Leprosy in children under 15 years of age in Brazil: A systematic review of the literature. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 10, p. e0006788, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. WHO, Technical Report Series; 1982. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38984/1/WHO_TRS_675.pdf. Acesso em: 19 de agosto de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Expert Committee on Leprosy**. Sixth Report. WHO Technical Report Series; 1988. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37409/1/WHO_TRS_768.pdf. Acesso em: 19 de agosto de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Leprosy Strategy 2016–2020: accelerating towards a leprosy-free world**. Disponível em: <https://www.who.int/lep/resources/9789290225096/en/>. Acesso em: 05 de agosto de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy (Hansen disease) update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control. **Weekly Epidemiological Record**, Genebra, n. 36, p. 421-444, 10 set. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9636-421-444>. Acesso em: 03 abril. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Soil-transmitted helminths**. 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/>. Acesso em: 19 de agosto de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Weekly epidemiological record. **Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world**. Nova Deli: World Health Organisation. 2019. Disponível em: <http://www.who.int/wer>. Acesso em: 19 de agosto de 2019.

ANEXO A – Questionários



FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO Número de Identificação: _____

HANSENÍASE, PARASITOSE E DEFICIÊNCIA DE MICRONUTRIENTES

1. () Caso 2. () Contato Domiciliar 3. () Controle Negativo Data: ____/____/____
2. Data de nascimento: ____/____/____ 3. Idade (anos completos): _____
5. Gênero: 1. () Masculino 2. () Feminino
6. Cor da pele(etnia)
1. () branca 2. () preta 3. () amarela 4. () parda 5. () indígena 99. () Não respondeu/não soube informar
7. Município: _____ () Zona rural () Zona urbana ESF: _____
8. Endereço: _____ nº _____ Complemento: _____
9. Telefones: (____) ____ - _____ (residencial) (____) ____ - _____ (Celular)
11. Entrevistador: _____
12. Examinador: _____

AVALIAÇÃO DERMATONEUROLÓGICA

39. Presença de Lesões na Pele? 0. () Não 1. () Sim 2. Quantas _____
- 40a. Presença de Lesões foveolar? 0. () Não 1. () Sim 2. Quantas _____
- 40b. Características das Lesões:
1. Manchas hipocrômicas? 0. () Não 1. () Sim 2. Quantas _____ 3. () Ignorado
2. Áreas referidas hipo/anestésicas? 0. () Não 1. () Sim 2. Quantas _____ 3. () Ignorado
3. Placas (lesões planas > 1cm)? 0. () Não 1. () Sim 2. Quantas _____ 3. () Ignorado
4. Pápulas (pequenas elevações < 1cm) 0. () Não 1. () Sim 2. Quantas _____ 3. () Ignorado
5. Nódulos (lesões palpáveis > 1cm)? 0. () Não 1. () Sim 2. Quantas _____ 3. () Ignorado
6. Infiltrações difusas? 0. () Não 1. () Sim 2. Quantas _____ 3. () Ignorado
7. Espessamento Neural? 0. () Não 1. () Sim 2. Quantas _____ 3. () Ignorado 4. Local _____
41. Avaliação da face (Nariz):
1. Possui queixa? 0. () Não 1. () Sim Qual? _____
2. Ressecamento? 0. () Não 1. () Sim
3. Ferida? 0. () Não 1. () Sim
4. Perfuração do Septo? 0. () Não 1. () Sim
42. Avaliação da face (Olhos):
- Possui queixa? 0. () Não 1. () Sim Qual? _____
- | | Olho Direito | | Olho Esquerdo | |
|------------------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| Fecha os olhos s/ força (mm)? | 0. () Não | 1. () Sim | 0. () Não | 1. () Sim |
| Fecha olhos c/ força (mm)? | 0. () Não | 1. () Sim | 0. () Não | 1. () Sim |
| Triquiase (S/N) / Ectrópico (S/N)? | 0. () Não | 1. () Sim | 0. () Não | 1. () Sim |
| Dimin. sensib. córnea (S/N)? | 0. () Não | 1. () Sim | 0. () Não | 1. () Sim |
| Opacidade córnea (S/N)? | 0. () Não | 1. () Sim | 0. () Não | 1. () Sim |
| Acuidade visual? | () Normal | () Alterada | () Normal | () Alterada |

43. Força Membros Superiores (MSD= Membro Sup. Direito / MSE= Membro Sup. Esquerdo)

Abrir dedo mínimo - Abdução do 5º (dedo ulnar)

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado
Elevar o polegar- Abdução do polegar (nervo mediano)					
MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado
Elevar o punho - Extensão do punho (nervo radial)					
MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

44. Avaliação Sensitiva - Membros Superiores – Marcar com caneta, conforme avaliação com monofilamento

D	E	LEGENDA	CADA FILAMENTO CORRESPONDE A UM NÍVEL FUNCIONAL REPRESENTADO POR UMA COR
		Verde	0,05 g - sensibilidade normal na mão e no pé
		Azul	0,2 g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - dificuldade para discriminar textura (tato leve)
		Violeta	2,0 g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
		Vermelho (fechado)	4,0 g - perda da sensibilidade protetora na mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (marcar com x)	10 g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (circular)	300 g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
		Preto	- sem resposta - perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

45. Força Membros Inferiores (MID=Membro Inf. Direito / MIE=Membro Inf. Esquerdo)
Extensão do Há lux

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

Dorsiflexão do pé

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

46. Avaliação Sensitiva Membros Inferiores – Marcar com caneta, conforme avaliação com monofilamento

D	E	LEGENDA	CADA FILAMENTO CORRESPONDE A UM NÍVEL FUNCIONAL REPRESENTADO POR UMA COR
		Verde	0,05 g - sensibilidade normal na mão e no pé
		Azul	0,2 g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - dificuldade para discriminar textura (tato leve)
		Violeta	2,0 g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
		Vermelho (fechado)	4,0 g - perda da sensibilidade protetora na mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (marcar com x)	10 g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (circular)	300 g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
		Preto	- sem resposta - perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

47. Forma Clínica (Classificação de Madri)

1.() Indeterminada 2.() Tuberculóide 3.() Dimorfa 4.() Virchowiana 88.() Não se Aplica 77.() Não informado

48. Classificação Operacional baseado no exame clínico:

1.() Paucibacilar 2.() Multibacilar 88.() Não se Aplica 77.() Não informado

49. Grau de Incapacidade Física:

1.() Grau Zero 2.() Grau 1 3.() Grau 2 77.() Não se Aplica

50. Avaliação Concluída: 1.() Sim 0.() Não

Se não concluída, por quê? _____

Observações: _____

51. Classificação: 1.() Caso 2.() Contato Domiciliar 3.() Controle

HANSENÍASE, PARASITOSE E DEFICIÊNCIA DE MICRONUTRIENTES

1. () Caso 2. () Contato Domiciliar 3. () Controle Negativo Data: ___/___/___
2. Você já teve Hanseníase? 1. () Não 2. () Sim
3. Data de nascimento: ___/___/___ 4. Idade (anos completos): _____
5. Gênero: 1. () Masculino 2. () Feminino
6. Cor da pele(etnia)
1. () branca 2. () preta 3. () amarela 4. () parda 5. () indígena 99. () Não respondeu/não soube informar
7. Município: _____ () Zona rural () Zona urbana ESF: _____
8. Endereço: _____ nº _____ Complemento: _____
9. Telefones: (____) _____ - _____ (residencial) (____) _____ - _____ (Celular)
10. Há quanto tempo você mora neste município? 1. () < de 1 ano 2. () 1 a 5 anos 3. () > de 5 anos
11. Entrevistador: _____
12. Examinador: _____

CARACTERÍSTICAS SOCIOECONÔMICAS

13. Até que série o sr(a) estudou?
1. () Ensino superior 2. () Ensino médio 3. () Ensino Fundamental
4. () nunca estudou 88. () Não se aplica 99. () Não respondeu/Não soube informar
14. Qual seu estado civil?
1. () Solteiro(a) 2. () Casado(a)/União Estável 3. () Separado/ Divorciado(a)
4. () Viúvo(a) 99. () Não respondeu/ Não soube informar
15. Qual é sua ocupação / trabalho?
0. () Do lar 1. () Trabalhador rural 2. () Serviços domésticos 3. () Estudante
4. () Serviços de nível médio ou especializado (comércio, prefeitura, agente de saúde, técnico, professor)
5. () Aposentado ou Pensionista 6. () Desempregado 7. () Outros (autônomo) _____
88. () Não se aplica 99. () Não respondeu/ Não soube informar
16. No caso de aposentado, isto se deve a complicações relacionadas com a Hanseníase (pergunta para caso índice)?
1. () Não 2. () Sim 88. () Não se aplica 99. () Não respondeu/ Não soube informar
- 16a. Se sim, quais complicações?
1. () Fraqueza 2. () Deformidade 3. () Dormência 4. () Outros: _____
17. Qual a renda mensal familiar? (Salário Mínimo = R\$937,00)
1. () menor que 1 Salário Mínimo 2. () 1 a 3 Salários Mínimos
3. () entre 3 e 5 Salários Mínimos 4. () mais que 5 Salários Mínimos
99. () Não respondeu/ Não soube informar
18. Qual meio de transporte utilizado para ir ao serviço de saúde que você mais utiliza?
1. () Carro próprio 2. () Motocicleta
3. () Bicicleta 4. () Transporte público (ônibus, táxi)
5. () à Pé 6. () Outros: _____
- 18a. Quanto tempo em minutos você gasta para chegar ao serviço de saúde que utiliza com mais frequência: _____
- 18b. Quanto tempo, em média, demora para conseguir marcar uma consulta? _____
- 18c. (Perguntar apenas para Caso confirmado) Quanto tempo levou para a Hanseníase ser diagnosticada, considerando o aparecimento dos primeiros sintomas da doença? _____

RELAÇÃO FAMILIAR

19. Contando com você, quantas pessoas vivem na casa? _____

19a. Quem são as pessoas que moram com você, em sua casa? Registrar o nome completo e grau de parentesco das pessoas:

Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____
 Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____
 Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____
 Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____
 Nome: _____ Grau de Parentesco: _____ Idade: _____

88.() Não se aplica 99.() Não respondeu/ Não soube informar

20. Alguém na família já teve hanseníase (PASSADO)?

1.() Sim 0.() Não 99.() Não respondeu/ Não soube informar

21. E hoje, tem alguém que mora ou convive com você que tem hanseníase?

1.() Sim 0.() Não 88.() Não se aplica 99.() Não respondeu/ Não soube informar

22. Se sim, quantas?

1.() Uma 2.() Duas 3.() Três 4.() Quatro ou mais 88.() Não se aplica 99.() Não resp./Não soube informar

23. Qual(is) o(s) nome(s) da(s) pessoa(s) que mora(m) em sua casa ou convive(m) com você que tem hanseníase :

24. Qual o seu grau de parentesco com o(s) caso? _____

88.() Não se aplica

CONHECIMENTO SOBRE A HANSENÍASE

25. Você sabe como se pega a Hanseníase? 0.() Não 1.() Sim

26. Se sim, explique como se pega a Hanseníase: Pode assinalar mais de 1 opção

1.() pelo ar 2.() pelo contato 3.() por gotículas 4.() Outros _____

88.() Não se aplica 99.() Não respondeu/ Não soube informar

27. Você sabe quais são os sintomas da Hanseníase? 0.() Não 1.() Sim

27a. Se sim, quais são os sintomas da Hanseníase? Pode assinalar mais de 1 opção

1.() Manchas pelo corpo 2.() Dormência/perda de sensibilidade no local da mancha 3.() Nódulos
 4.() Ferida 5.() Deformidade em alguma parte do corpo 88.() Não se aplica

99.() Não respondeu/ Não soube informar

28. Número de Cicatrizes de BCG (verificar nos braços)

0.() Nenhuma cicatriz 1.() 1 cicatriz 2.() 2 Cicatrizes 3.() Não verificado 4.() Outros: _____

Caso marque nº 3: justificar o motivo: _____

INFECÇÕES PARASITÁRIAS

29. Você se lembra de alguma verminose que você teve no passado?

0.() Não 1.() Sim 88.() Não se aplica 99.() Não respondeu/ Não soube informar

29a. Se sim, você poderia apontar o possível verme? Pode assinalar mais de 1 opção 88.() Não se aplica

0.() Lombriga 1.() Schistose 2.() Amarelão 3.() Tenia 4.() Oxiurus 5.() Giardia

6.() Ameba 7.() Outros (especificar): _____ 99.() Não respondeu/ Não soube informar

30. Você já tomou remédio para verme? 0.() Não 1.() Sim 99.() Não respondeu/ Não soube informar

31. Qual é a sua fonte regular de água?

1.() Água encanada 2.() Lagoa, rio, córrego 3.() Água de chuva 4.() Poço, cisterna

5. Outros (especificar): _____ 99.() Não respondeu/ Não soube informar

32. Qual tipo de água você usa para beber?

1.() Água da torneira não filtrada 2.() Água da torneira filtrada 3.() Água da torneira fervida

4.() Água tratada com comprimidos 5.() Água Mineral 6.() Outros: _____

99.() Não respondeu/ Não soube informar

33. Qual tipo de água você usa para cozinhar?

- 1.() Água da torneira não filtrada 2.() Água da torneira filtrada 3.() Água da torneira fervida
 4.() Água tratada com comprimidos 5.() Água Mineral 6.() Outros: _____
 99.() Não respondeu/ Não soube informar

34. Como é o sistema de esgoto da sua casa? 1.() Esgoto encanado 2.() Esgoto sem encanamento

- 3.() Não há sistema de esgoto. 4.() Fossa. 5.() Outros (especificar): _____ 99.() Não respondeu/ Não soube informar

35. Você higieniza (lava) suas frutas e legumes antes de cozinhar e servir?

- 0.() Não 1.() Sim 99.() Não respondeu/ Não soube informar

36. Como você higieniza as verduras ?

- 1.() Lava as folhas em água da torneira 2.() Lava as folhas e mergulha no vinagre 3.() Não lavo
 4.() Lava as folhas e mergulha na água contendo cloro (água sanitária) 5.() Outro (especificar): _____
 99.() Não respondeu/ Não soube informar

37. Você tem o hábito de lavar as mãos antes das refeições?

- 1.() Sempre 2.() Às vezes 3.() Não lavo 99.() Não respondeu/ Não soube informar

38. Existe algum animal doméstico em sua casa?

- 0.() Não 1.() Sim 99.() Não respondeu/ Não soube informar

38a. Se sim, qual(is)? _____

39. Você realiza algum tipo de atividade de trabalho e/ou lazer em contato com água de rios, lagos, ribeirão, córregos, poços e ou outra fonte natural de água?

- 0.() Não 1.() Sim 99.() Não respondeu/ Não soube informar

39a. Se sim, que tipo de atividade? _____

ALIMENTAÇÃO**40. Você mudou sua alimentação ou dieta recentemente?**

- 0.() Não 1.() Sim, para perder peso 2.() Sim, virei vegetariano/reduzi o consumo de carne
 3.() Sim, para reduzir ingestão de sal 4.() Sim, para reduzir o colesterol 5.() Sim, para ganhar peso
 6.() Sim, por razões médicas 7.() Outro _____ 9.() Não soube informar

41. Com que frequência sua família compra comida?

- 1.() Frequentemente, mais do que uma vez por semana 2.() Uma vez por semana
 3.() Uma vez a cada 2 semanas 4.() Uma vez a cada 3 semanas
 5.() Menos do que uma vez a cada 3 semanas 8.() Recusou responder
 9.() Não soube informar

42. Considere a frase a seguir: "A comida que eu comprei não durou o tempo suficiente, e eu não tive dinheiro para comprar mais." Essa situação é verdadeira, ou seja, aconteceu com você ou sua família nos últimos 12 meses?

- 1.() Frequentemente aconteceu 2.() Às vezes aconteceu
 3.() Nunca aconteceu 8.() Recusou responder 9.() Não soube informar

43. Considere a frase a seguir: "(Eu/nós) não poderíamos nos dar ao luxo de comer refeições equilibradas." Essa situação é verdadeira, ou seja, aconteceu com você ou sua família nos últimos 12 meses?

- 1.() Frequentemente aconteceu 2.() Às vezes aconteceu
 3.() Nunca aconteceu 8.() Recusou responder 9.() Não soube informar

44. Nos últimos 12 meses, você (ou outros adultos em sua casa) já diminuíram suas refeições ou deixaram de fazer alguma refeição porque não havia dinheiro suficiente para a comida?

- 1.() Frequentemente aconteceu 2.() Às vezes aconteceu
 3.() Nunca aconteceu 8.() Recusou responder 9.() Não soube informar

45. Nos últimos 12 meses, você comeu menos do que gostaria porque não havia dinheiro suficiente?

- 0.() Não 1.() Sim 8.() Recusou responder 9.() Não soube informar

46. Nos últimos 12 meses, você teve fome, mas não comeu porque não havia dinheiro suficiente para comprar comida?

- 0.() Não 1.() Sim 8.() Recusou responder 9.() Não soube informar

AVALIAÇÃO DERMATONEUROLÓGICA

47. Presença de Lesões na Pele? 0.() Não 1.() Sim 2. Quantas _____
- 47a. Presença de Lesões foveolar? 0.() Não 1.() Sim 2. Quantas _____
- 47b. Características das Lesões:
- | | | | | | |
|---------------------------------------|-------|-------|------------------|-------|----------|
| 1. Manchas hipocrômicas? | 0.() | 1.() | 2. Quantas _____ | 3.() | Ignorado |
| 2. Áreas referidas hipo/anestésicas? | 0.() | 1.() | 2. Quantas _____ | 3.() | Ignorado |
| 3. Placas (lesões planas > 1cm)? | 0.() | 1.() | 2. Quantas _____ | 3.() | Ignorado |
| 4. Pápulas (pequenas elevações < 1cm) | 0.() | 1.() | 2. Quantas _____ | 3.() | Ignorado |
| 5. Nódulos (lesões palpáveis > 1cm)? | 0.() | 1.() | 2. Quantas _____ | 3.() | Ignorado |
| 6. Infiltrações difusas? | 0.() | 1.() | 2. Quantas _____ | 3.() | Ignorado |
| 7. Espessamento Neural? | 0.() | 1.() | 2. Quantas _____ | 3.() | Ignorado |
4. Local _____

48. Avaliação da face (Nariz):

- | | | | |
|-------------------------|-------|-------|-------------|
| 1. Possui queixa? | 0.() | 1.() | Qual? _____ |
| 2. Ressecamento? | 0.() | 1.() | |
| 3. Ferida? | 0.() | 1.() | |
| 4. Perfuração do Septo? | 0.() | 1.() | |

49. Avaliação da face (Olhos):

- | | | | |
|------------------------------------|-------|--------------|---------------|
| Possui queixa? | 0.() | 1.() | Qual? _____ |
| | | Olho Direito | Olho Esquerdo |
| Fecha os olhos s/ força (mm)? | 0.() | 1.() | 0.() |
| Fecha olhos c/ força (mm)? | 0.() | 1.() | 0.() |
| Triquiase (S/N) / Ectrópico (S/N)? | 0.() | 1.() | 0.() |
| Dimin. sensib. córnea (S/N)? | 0.() | 1.() | 0.() |
| Opacidade córnea (S/N)? | 0.() | 1.() | 0.() |
| Acuidade visual? | () | () | () |

50. Força Membros Superiores (MSD= Membro Sup. Direito / MSE= Membro Sup. Esquerdo)

Abrir dedo mínimo - Abdução do 5º (dedo ulnar)

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

Elevar o polegar- Abdução do polegar (nervo mediano)

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

Elevar o punho - Extensão do punho (nervo radial)

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

51. Avaliação Sensitiva - Membros Superiores – Marcar com caneta, conforme avaliação com monofilamento

D	E	LEGENDA	CADA FILAMENTO CORRESPONDE A UM NÍVEL FUNCIONAL REPRESENTADO POR UMA COR
		Verde ●	0,05 g - sensibilidade normal na mão e no pé
		Azul ●	0,2 g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - dificuldade para discriminar textura (tato leve)
		Violeta ●	2,0 g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
		Vermelho (fechado) ●	4,0 g - perda da sensibilidade protetora na mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (marcar com x) ⊗	10 g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (circular) ○	300 g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
		Preto ●	- sem resposta - perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

52. Força Membros Inferiores (MID=Membro Inf. Direito / MIE=Membro Inf. Esquerdo)

Extensão do Hálux

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

Dorsiflexão do pé

MSD			MSE		
() Forte	() Diminuída	() Paralisado	() Forte	() Diminuída	() Paralisado

53. Avaliação Sensitiva Membros Inferiores– Marcar com caneta, conforme avaliação com monofilamento

D	E	LEGENDA	CADA FILAMENTO CORRESPONDE A UM NÍVEL FUNCIONAL REPRESENTADO POR UMA COR
		Verde ●	0,05 g - sensibilidade normal na mão e no pé
		Azul ●	0,2 g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - dificuldade para discriminar textura (tato leve)
		Violeta ●	2,0 g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
		Vermelho (fechado) ●	4,0 g - perda da sensibilidade protetora na mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (marcar com x) ⊗	10 g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (circular) ○	300 g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
		Preto ●	- sem resposta - perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

54. Forma Clínica (Classificação de Madri)

1 () Indeterminada 2 () Tuberculóide 3 () Dimorfa 4 () Virchowiana 88 () Não se Aplica
77 () Não informado

55. Classificação Operacional baseado no exame clínico:

1 () Paucibacilar 2 () Multibacilar 88 () Não se Aplica 77 () Não informado

56. Grau de Incapacidade Física:

1 () Grau Zero 2 () Grau 1 3 () Grau 2 77 () Não se Aplica

57. Avaliação Concluída:

1 () Sim 0 () Não

Se não concluída, por quê? _____

Observações: _____

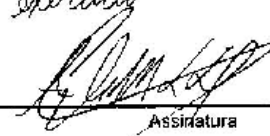
58. Classificação: 1. () Caso 2. () Contato Domiciliar 3. () Controle

ANEXO B – Termo de compromisso CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: HANSENIASE, PARASIToses E DEFICIÊNCIA DE MICRONUTRIENTES: NOVOS PARADIGMAS PARA COMBATER UMA DOENÇA ANTIGA			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 210			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas, Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Lucia Alves de Oliveira Fraga			
6. CPF: 219.806.408-53	7. Endereço (Rua, n.º): VEREADOR EUZEBINHO CABRAL, 110 CENTRO apto 202 GOVERNADOR VALADARES MINAS GERAIS 35010260		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: (33) 3225-4998	10. Outro Telefons:	11. Email: luciaalvesfraga@yahoo.com.br
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: <u>26</u> / <u>02</u> / <u>2016</u>		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Universidade Federal de Juiz de Fora UFJF	13. CNPJ:	14. Unidade/Orgão: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF	
15. Telefone: (32) 2102-3213	16. Outro Telefone:		
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável:	<u>Angelo Moraes Leite Ilanador</u> CPF: <u>034 833 596-21</u>		
Cargo/Função:	<u>Coordenador Acadêmico / Diretor em exercício</u>		
Data:	<u>26</u> / <u>02</u> / <u>16</u>		
		 Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			

ANEXO C – Estimativas de razão de chances considerando diferentes modelos de herança genética em relação aos SNPS rs4833095 (a), rs3804099 (b), rs1927914 (c) e rs17235416 (d) dos respectivos genes TLR1, TLR2, TLR4 E SLC11A1 analisados no presente estudo.

(a) Modelo	Genótipo	Caso	%	Controle	%	RC	<i>li</i>	<i>ls</i>	<i>p</i>
Codominância	C/C	19	38,8	12	34,3	1,00	-	-	0,72
	C/T	21	42,9	18	51,4	1,36	0,52	3,54	
	T/T	9	18,4	5	14,3	0,88	0,24	3,26	
Dominância	C/C	19	38,8	12	34,3	1,00	-	-	0,67
	C/T-T/T	30	61,2	23	65,7	1,21	0,49	3,00	
Recessividade	C/C-C/T	40	81,6	30	85,7	1,00	-	-	0,62
	T/T	9	18,4	5	14,3	0,74	0,23	2,44	
Sobredominância	C/C-T/T	28	57,1	17	48,6	1,00	-	-	0,44
	C/T	21	42,9	18	51,4	1,41	0,59	3,37	

(b) Modelo	Genótipo	Caso	%	Controle	%	RC	<i>li</i>	<i>ls</i>	<i>p</i>
Codominância	C/C	17	34,7	10	28,6	1,00	-	-	0,63
	C/T	20	40,8	18	51,4	1,53	0,56	4,19	
	T/T	12	24,5	7	20,0	0,99	0,29	3,35	
Dominância	C/C	17	34,7	10	28,6	1,00	-	-	0,55
	C/T-T/T	32	65,3	25	71,4	1,33	0,52	3,40	
Recessividade	C/C-C/T	37	75,5	28	80,0	1,00	-	-	0,63
	T/T	12	24,5	7	20,0	0,77	0,27	2,21	
Sobredominância	C/C-T/T	29	59,2	17	48,6	1,00	-	-	0,34
	C/T	20	40,8	18	51,4	1,54	0,64	3,68	

(c) Modelo	Genótipo	Caso	%	Controle	%	RC	<i>li</i>	<i>ls</i>	<i>p</i>
Codominância	G/G	11	22,4	16	45,7	1,00	-	-	0,06
	G/A	20	40,8	12	34,3	0,41	0,14	1,18	
	A/A	18	36,7	7	20,0	0,27	0,08	0,86	
Dominância	G/G	11	22,4	16	45,7	1,00	-	-	0,02
	G/A-A/A	38	77,6	19	54,3	0,34	0,13	0,88	
Recessividade	G/G-G/A	31	63,3	28	80,0	1,00	-	-	0,09
	A/A	18	36,7	7	20,0	0,43	0,16	1,18	
Sobredominância	G/G-A/A	29	59,2	23	65,7	1,00	-	-	0,54
	G/A	20	40,8	12	34,3	0,76	0,31	1,86	

(d) Modelo	Genótipo	Caso	%	Controle	%	RC	<i>li</i>	<i>ls</i>	<i>p</i>
Codominância	S/S	39	79,6	30	85,7	1,00	-	-	0,67
	S/s	9	18,4	4	11,4	0,58	0,16	2,06	
	s/s	1	2	1	2,9	1,3	0,08	21,64	
Dominância	S/S	39	79,6	30	85,7	1,00	-	-	0,47
	S/s-s/s	10	20,4	5	14,3	0,65	0,2	2,1	
Recessividade	S/s-s/s	48	98	34	97,1	1,00	-	-	0,81
	s/s	1	2	1	2,9	1,41	0,09	23,37	
Sobredominância	S/S-s/s	40	81,6	31	88,6	1,00	-	-	0,38
	S/s	9	18,4	4	11,4	0,57	0,16	2,04	

S = TGTG e s = del.

ANEXO D – Caracterização da amostra em razão das variáveis genéticas adotadas no estudo

Gene	SNP	Genótipo	Caso (77)		Contato (93)		Controle (68)		Total (238)	
			n	%	n	%	n	%	n	%
IL-10	rs1554286	A/A	9	11,7	12	12,9	10	14,7	31	13
		G/A	36	46,8	40	43	32	47,1	108	45,4
		G/G	32	41,6	41	44,1	26	38,2	99	41,6
IL-10	rs1800871	A/A	12	15,6	17	18,3	12	17,6	41	17,2
		A/G	38	49,4	38	40,9	32	47,1	108	45,4
		G/G	27	35,1	38	40,9	24	35,3	89	37,4
IL-10	rs1800872	G/G	28	36,4	38	40,9	23	33,8	89	37,4
		T/G	36	46,8	39	41,9	32	47,1	107	45
		T/T	13	16,9	16	17,2	13	19,1	42	17,6
IL-10	rs3024490	A/A	12	15,6	17	18,5	11	16,4	40	16,9
		A/C	38	49,4	38	41,3	33	49,2	109	46,2
		C/C	27	35,1	37	40,2	23	34,3	87	36,9
SLC11A1	rs17235416	del/del	1	1,3	0	0	1	1,5	2	0,8
		TGTG/del	13	16,9	17	18,3	9	13,2	39	16,4
		TGTG/TGTG	63	81,8	76	81,7	58	85,3	197	82,8
TLR1	rs4833095	C/C	26	33,8	25	26,9	23	33,8	74	31,1
		C/T	36	46,8	50	53,8	32	47,1	118	49,6
		T/T	15	19,5	18	19,4	13	19,1	46	19,3
TLR2	rs3804099	C/C	23	29,9	24	25,8	18	26,5	65	27,3
		C/T	36	46,8	54	58,1	36	52,9	126	52,9
		T/T	18	23,4	15	16,1	14	20,6	47	19,8
TLR4	rs4986790	A/A	71	92,2	87	93,5	68	100	226	95
		A/G	6	7,8	6	6,4	0	0	12	5
TLR4	rs1927914	A/A	18	23,4	27	29	28	41,2	73	30,7
		A/G	37	48	56	60,2	27	39,7	120	50,4
		G/G	22	28,6	10	10,8	13	19,1	45	18,9
TLR4	rs2149356	G/G	19	24,7	27	29	27	39,7	73	30,7
		G/T	36	46,8	56	60,2	28	41,2	120	50,4
		T/T	22	28,6	10	10,8	13	19,1	45	18,9
TLR4	rs2737190	A/A	18	23,4	27	29	28	41,2	73	30,7
		A/G	37	48	56	60,2	27	39,7	120	50,4
		G/G	22	28,6	10	10,8	13	19,1	45	18,9