



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR

ANA CAROLINE CUNHA MESSIAS

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS EXPOSIÇÃO CELULAR *in vitro*
COM OS ANTÍGENOS ML2478 E ML0840 DO *Mycobacterium leprae***

BELÉM-PA
2019

ANA CAROLINE CUNHA MESSIAS

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS EXPOSIÇÃO CELULAR *in vitro*
COM OS ANTÍGENOS ML2478 E ML0840 DO *Mycobacterium leprae***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado

BELÉM-PA
2019

ANA CAROLINE CUNHA MESSIAS

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS EXPOSIÇÃO CELULAR *in vitro*
COM OS ANTÍGENOS ML2478 E ML0840 DO *Mycobacterium leprae***

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Avaliador: Prof. Dr. Josafá Gonçalves Barreto
UFPA - Campus Castanhal

Avaliador: Prof. Dr. Moises Batista da Silva
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

BELÉM-PA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema
de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

M585a Messias, Ana Caroline Cunha
 Análise da produção de citocinas após exposição celular in
 vitro com os antígenos ML2478 e ML0840 do Mycobacterium
 leprae / Ana Caroline Cunha Messias. — 2019.
 50 f. : il. color.

 Orientador(a): Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado Dissertação
 (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
 Neurociências e Biologia celular, Instituto de Ciências
 Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

 1. Hanseníase. 2. Proteínas recombinantes. 3.
 Citocinas. I. Título.

CDD 571.6

AGRADECIMENTOS

A minha família. Mãe, paidastro, meus irmãos Jamilly e Wallace e a minha cunhada muito obrigada, amo vocês! Um agradecimento especial a caçula da família Jamilly que sempre faz o meu café quando estou cochilando em cima dos meus cadernos e livros.

Aos meus amigos José e Romilio por todas as vezes em que me ajudaram com passeios de bicicleta, piadas ruins, biscoito de limão e batata frita. Obrigada pelos abraços nos momentos tenebrosos.

A todos os indivíduos que voluntariamente aceitaram participar do estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Salgado, aos professores Dr. John Spencer, Dr. Josafá Barreto, Dr. Moises da Silva e Dra. Patrícia da Costa, as doutorandas Angélica Gobbo, Naila Cruz, Raquel Bouth e Sâmela da Silva, as mestrandas Erika Jorge e Letícia Souza, e a todos os alunos e técnicos do LDI.

Um agradecimento especial a futura mestranda Joyce Faro pela ajuda na realização dos ELISAs, e a Gisele Ribeiro pela paciência e pelo melhor café do laboratório, você é uma pessoa fundamental no LDI. Também agradeço a Aline Takahashi e a Sâmela da Silva pelas contribuições e correções no desenvolvimento do trabalho escrito.

As instituições e aos órgãos Colorado State University, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, Infectious Disease Research Institute, Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará, The Heiser Fund of the New York Community Trust, Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia e Universidade Federal do Pará pelo suporte e fomento para a realização do trabalho.

RESUMO

O diagnóstico de casos de hanseníase oligossintomáticos pode possibilitar a realização de intervenções antes do aparecimento de incapacidades físicas. No entanto, devido o diagnóstico ainda ser essencialmente clínico e a evolução lenta da patologia, há dificuldade no reconhecimento desses casos, pois as lesões são discretas e com sutis alterações de sensibilidade. Na maioria das vezes os pacientes são diagnosticados quando já apresentam características clínicas evidentes e/ou também incapacidades físicas. Assim se faz necessário o desenvolvimento de ferramentas laboratoriais que auxiliem no diagnóstico precoce da doença. O ensaio de imunidade celular *Whole Blood Assay* (WBA) é uma técnica de baixo custo e de fácil execução que proporciona condições para a triagem de antígenos, sendo favorecido em áreas onde a hanseníase é endêmica, podendo facilitar a incorporação de um teste em locais com menor acesso aos laboratórios sofisticados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune celular após exposição *in vitro* de sangue periférico aos antígenos ML2478 e ML0840 do *Mycobacterium leprae*. Foram selecionados 87 indivíduos para a quantificação das citocinas Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina (IL)-10, IL-17 e Fator de Transformação de Crescimento- β 1 após exposição com os antígenos de interesse, específicos do *M. leprae*, pelo WBA durante 24 horas. No total foram avaliados 47 casos de hanseníase distribuídos em: 6 tuberculoide e 14 dimorfo-tuberculoide (DT), 13 dimorfo-Virchowiano, 6 Virchowiano; e 8 escolares (ESC) diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo (casos oligossintomáticos nas formas clínicas: 1 primariamente neural, 1 indeterminada, 6 DT). Os demais 47 indivíduos correspondem a 20 contatos, 13 ESC saudáveis e a 7 indivíduos com outras doenças dermatológicas. A análise das citocinas sugere que o balanço entre IFN- γ e IL-10 pode indicar indivíduos que estão progredindo ao polo Th2 e que IL-17 e TGF- β 1 podem ser utilizadas para acompanhar indivíduos que apresentem resposta semelhante aos casos de hanseníase. A produção das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-17 e TGF- β 1 pelo estímulo com as proteínas ML2478 e ML0840 não diferiu entre os escolares casos e escolares saudáveis. E a citocina IL-17 demonstrou produção superior nos casos atendidos na URE em relação aos escolares caso e aos indivíduos dos grupos controles.

Palavras-chave: Hanseníase. Proteínas recombinantes. Citocinas.

ABSTRACT

Diagnosis of oligosymptomatic leprosy cases may enable interventions to be performed before the onset of physical disabilities. However, because the diagnosis is still essentially clinical and the disease progresses slowly, there is difficulty in recognizing these cases, since the lesions are discrete and with subtle changes in sensitivity. Most of the time patients are diagnosed when they already have obvious clinical characteristics and/or physical disabilities. Thus, it is necessary to develop laboratory tools that help in the early diagnosis of the disease. The cell immunity assay Whole Blood Assay (WBA) is a low-cost, easy-to-perform technique that provides conditions for antigen screening and is favored in areas where leprosy is endemic and may facilitate incorporation of a test into sites with less access to sophisticated laboratories. The objective of this study was to evaluate the cellular immune response after *in vitro* exposure of peripheral blood to *Mycobacterium leprae* antigens ML2478 and ML0840. Eighty-seven individuals were selected for quantitation of the cytokines of Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin (IL)-10, IL-17 and Transforming Growth Factor- β 1 after exposure with specific *M. leprae* antigens by WBA for 24 hours. A total of 47 leprosy cases were evaluated distributed in: 6 tuberculoid and 14 borderline tuberculoid, 13 borderline lepromatous leprosy, 6 lepromatous leprosy; and 8 schoolchildren diagnosed with leprosy during the group active search strategy (oligosymptomatic cases in the clinical forms: 1 primary neural, 1 undetermined, 6 borderline tuberculoid). The remaining 47 individuals corresponded to 20 contacts, 13 healthy schoolchildren and 7 individuals with other skin diseases. The analysis of cytokines suggests the balance between IFN- γ and IL-10 may indicate individuals who are progressing to the Th2 pole. IL-17 and TGF- β 1 may be used to follow-up individuals with similar response to leprosy cases. The production of IFN- γ , IL-10, IL-17 and TGF- β 1 cytokines by stimulation with proteins ML2478 and ML0840 did not differ between healthy students and case students. And the cytokine IL-17 demonstrated higher production in cases attended at URE than in case students and individuals in control groups.

Keywords: Leprosy. Recombinant proteins. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELA

Figura 1 - Detecção do <i>Mycobacterium leprae</i> por baciloscopia.....	6
Figura 2 - Amplo espectro clínico da hanseníase.....	8
Figura 3 - Distribuição global do número de casos novos diagnosticados no ano de 2018.....	12
Figura 4 - Ensaio do <i>Whole Blood Assay</i>	20
Figura 5 - Modelo do <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> para a quantificação das citocinas.....	20
Figura 6 - Distribuição dos indivíduos selecionados em cada grupo.....	22
Figura 7 - Comparação da produção de IFN- γ em indivíduos com hanseníase e CT.....	25
Figura 8 - Comparação da produção de IFN- γ em indivíduos com hanseníase e ESC sadio.....	26
Figura 9 - Comparação da produção de IFN- γ em indivíduos com hanseníase e ODD.....	27
Figura 10 - Comparação da produção de IL-10 em indivíduos com hanseníase e CT.....	28
Figura 11 - Comparação da produção de IL-10 em indivíduos com hanseníase e ESC sadio.....	29
Figura 12 - Comparação da produção de IL-10 em indivíduos com hanseníase e ODD.....	30

Figura 13 - Comparação da produção de IL-17 em indivíduos com hanseníase e CT.....	31
Figura 14 - Comparação da produção de IL-17 em indivíduos com hanseníase e ESC sadio.....	32
Figura 15 - Comparação da produção de IL-17 em indivíduos com hanseníase e ODD.....	33
Figura 16 - Comparação da produção de TGF- β 1 em indivíduos com hanseníase e CT.....	34
Figura 17 - Comparação da produção de TGF- β 1 em indivíduos com hanseníase e ESC sadio.....	35
Figura 18 - Comparação da produção de TGF- β 1 em indivíduos com hanseníase e ODD.....	36
Figura 19 - Curva ROC para o a produção de IFN- γ pelo estímulo das proteínas ML2478 e ML0840 entre os casos de hanseníase e CT.....	37
Quadro 1 - Esquemas terapêuticos da poliquimioterapia de acordo com a classificação operacional.....	11
Quadro 2 - Grupos de estudo.....	17
Tabela1 - Características dos grupos analisados no estudo.....	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1.	Hanseníase e suas manifestações clínicas	6
1.1.	Resposta Imune	8
1.1.	Tratamento	10
1.1.	Epidemiologia	11
1.1.	Testes imunológicos	13
2	OBJETIVOS	16
2.1.	Geral	16
2.2.	Específicos	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1.	População de estudo	17
3.2.	Quantificação dos anticorpos IgM anti-PGL-I	18
3.3.	<i>Whole Blood Assay</i>	19
3.4.	Quantificação das citocinas	20
3.5.	Análises estatísticas	21
4	RESULTADOS E DISCURSSÃO	22
1.1.	Produção de IFN- γ	24
1.1.	Produção de IL-10	27
1.1.	Produção de IL-17	30
1.1.	Produção de TGF- β 1	33
1.1.	Discriminação entre indivíduos com hanseníase e CT	36
5	CONCLUSÕES	39

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA VOLUNTÁRIOS COM IDADE IGUAL OU SUPERIOR A 18 ANOS.....	46
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA VOLUNTÁRIOS COM IDADE INFERIOR A 18 ANOS.....	47
ANEXO - PARECE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ.....	48

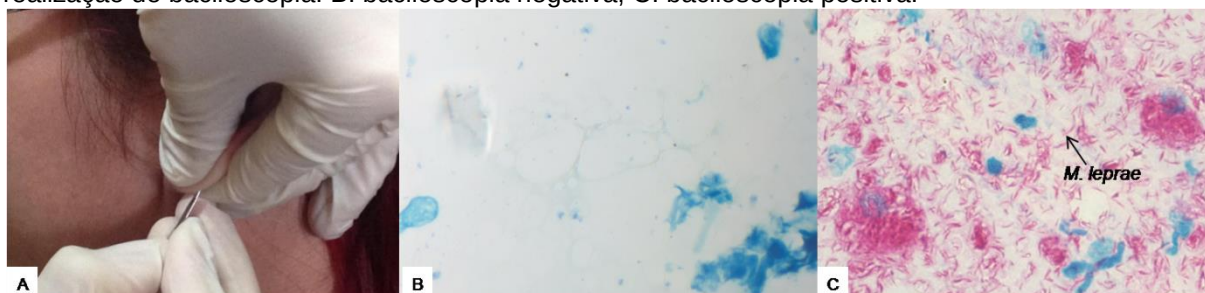
1. INTRODUÇÃO

1.1. Hanseníase e suas manifestações clínicas

A hanseníase é uma doença neurodermatológica infecciosa crônica, caracterizada pelo comprometimento dos nervos periféricos com alterações sensitivas, motoras e/ou autonômicas e por manchas hipocrômicas, eritematosas ou nódulos infiltrados na pele com alteração de sensibilidade tátil, térmica e/ ou dolorosa (BRASIL, 2016; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

O diagnóstico dessa patologia é essencialmente clínico, com base no comprometimento dos nervos periféricos, na presença de lesões na pele com alteração de sensibilidade; e quando disponível, na detecção do seu principal agente etiológico, o *Mycobacterium leprae*, bacilo álcool ácido resistente, em raspado intradérmico (baciloscopia) (Figura1) ou em biópsia cutânea ou de nervo periférico sensitivo (histopatologia) (BRASIL, 2016; PINHEIRO et al., 2011).

Figura 1 - Detecção do *Mycobacterium leprae* por baciloscopia. A: raspado intradérmico para realização de baciloscopia. B: baciloscopia negativa; C: baciloscopia positiva.



Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/UEPA/MC.

A maioria da população apresenta imunidade natural ao *M. leprae*, dessa forma, algumas pessoas quando entram em contato com a bactéria não adoecem, evidenciando um importante papel da resposta imune do hospedeiro na progressão e no controle da doença, a qual possui evolução lenta com o período de incubação do agente variando de 2 a 20 anos ou mais (BRASIL, 2017; WHO, 2018).

A transmissão da hanseníase ocorre através das vias respiratórias superiores mediante contato de indivíduos susceptíveis com doentes. Quanto mais íntimo e prolongado for o contato de um indivíduo suscetível com um doente que não está em tratamento maior é a probabilidade de transmissão e contágio. Além

disso, devido a susceptibilidade ao *M. leprae* ter influência genética, os familiares de pessoas com hanseníase têm maior chance de adoecer (BAKKER et al., 2004; BRASIL, 2017).

É observado na hanseníase um amplo espectro de manifestações clínicas que estão relacionadas com a resposta imune do hospedeiro (NATH; SAINI; VALLURI, 2015). Nesse âmbito, os pacientes são classificados de acordo com a classificação de Madri (1953) ou de Ridley e Jopling (1966) segundo critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos, havendo uma forma inicial, que já apresenta alterações de sensibilidade na pele, denominada indeterminada (I) que pode evoluir para 5 grupos: tuberculoide (TT), dimorfo-tuberculoide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-Virchowiano (DV) e Virchowiano (VV) (Figura 2).

Em 2008, o *M. lepromatosis* foi descrito como outro agente etiológico para hanseníase, sendo responsável por uma forma clínica VV difusa (hanseníase difusa de Lucio ou Latapi) predominantemente observada em pacientes no México ocidental e no Caribe. Essa manifestação clínica foi descrita inicialmente por Lucio e Alvarado em 1852 e por Latapi e Chevez-Zamora em 1948, ambos no México (HAN et al., 2008, 2012), sendo caracterizada por invasão e proliferação do patógeno no endotélio com oclusão vascular e/ou vasculite, infiltração cutânea difusa não modular e sem formação de placas e lesões cutâneas que frequentemente em um estágio avançado podem ulcerar, o que é denominado fenômeno de Lucio, facilitando o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias e sepse (REA; JERSKEY, 2005; VARGAS-OCAMPO, 2007).

Para fins operacionais de tratamento a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os pacientes de acordo com o número de lesões na pele e/ou presença de bacilos no raspado intradérmico, dividindo os pacientes I e TT em paucibacilares (PB) e os pacientes DT, DD, DV e VV em multibacilares (MB), onde os PB apresentam até cinco lesões e baciloscopia negativa, e os MB presença de seis ou mais lesões na pele e/ ou baciloscopia positiva (BRASIL, 2017; WHO, 1998).

Alguns pacientes no momento do diagnóstico podem não apresentar manifestações cutâneas, mas apenas nos nervos, sendo classificados como

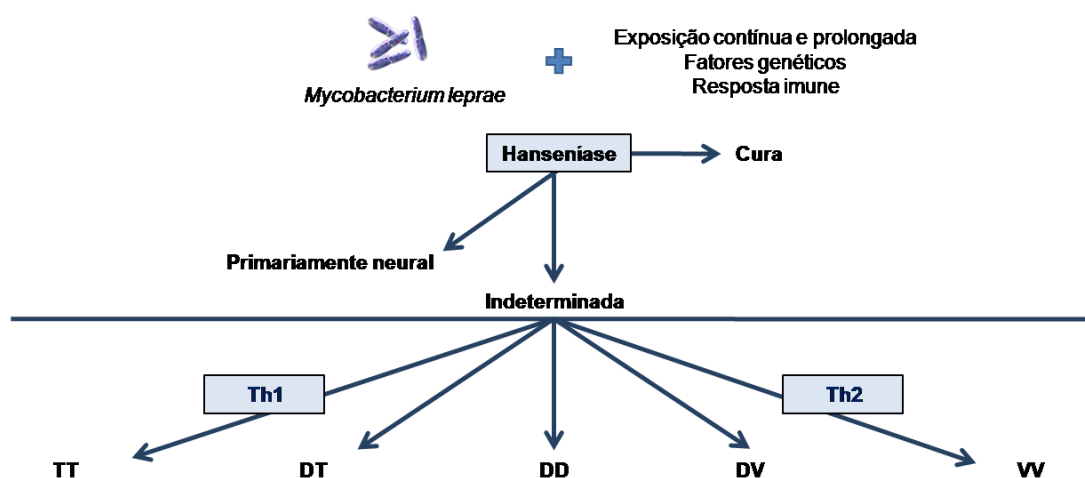
primariamente neural (NP), caracterizados pelo envolvimento assimétrico dos nervos periféricos, podendo apresentar-se como anestesia e/ou alteração na força muscular. A classificação de um caso NP em PB ou MB depende de fatores neurológicos, imunológicos e histopatológicos (BRASIL, 2017; FONSECA et al., 2017).

1.2. Resposta imune

A patogênese pelas micobactérias, que possuem forma de bacilos e são intracelulares obrigatórias, envolve a exploração das vias de sinalização das células do hospedeiro visando melhorar a sobrevivência intracelular e a persistência do patógeno. Alguns dos mecanismos que as micobactérias patogênicas utilizam para sobreviver são: a atenuação da maturação fagossômica (CASANOVA; ABEL, 2002; KOUL et al., 2004); modificação da resposta apoptótica (SALGADO et al., 2018) do hospedeiro e regulação da resposta imune mediada por células através de fatores de transcrição (UPADHYAY et al., 2019).

Os perfis patológicos observados nas formas clínicas da hanseníase tem relação com o padrão de resposta imune predominante em cada indivíduo frente ao *M. leprae*. Assim, de acordo com interação entre o patógeno e o hospedeiro há 2 formas polares (TT e VV) imunologicamente estáveis e 3 formas intermediárias (DT, DD e DV) instáveis (RIDLEY; JOPLING, 1966) (Figura 2).

Figura 2 - Ampla espectro clínico da hanseníase.



Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/UEPA/MC. TT: tuberculoide; DT:dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano. Th1: linfócitos T auxiliares 1; Th2: linfócitos T auxiliares 2.

A resposta imune celular é mediada principalmente pelos linfócitos T (LT CD4⁺ e LT CD8⁺) em colaboração com as células da resposta imune inata. Os LT CD4⁺ ou LT auxiliares (Th) ao serem ativados e diferenciados em distintos subtipos efetores, entre eles o Th1, o Th2 e o Th17, desempenham um papel importante na resposta do hospedeiro através da: secreção de citocinas, moléculas mediadoras de sinais estimulatórios, modulatórios ou inibitórios para diferentes células do sistema imune; ativação de fatores de transcrição específicos, proteínas que estimulam a transcrição de um determinado gene específico, por exemplo, o fator de transcrição T-bet para Th1, o GATA-3 para Th2 e o ROR γ t para Th17; e alterações epigenéticas, modificações no genoma que são transmitidas de uma geração celular para a outra, as quais podem alterar a expressão gênica, mas sem alterações na sequência primária do ácido desoxirribonucleico (LAMBERT et al., 2018; LUCKHEERAM et al., 2012; TANIUCHI, 2018).

A resistência ao *M. leprae* está associada ao perfil de resposta Th1, que confere proteção contra os agentes patogênicos intracelulares (CARUSO et al., 1999; DOCKRELL et al., 2000).

Os pacientes do polo TT apresentam imunidade celular com a predominância de células Th1 (MODLIN, 1994) que se caracterizam pela secreção das citocinas Interferon- γ (IFN- γ), Interleucina (IL)-2, IL-15 e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) que contribuem para a formação de granulomas, diminuição do número de bacilos e conseqüentemente menor quantidade de lesões cutâneas (DE SOUSA; SOTTO; QUARESMA, 2017; JORGE et al., 2017; SINSIMER et al., 2010). A diminuição da carga bacilar ocorre devido a produção de TNF- α e IFN- γ ativar macrófagos com fenótipo M1 e induzir a produção de enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que destroem o bacilo através da liberação de radicais livres (DE SOUSA; SOTTO; QUARESMA, 2017). Nas lesões do polo TT, os macrófagos ativados possuem aparência similar a das células epiteliais e há predominância de LT CD4⁺ (FONSECA et al., 2017).

Em contraste, pacientes do polo VV apresentam resposta imune caracterizada por células T do subtipo Th2 (MODLIN, 1994) com a secreção das citocinas IL-4 e IL-10, que são anti-inflamatórias e pela produção elevada de

anticorpos os quais não são capazes de conferir proteção ao *M. leprae* e seus antígenos, além da formação de imunocomplexos, consequentemente os pacientes desse polo possuem baixa imunidade celular, ausência de granulomas, elevada carga bacilar e várias lesões na pele (DE SOUSA; SOTTO; QUARESMA, 2017; JORGE et al., 2017; SINSIMER et al., 2010). Em relação as lesões do polo VV, há deficiência de LT CD4⁺ e elevado número de LT CD8⁺, os macrófagos infectados com muitas bactérias apresentam aparência "espumosa" (*foam cells*) (FONSECA et al., 2017).

Os perfis de linfócitos Th1 e Th2 não explicam completamente a resposta do hospedeiro frente ao *M. leprae* (DE SOUSA; SOTTO; QUARESMA, 2017). As formas DT, DD e DV apesar de serem classificadas operacionalmente como MB são imunologicamente dinâmicas (FONSECA et al., 2017). As células T do subtipo Th17 podem constituir um terceiro grupo na hanseníase, podendo ser uma via alternativa para os pacientes incapazes de montar uma resposta Th1 ou Th2 ou nos quais ainda não houve a definição de um polo. Além disso, esse subtipo de células vêm demonstrando apresentar uma função protetora contra a infecção pelo *M. leprae* devido potencializar a produção de IFN- γ , sendo mais frequente nas formas TT e DT (SAINI; RAMESH; NATH, 2013).

Há evidências de que a combinação das respostas Th1 e Th17 exercem um efeito protetor durante a infecção pelo *M. leprae* e orientam o desenvolvimento das formas PB. No entanto, são necessários estudos que busquem esclarecer os mecanismos moleculares e genéticos envolvidos na regulação das células Th17 na hanseníase (SANTOS et al., 2017).

As células T regulatórias, também demonstram desempenhar funções importantes na determinação imunológica, pois células T regulatórias que secretam a citocina Fator de Transformação de Crescimento β (TGF- β) podem suprimir os LT efetores e estão elevadas em pacientes VV, o que pode ter relação com a anergia (não responsividade) observada nos pacientes com essa forma clínica (SADHU et al., 2016).

Durante a evolução da doença, devido ao tropismo do *M. leprae* pelas células de Schwann, mielinizantes e não mielinizantes (JIN; AN; LEE, 2017), e

macrófagos pode ocorrer o desenvolvimento de incapacidades físicas (deficiências e deformidades) graves, como lagofalmo (incapacidade de fechar os olhos), garras (dedos das mãos e/ou pés curvados ou dobrados) e reabsorção óssea (degeneração ou necrose óssea), se o paciente não for corretamente diagnosticado e adequadamente tratado com a poliquimioterapia (PQT) (WALKER; LOCKWOOD, 2006).

1.3. Tratamento

Os pacientes com hanseníase realizam tratamento com a PQT de acordo com a sua classificação operacional (Quadro 1). Esse esquema terapêutico foi implementado em 1982 pela OMS consistindo na administração de clofazimina, dapsona e rifampicina (WHO, 1982). O tratamento deve ser iniciado no momento do diagnóstico, se não houver contraindicações como: alergia à sulfa ou à rifampicina (BRASIL, 2017).

Quadro 1 - Esquemas terapêuticos da poliquimioterapia de acordo com a classificação operacional.

Classificação Operacional (1)	Adulto	Criança
PB	RFM dose mensal de 600mg com administração supervisionada. DDS dose mensal de 100mg supervisionada e dose diária de 100mg autoadministrada.	RFM dose mensal de 450mg com administração supervisionada. DDS dose mensal de 50mg supervisionada e dose diária de 50mg autoadministrada.
MB	RFM dose mensal de 600mg com administração supervisionada. DDS dose mensal de 100mg supervisionada e dose diária de 100mg autoadministrada. CFZ dose mensal de 300mg com administração supervisionada e dose diária de 50mg autoadministrada.	RFM dose mensal de 450mg com administração supervisionada. DDS dose mensal de 50mg supervisionada e dose diária de 50mg autoadministrada. CFZ dose mensal de 150mg com administração supervisionada e dose de 50mg autoadministrada em dias alternados.

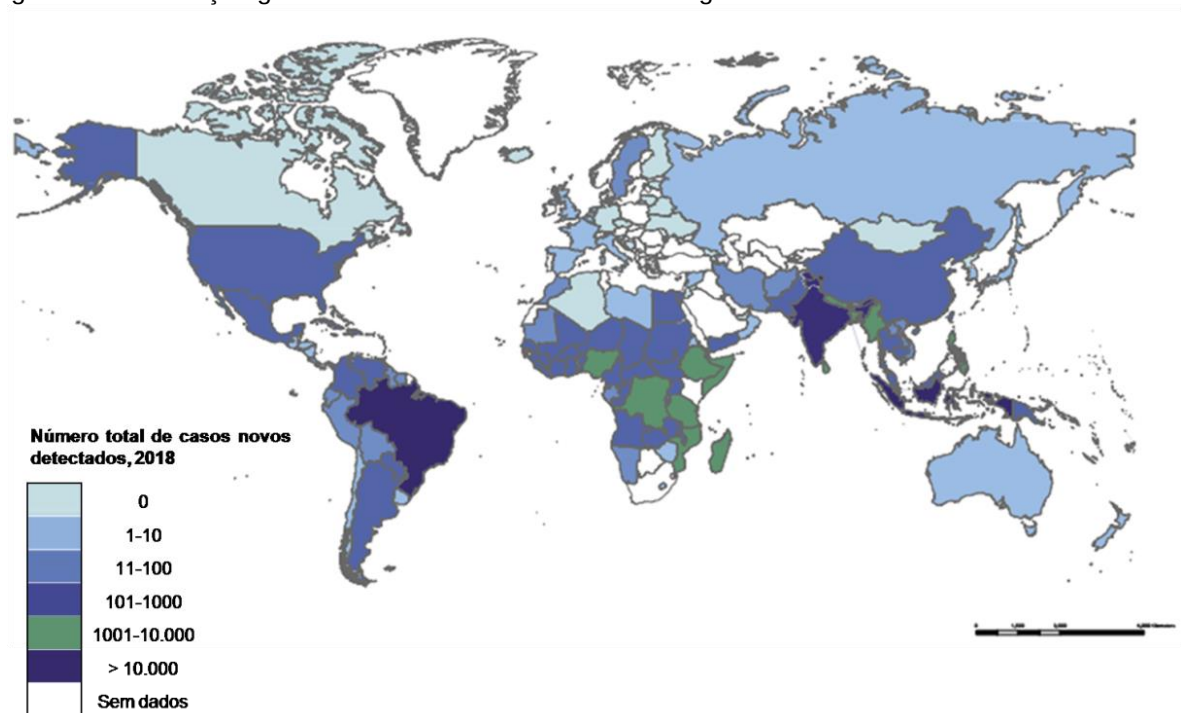
Fonte: adaptado de Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis (2016). (1) De acordo com a Organização Mundial da Saúde (1982). PB: paucibacilar; MB: multibacilar; RFM: rifampicina; DDS: dapsona; CFZ: clofazimina.

Apesar da implantação do tratamento com PQT na década de 1980 ter contribuído para a diminuição da prevalência da doença, as taxas de detecção de casos novos ainda permanecem altas, indicando que a interrupção da transmissão do *M. leprae* não será atingida apenas com o tratamento dos pacientes (PINHEIRO et al., 2011). Além disso, casos de resistência a um ou mais medicamentos utilizados vêm sendo observados (BENJAK, 2018; WHO, 2018) e há outros fatores que podem estar associados a manutenção da hanseníase, entre eles as condições socioeconômicas (HOUWELING et al., 2016; KERR-PONTES et al., 2006).

1.4. Epidemiologia

No ano de 2018 foram reportados 208.619 casos novos de hanseníase no mundo (taxa de detecção de 2,74/100.000 habitantes), dos quais 130.169 foram diagnosticados nas formas MB, 11.323 apresentaram grau de incapacidade (GI) 2 e 16.013 dos diagnósticos são em crianças, das quais 350 possuem GI 2. Entre os casos globais, 30.957 estão localizados na América (taxa de detecção de 3,08/100.000 habitantes). O Brasil apresentou 28.660 casos novos detectados (taxa de detecção de 13,68/100.000 habitantes), sendo o 2º país com o maior número de casos novos reportados, atrás apenas da Índia com 120.334 casos novos (Figura 3). Dos casos diagnosticados no país, 22.127 correspondem as formas MB, 2.109 apresentaram GI 2 e 1.705 são crianças com 39 delas apresentando GI 2 (WHO, 2019).

Figura 3 - Distribuição global do número de casos novos diagnosticados no ano de 2018.



Fonte: adaptado de WHO (2019).

Em 2017, a Região Norte apresentou 5.169 casos novos de hanseníase (taxa de detecção de 28,82/100.000 habitantes) e o estado do Pará 2.598 casos novos (taxa de detecção de 31,05/ 100.000 habitantes), sendo caracterizado epidemiologicamente como uma área de muito alta endemia de acordo com o banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação da Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (BRASIL, 2018). Dos casos reportados no estado 1.904 correspondem as formas MB, 192 apresentam com GI 2 e 229 são casos em crianças e adolescentes com menos de 15 anos.

1.5. Testes imunológicos

O diagnóstico de casos oligossintomáticos, formas iniciais da doença, possibilita a realização de intervenções antes do aparecimento de incapacidades físicas. Como o diagnóstico é essencialmente clínico e a evolução da doença é lenta, há dificuldade no reconhecimento dos casos oligossintomáticos, pois as lesões são discretas e com sutis alterações de sensibilidade. Dessa forma, comumente os pacientes são diagnosticados somente quando apresentam características clínicas evidentes e/ou apresentando incapacidades físicas, o que reforça a importância do

desenvolvimento de ferramentas laboratoriais que auxiliem no diagnóstico precoce (GELUK, 2013).

O teste de intradermoreação de Mitsuda consiste em um teste baseado na injeção intradérmica do *M. leprae* atenuado, antígeno de Mitsuda, para verificar a capacidade de um indivíduo elaborar uma resposta imune celular eficiente através da formação de granuloma com diâmetro igual ou superior a 5 mm em até 28 dias. A reação geralmente é positiva (granuloma com diâmetro ≥ 5 mm) em indivíduos PB e negativa (granuloma ausente ou com diâmetro < 5 mm) em indivíduos MB. Assim, o ensaio possui baixa especificidade para hanseníase e pode gerar resultados falso-positivos em áreas endêmicas para hanseníase e tuberculose, cujo o agente etiológico é o *M. tuberculosis*, através de reações cruzadas (GELUK et al., 2012a; PINHEIRO et al., 2011).

Moléculas antigênicas vem sendo identificadas como possíveis biomarcadores para o diagnóstico de casos oligossintomáticos em testes de imunidade celular e/ou humoral (DOCKRELL et al., 2000; GELUK et al., 2008). Uma delas é o antígeno Leprosy IDRI diagnostic 1, molécula sintética resultante da fusão entre as proteínas ML0405 e ML2331 (DUTHIE et al., 2007), as quais demonstraram estimular respostas celular e humoral específicas para *M. leprae* (DUTHIE et al., 2007; SAMPAIO et al., 2011). Porém, o principal antígeno investigado é o Glicolípido Fenólico I (PGL-I), molécula específica do *M. leprae* (VISSA; BRENNAN, 2001).

Os ensaios, como o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), que detectam a presença de Imunoglobulina (Ig) M anti-PGL-I, (HUNTER; BRENNAN, 1981; SPENCER; BRENNAN, 2011) contribuem na identificação de pacientes MB, porém a aplicabilidade para os PB é limitada em virtude da baixa ativação da resposta imune humoral (DUTHIE et al., 2007). No entanto, a sorologia IgM anti-PGL-I aliada a técnicas que envolvem a distribuição espacial dos casos de hanseníase pode auxiliar na avaliação da exposição ao bacilo e na identificação de indivíduos com risco mais elevado de desenvolver a doença (BARRETO et al., 2015; CARVALHO et al., 2015).

Ensaio de imunidade celular como o *Whole Blood Assay* (WBA) também estão sendo utilizados para identificar proteínas como possíveis marcadores para a hanseníase. O WBA é uma técnica de baixo custo e de fácil execução, que proporciona condições para a triagem de antígenos, e é favorecido em áreas onde a hanseníase é endêmica, pois pode facilitar a incorporação do teste em áreas com menor acesso a laboratórios sofisticados (GELUK et al., 2010; SILVA et al., 2013). Todavia inicialmente é necessário compreender como os antígenos do *M. leprae* influenciam na resposta imune da população, clinicamente diagnosticada ou não.

1.6. Antígenos ML0840 e ML2478

Os antígenos ML0840 (<https://mycobrowser.epfl.ch/genes/ML0840c>) e ML2478 (<https://mycobrowser.epfl.ch/genes/ML2478c>) são proteínas hipotéticas, hipotetizadas a partir da comparação entre sequências do genoma do *M. leprae* com a de outros organismos, com funções ainda desconhecidas. No entanto, de acordo com GELUK et al. (2011), esses antígenos induzem a produção da citocina IFN- γ , característica da resposta imune celular, e GELUK et al. (2012) destaca o ML2478 como possível biomarcador para exposição ao *M. leprae* em áreas endêmicas.

Recentemente em outro estudo com esses antígenos em colaboração com nosso grupo de pesquisa (HOOIJ et al., 2018) avaliaram o anticorpo IgM anti-PGL-I e os marcadores para imunidade celular *Interferon gamma-induced protein 10*, *Macrophage inflammatory protein-1 β* e *C-reactive protein* em três áreas endêmicas (Brasil, China e Etiópia), para hanseníase, apontando que a combinação desses marcadores melhora o potencial de diagnóstico, particularmente para os casos PB/Polo TT, além de poder auxiliar na identificação de exposição/infecção e no perfil clínico da doença.

Os antígenos ML0840 e ML2478 também se destacam por não apresentarem homologia com o *M. tuberculosis*, o que evita reações cruzadas em áreas endêmicas tanto para hanseníase como para tuberculose, como o Brasil que notificou 72.788 casos novos de tuberculose no ano de 2018 (taxa de detecção de 34,8/100.000 habitantes) (BRASIL, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a resposta imune celular após exposição *in vitro* de sangue periférico aos antígenos ML2478 e ML0840 do *Mycobacterium leprae*.

2.2. Específicos

a) Analisar a resposta celular pela produção de citocinas após exposição com os antígenos do *M. leprae*.

b) Comparar as citocinas produzidas após exposição com os antígenos do *M. leprae*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População de estudo

Após aprovação-pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 26765414.0.0000.0018) (ANEXO) foram analisados casos novos de hanseníase com características evidentes, antes da primeira dose do tratamento com PQT, atendidos e diagnosticados na Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia (UREMC); e casos novos com hanseníase diagnosticados por uma equipe multiprofissional durante ação de busca ativa entre escolares (ESC) em 3 escolas da rede pública de ensino do município de Marituba-PA, representando no estudo casos oligossintomáticos. Realizamos também a seleção de contatos (CT) dos casos novos diagnosticados na UREMC e de ESC sadios, os quais não apresentavam sinais ou sintomas para a hanseníase, e indivíduos com outras doenças dermatológicas (ODD), sem evidências para hanseníase, atendidos e diagnosticados na UREMC ou na Santa Casa de Misericórdia do Pará, localizada no município de Belém-PA (Quadro 2).

Todos os participantes assinaram de forma voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A e B).

Quadro 2 - Grupos de estudo.

Grupo (n)		Integrantes
Indivíduos com hanseníase (47)	Casos novos UREMC (39)	Indivíduos diagnosticados clinicamente com hanseníase (1).
	Casos novos oligossintomáticos (8)	Indivíduos avaliados durante estratégia de busca ativa por casos novos de hanseníase em escolas da rede pública de ensino do município de Marituba-PA, os quais foram diagnosticados com hanseníase (ESC caso).
Indivíduos sem hanseníase (40)	CT (20)	Indivíduos que convivem com pacientes e não apresentam sinais ou sintomas clínicos para hanseníase, com baciloscopia negativa.
	ESC sadio (13)	Indivíduos avaliados durante estratégia de busca ativa por casos novos de hanseníase em escolas da rede pública de ensino do município de Marituba-PA, os quais não apresentam sinais ou sintomas clínicos para hanseníase e sorologia IgM anti-PGL-I negativa.

ODD (7)	Indivíduos diagnosticados com outras doenças dermatológicas e sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase.
----------------	---

Fonte: elaborado pela autora. (1) De acordo com Madri (1953), Ridley e Jopling (1966) e Brasil (2017). UREMC: Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo; CT: Contatos; ESC sadio: escolares sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase; ODD: Indivíduos com outras doenças dermatológicas.

3.2. Quantificação de anticorpos IgM anti-Glicolipídio Fenólico I

Os anticorpos IgM anti-PGL-I foram quantificados pela técnica de ELISA através da molécula sintética Dissacarídeo Natural-Octil-Albumina de Soro Humano (ND-O-HSA), fornecida gentilmente pelo Dr. Malcolm Duthie (Infectious Disease Research Institute, Seattle, EUA).

Para a realização do ensaio foram coletados aproximadamente 5mL de sangue periférico em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (Polymed, cod. 50203), em seguida o plasma foi separado através do processo de centrifugação a 2000rpm durante 5 minutos (min) e armazenado em *freezer* -80°C para posterior quantificação dos anticorpos.

Inicialmente 50mg/poço do antígeno ND-O-HSA diluído em 50µL de solução de sensibilização (NaHCO₃ a 0,84% + Na₂CO a 1,06%) foram transferidos para placa de 96 poços por um período de aproximadamente 24 horas (h) a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada com 300µL/poço de solução de bloqueio (SB) contendo tampão fosfato-salino (PBS) 1X + 1% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich®, cod. A7906-500G, MO-EUA) + 0,05% de Tween 20. Posteriormente esta foi lavada mais 3 vezes com 200µL/poço de solução de lavagem (SL) contendo PBS 1X + 0.05% de Tween 20. Em seguida, 300µL/poço de SB foram inseridos a placa por 1h a temperatura ambiente (TA). Então, 1µL de plasma diluído em 300µL/poço foi adicionado, em duplicata, aos seus respectivos poços e no branco. Após incubação de 2h a TA a placa foi lavada 3 vezes com 200µL/poço de SL incubando-se por 10min a TA, em seguida essa etapa foi realizada novamente. Logo após, foram inseridos 100µL/poço do anticorpo secundário IgM anti-humano conjugado com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich®, cod. A0420, MO-EUA) (diluído 1:10 000 em SL) incubando-se por 1h e 30 min a TA. Depois desse período, a placa foi lavada 3 vezes com 200µL/poço de SL incubando-se por 10min a TA, repetindo essa etapa mais uma vez. Em seguida, 100µL/poço do

substrato *o*-phenylenediamine dihydrochloride substrate (OPD) (SIGMAFAST™ OPD tablet, cod. P9187, MO-EUA) foram adicionados e após 15min foi utilizada a solução H₂SO₄ 4N para encerrar a reação com o OPD. Posteriormente, a absorbância das amostras foi mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 490nm por leitor de ELISA (Dinex MRX Revelation, VA-EUA).

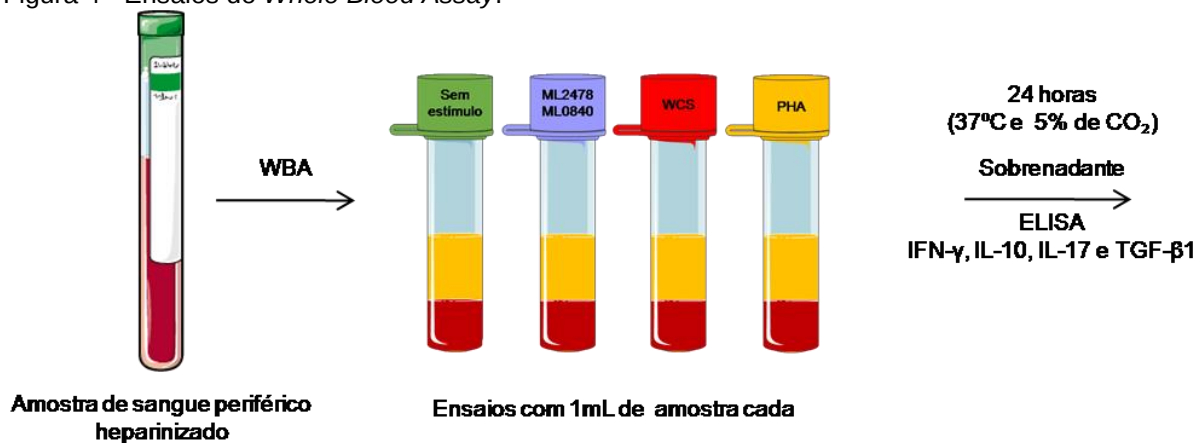
Foram consideradas positivas as amostras que obtiveram o valor de densidade óptica (D.O.) final acima de 0,295, *cut-off* estabelecido a partir da mediana mais 3 vezes o desvio padrão da D.O. de indivíduos sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase.

A D.O. final foi obtida a partir da subtração do branco pela média da duplicada de cada indivíduo: $[(D.O. \text{ poço I} + D.O. \text{ poço II}) / 2] - D.O. \text{ branco}$. Como controle positivo foi utilizado plasma de paciente VV caracterizado pela alta produção de anticorpos frente ao bacilo, e para o controle negativo plasma de indivíduo residente em área não endêmica para hanseníase.

3.3. Whole Blood Assay

Amostras de 5mL de sangue total periférico foram coletadas em tubos contendo heparina (BD Vacutainer® *Plus plastic plasma tube*, cod. 367874, NJ-EUA) para a realização do WBA. Cada amostra de sangue não diluído foi incubada por um período de 24h a 37°C e a 5% de CO₂ em 4tubos previamente sensibilizados com antígenos do *M. leprae*, fornecidos gentilmente pela Prof^a. Dr^a. Annemieke Geluk (Universiteit Leiden, Nederland), para ensaios com 1mL de sangue cada. Assim, foram realizados para cada amostra: 1 ensaio sem estímulo representando o controle negativo, 1 com o estímulo dos antígenos ML2478 e ML0840, 1 com o estímulo do *M. leprae* sonicado (WCS) representando a bactéria com todos os seus antígenos, e 1 com fitohemaglutinina (PHA), um agente mitogênico, correspondendo ao controle positivo (HOOIJ et al., 2018). Após o período de incubação os sobrenadantes foram coletados, alíquotados e armazenados em freezer -80°C para posterior mensuração dos níveis das citocinas IFN-γ, IL-10, IL-17 e TGF-β1 (Figura 4).

Figura 4 - Ensaios do *Whole Blood Assay*.

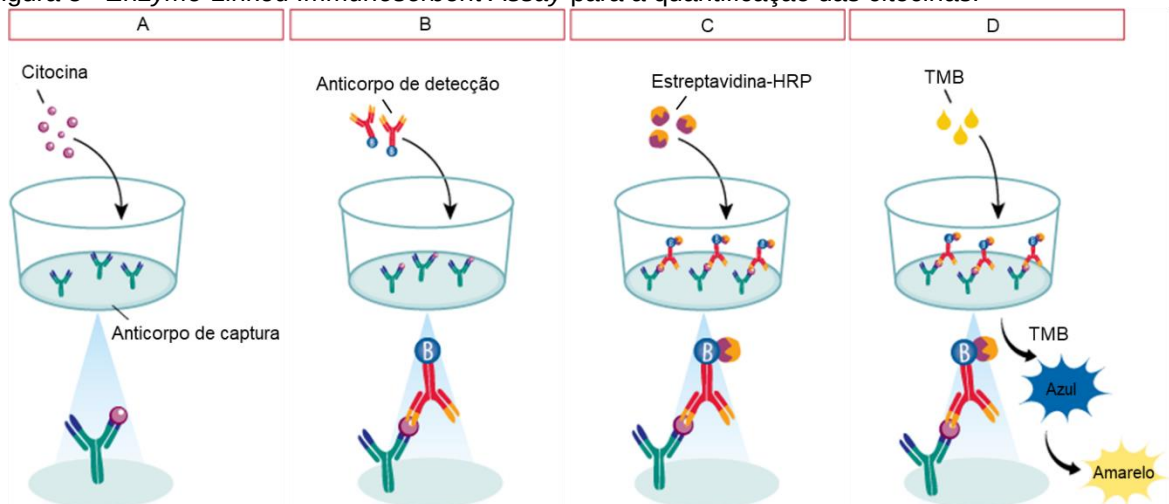


Fonte: Laboratório de Dermato-Imunologia UFPA/UEPA/MC. Sem estímulo: controle negativo; ML2478 ML0840: ensaio com estímulo dos antígenos ML2478 e ML0840; WCS: ensaio com *M. leprae* sonificado; PHA: controle positivo, ensaio com o agente mitogênico fitohemaglutinina; ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, técnica para quantificação das citocinas IFN-γ, IL-10, IL-17 e TGF-β1.

3.4. Quantificação das citocinas

As citocinas IFN-γ (R&D Systems Human IFN-γ ELISA, cod. DY285), IL-10 (R&D Systems Human IL-10 ELISA, cod. DY217B), IL-17 (R&D Systems Human IL-17 ELISA, cod. DY317) e TGF-β1 (R&D Systems Human TGF-β1 ELISA, cod. DY240), foram quantificadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Figura 5).

Figura 5 - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* para a quantificação das citocinas.



Fonte: adaptado de R&D Systems. A: sensibilização de placa de 96 poços com anticorpo de captura e posterior ligação com citocina presente na amostra avaliada; B: adição de anticorpo de detecção; C: adição da proteína estreptavidina conjugada a enzima *horseradish peroxidase* (HRP); D: adição do substrato cromogênico 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) que ao ser oxidado pela reação com o HRP apresenta coloração azul, a qual muda para amarelo com a adição de H₂SO₄ 2N. Leitura da absorbância das amostras em comprimento de onda de 450nm.

3.4. Análises estatísticas

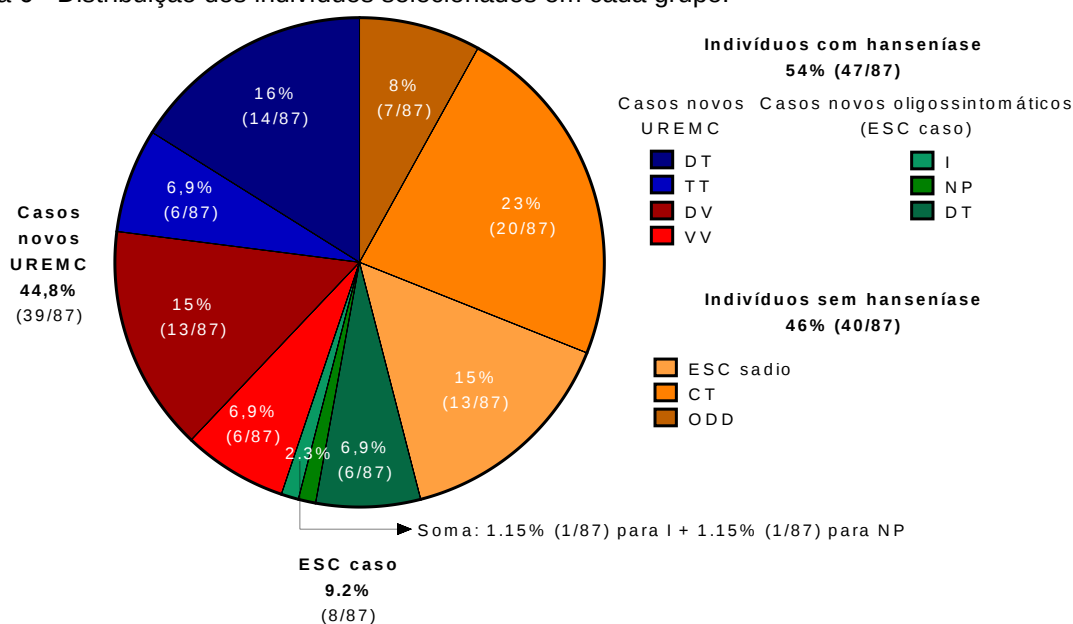
As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa GraphpadPrism 6.1[®] (GraphPad *Software*, CA-EUA). O teste Mann-Whitney foi empregado para averiguar diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes que possam contribuir na identificação de casos iniciais, oligossintomáticos, podem ser de grande benefício em áreas endêmicas para hanseníase (HOOIJ et al., 2016). DUTHIE et al. (2008) demonstraram que o ensaio WBA é de fácil execução e com potencial na triagem de antígenos de *M. leprae* para a identificação de biomarcadores de diagnóstico ou candidatos para o desenvolvimento de vacinas.

Nesse estudo, selecionamos 87 indivíduos para a realização do WBA 24h pelo estímulo com os antígenos específicos ML2478 e ML0840. Entre os 87 selecionados, 47 são indivíduos com hanseníase (39 são casos novos UREMC e 8 ESC caso) e 40 indivíduos sem hanseníase (20 CT, 13 ESC sadio e 7 ODD) (Figura 6) (Tabela 1). Após o WBA, quantificamos as citocinas IFN- γ (Figura 7, 8 e 9), IL-10 (Figura 10, 11 e 12), IL-17 (Figura 13, 14 e 15) e TGF- β 1 (Figura 16, 17 e 18) e realizamos a comparação dos níveis dessas citocinas entre os indivíduos com hanseníase diagnosticados na UREMC nas formas TT, DT, DV e VV com os CT, ESC sadio e ODD e a comparação de ESC sadio com CT, ESC sadio e ODD, os quais são pacientes de acne (1), dermatite atópica (1), doença mista do tecido conjuntivo (1), paracoccidiodomicose (1), psoríase (2), e verruga vulgar (1).

Figura 6 - Distribuição dos indivíduos selecionados em cada grupo.



Total - 100% = 87 indivíduos

Fonte: elaborada pela autora. UREMC: Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo; I: indeterminada; NP: primariamente neural; TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; CT: contatos; ESC sadio: escolares sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase; ODD: indivíduos com outras doenças dermatológicas (1 acne, 1 dermatite atópica, 1 doença mista do tecido conjuntivo, 1 paracoccidiodomicose, 2 psoríase e 1 verruga vulgar).

Tabela 1 - Características dos grupos analisados no estudo.

Grupos (n)	Forma clínica (1) (n)	Sexo biológico n (F/M)	Média das Idades n (Variação)	IB Média (Variação)	IgM anti-PGL-I Mediana (Variação)
Casos UREMC (39)	TT (6)	3/3	42 (15-64)	0	0,176 (0,104-0,492)
	DT (14)	9/5	35 (9-59)	0	0,215 (0,001-0,435)
	DV (13)	2/11	40 (8-60)	2,5 (1-4,5)	2,059 (1,307-3,339)
	VV (6)	1/5	46 (22-57)	4 (3,75-4,25)	1,327 (0,930-2,582)
ESC caso (8)	NP (1), I (1) e DT (6)	4/4	9 (8-11)	NR	0,181 (0,110-0,288)
CT (20)	NA	10/10	39 (12-71)	0	0,138 (0,049-0,474)
ESC sadio (13)	NA	6/7	9 (8-11)	NR	0,044 (0,019 - 0,097)
ODD (7)	NA	6/1	45 (9-73)	0	0,130 (0,065 - 0,408)
Total (87)		41/46	33 (8-73)	0,5 (0-4,5)	0,163 (0,001-3,339)

Fonte: elaborada pela autora. (1) De acordo com Madri (1953), Ridley e Jopling (1966) e Brasil (2017). UREMC: Unidade de Referência Especializada em Dermatologia Sanitária Dr. Marcello Candia; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo; CT: contatos; ESC sadio: escolares sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase; ODD:

indivíduos com outras doenças dermatológicas; I: indeterminada; NP: primariamente neural; DT: dimorfo-tuberculoide; TT: tuberculoide; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; NA: não aplicado; NR: não realizado; F: sexo biológico feminino; M: sexo biológico masculino; IB: índice baciloscópio.

4.1. Produção de IFN- γ

A citocina pró-inflamatória IFN- γ tem um papel fundamental na resposta contra os patógenos intracelulares, sendo central na imunidade mediada por células, Th1, devido coordenar uma infinidade de funções antimicrobianas (DECADE; MUSTERMAN, 2018).

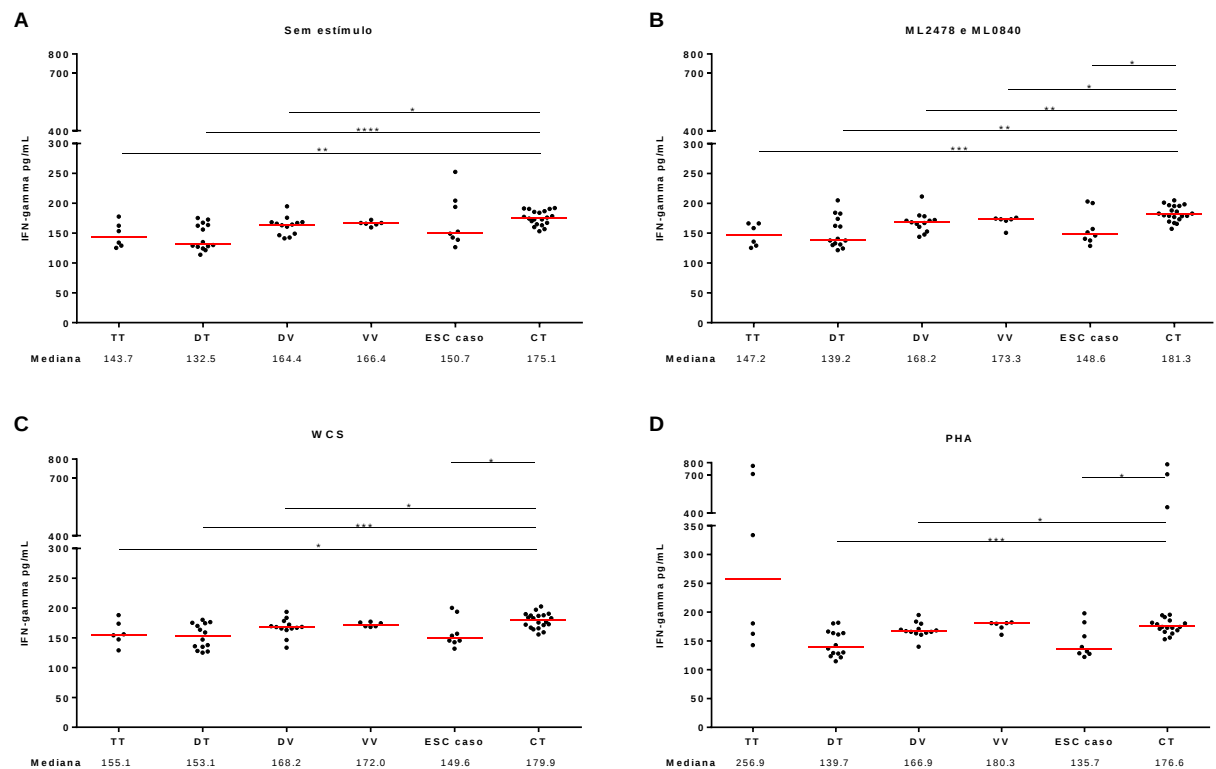
Ao realizar a quantificação do IFN- γ , observamos o aumento em 50% (3/6) dos indivíduos do grupo TT, em 15% (3/20) dos CT, e em 14% (1/7) dos ODD ao estímulo com PHA, que ativa e induz a proliferação de linfócitos *in vitro* (NOWELL, 1960), consistindo em um controle positivo para avaliar a capacidade de resposta. No grupo ESC sadio não foi observado o aumento na produção de IFN- γ ao estímulo com PHA, o que pode ter relação a aspectos como: a idade dos indivíduos avaliados (SIMON et al., 2015); e fatores nutricionais, pois deficiências alimentares podem prejudicar o sistema imune, suprimindo funções fundamentais para a proteção do hospedeiro (BOURKE et al., 2019; MARCOS; NOVA; MONTERO, 2003).

Quando comparamos a produção de IFN- γ entre os grupos avaliados, verificamos que as proteínas ML2478 e ML0840 conseguem diferenciar todos os indivíduos com hanseníase (grupos TT, DT, DV, VV e ESC caso) dos CT (Figura 7). No entanto, não diferenciam quem tem o diagnóstico da doença dos ESC sadio (Figura 8), possivelmente devido a resposta imune nos indivíduos do grupo ESC sadio (faixa etária média de 9 anos) ainda está sendo desenvolvida (SIMON et al., 2015). As comparações com o grupo ODD, demonstraram diferenças em relação aos casos na forma DT e aos ESC caso (Figura 9).

Os pacientes TT, DT e os CT podem apresentar um perfil de resposta imune celular semelhante (HOOIJ et al., 2019), assim o diagnóstico de casos novos entre os CT com o auxílio de testes laboratoriais pode ser prejudicado, com resultados falsos positivos. Porém, essa similaridade, pode indicar com base nos biomarcadores IgM anti-PGL-I, IP-10, CCL4 e CRP através do estímulo com as proteínas ML2478 e ML0840 a nível longitudinal, ao longo do tempo, os indivíduos

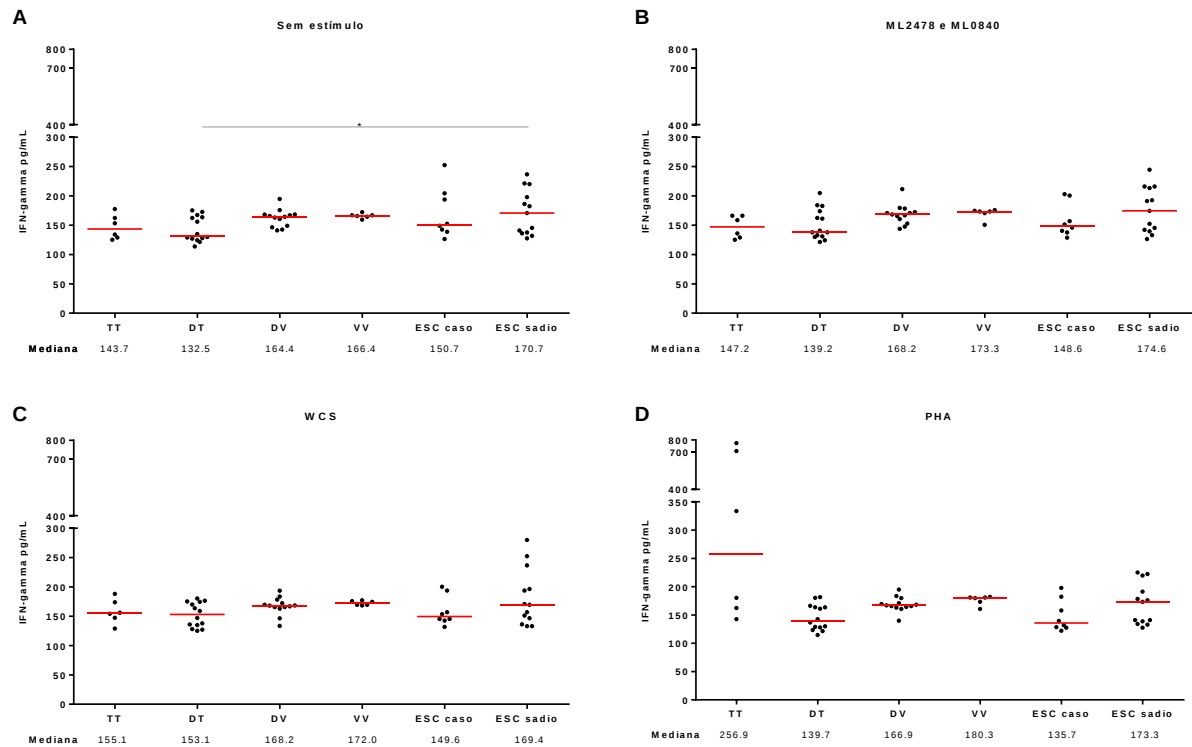
doentes que ainda não manifestaram sintomas clínicos evidentes (HOOIJ et al., 2018). Isoladamente os antígenos ML2478 e ML0840 também não demonstraram diferenciar os casos de hanseníase (TT e DT) de CT quanto a produção de IFN- γ (GELUK et al., 2012b). Porém, ao comparar os grupos de indivíduos com hanseníase com os CT, verificamos que em conjunto as duas proteínas conseguiram diferenciar os grupos TT, DT, DV, VV e ESC caso dos CT (Mediana IgM anti-PGL-I=0,138 e média IB=0).

Figura 7 - Comparação da produção de IFN- γ em indivíduos com hanseníase e CT.



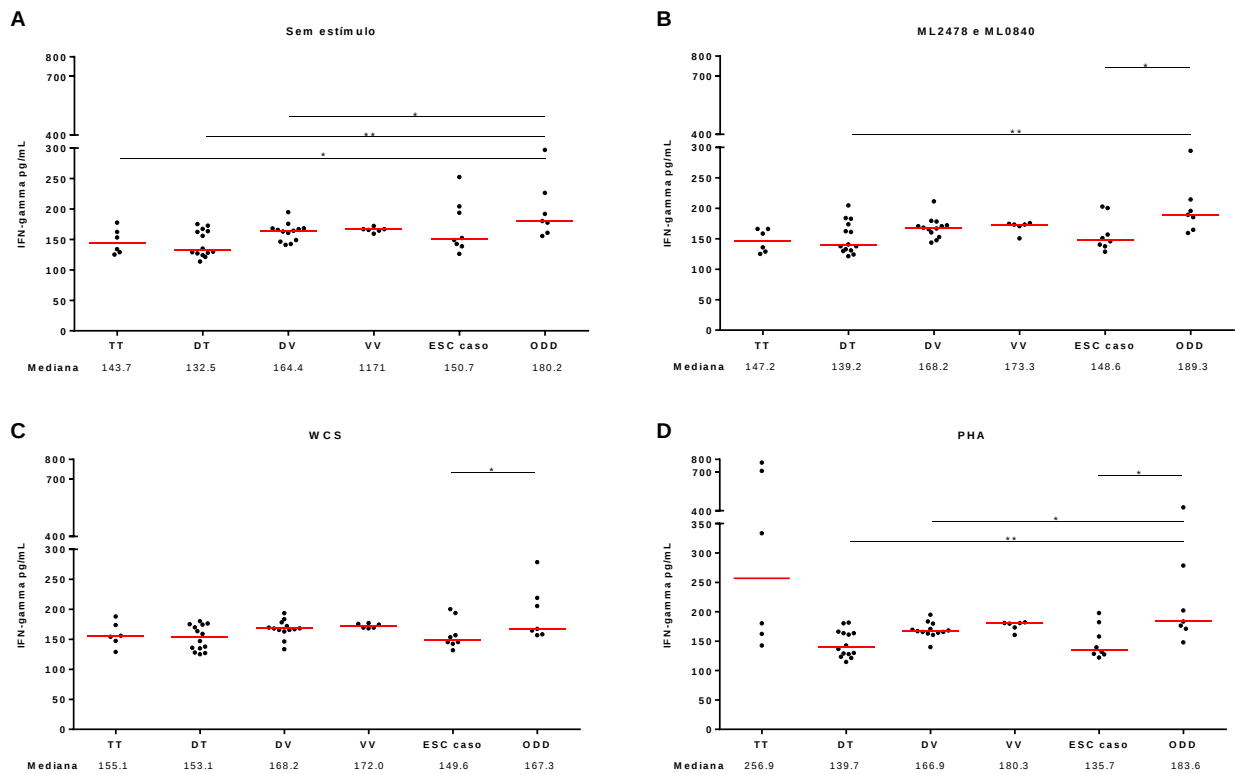
Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculose; DT: dimorfo-tuberculose; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo. CT: contatos. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo ensaio com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Figura 8 - Comparação da produção de IFN- γ em indivíduos com hanseníase e ESC sadio.



Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo; ESC sadio: escolares sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Figura 9 - Comparação da produção de IFN- γ em indivíduos com hanseníase e ODD.



Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculose; DT: dimorfo-tuberculose; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo. Indivíduos com outras doenças dermatológicas. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

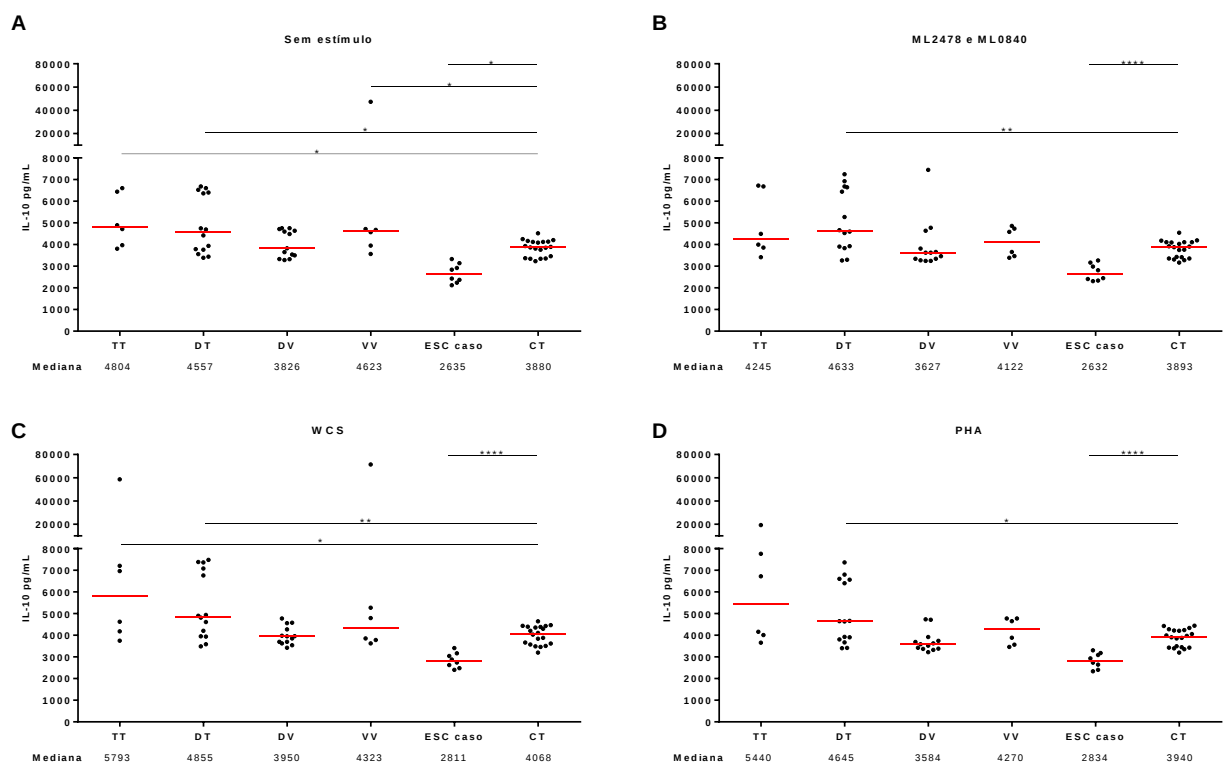
4.2. Produção de IL-10

A citocina IL-10 está relacionada com resposta supressora ao perfil Th1 (PITT et al., 2012; SALGADO et al., 2018). Ela contribui na indução de macrófagos com o fenótipo M2 (LOPES et al., 2016) e não favorece a via antimicrobiana na hanseníase (UPADHYAY et al., 2019), o que leva à sobrevivência do agente, apresentando possível relação com a anergia dos indivíduos da forma clínica VV.

Na quantificação de IL-10 destacamos que o aumento em 50% (3/6) dos indivíduos do grupo TT correspondeu aos indivíduos que apresentaram os menores níveis na quantificação para o IFN- γ ao estímulo pela PHA. Sugerindo que esses indivíduos apesar de sua classificação clínica ter como característica o perfil Th1, eles podem estar apresentando comprometimento da resposta de resistência ao *M. leprae*.

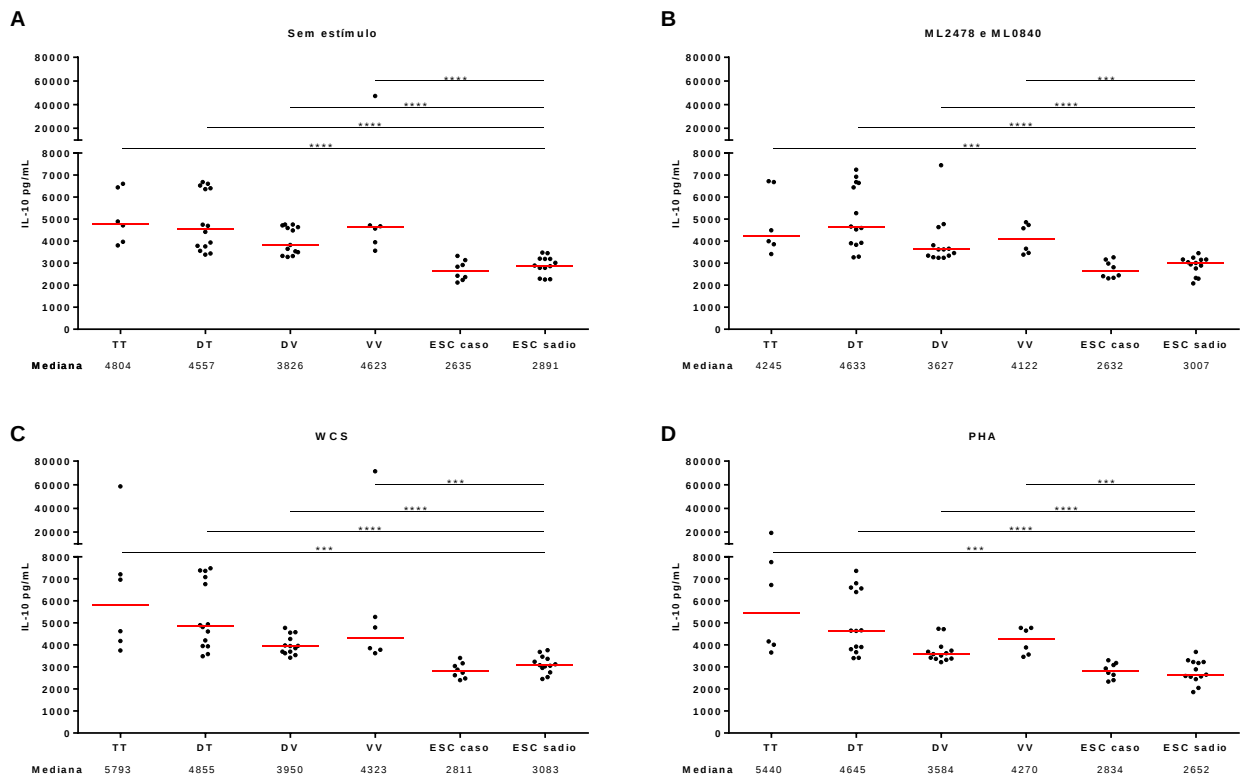
A análise dos níveis de IL-10 entre os grupos através do estímulo com as proteínas ML2478 e ML0840 demonstrou que elas diferenciam os indivíduos diagnosticados na UREMC na forma clínica DT e ESC caso dos CT (Figura 10). Quando a comparação é realizada com os grupos ESC sadio (Figura 11) e ODD (Figura 12), é observado diferença de todos os indivíduos doentes, com exceção de ESC caso, em relação aos ESC sadio e ODD, todavia essa diferença também ocorre nos demais ensaios do WBA (sem estímulo, WCS e PHA), podendo não ser necessariamente devido a ação das proteínas.

Figura 10 - Comparação da produção de IL-10 em indivíduos com hanseníase e CT.



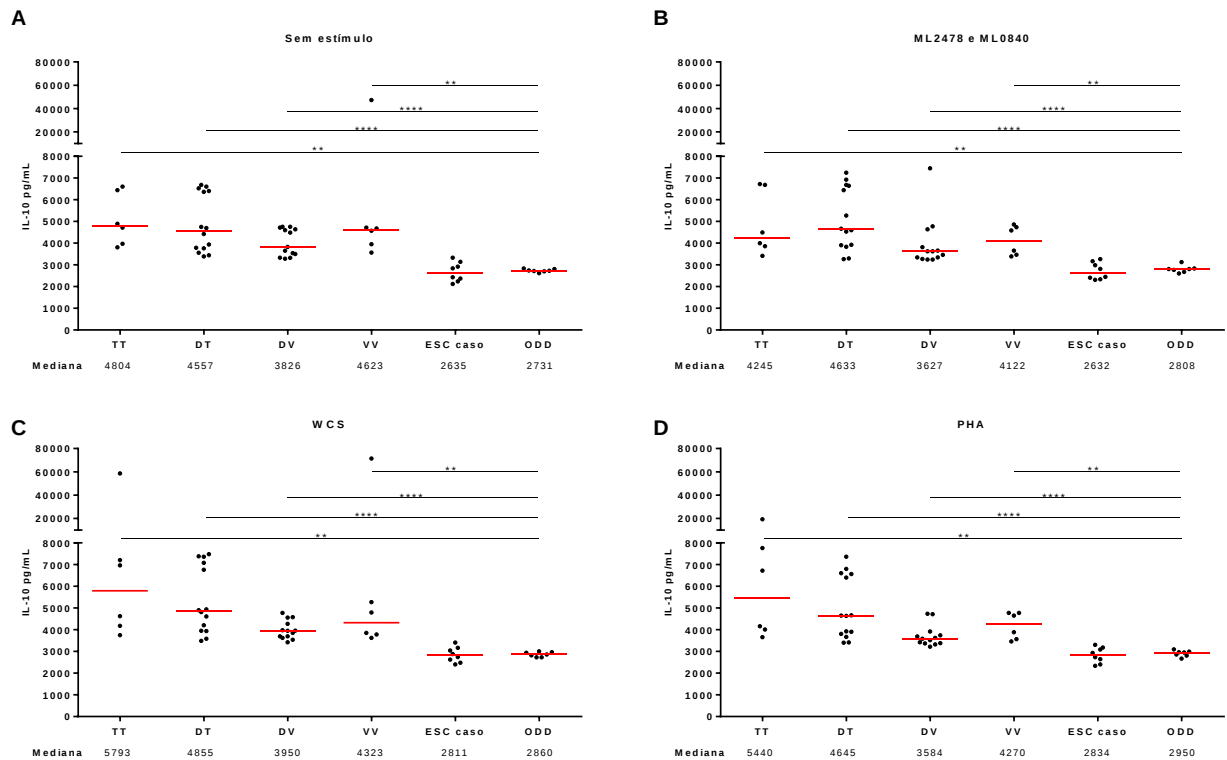
Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo. CT: contatos. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Figura 11 - Comparação da produção de IL-10 em indivíduos com hanseníase e ESC sadio.



Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo; ESC sadio: escolares sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Figura 12 - Comparação da produção de IL-10 em indivíduos com hanseníase e ODD.



Fonte: elaborada pela autora. Comparação da produção de IL-10 em indivíduos com hanseníase e ODD. TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo; ODD: Indivíduos com outras doenças dermatológicas. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo ensaio com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

4.3. Produção de IL-17

A citocina IL-17 é produzida pelas células Th17, as quais estão associadas a respostas inflamatórias e possivelmente promovem as formas PB na hanseníase, sugerindo que essas células sejam protetoras contra a infecção por *M. leprae* (SANTOS et al., 2017). E assim como o IFN- γ , a IL-17 contribui para a indução de iNOS, levando à produção de radicais livres que destroem o bacilo (DE SOUSA; SOTTO; QUARESMA, 2017).

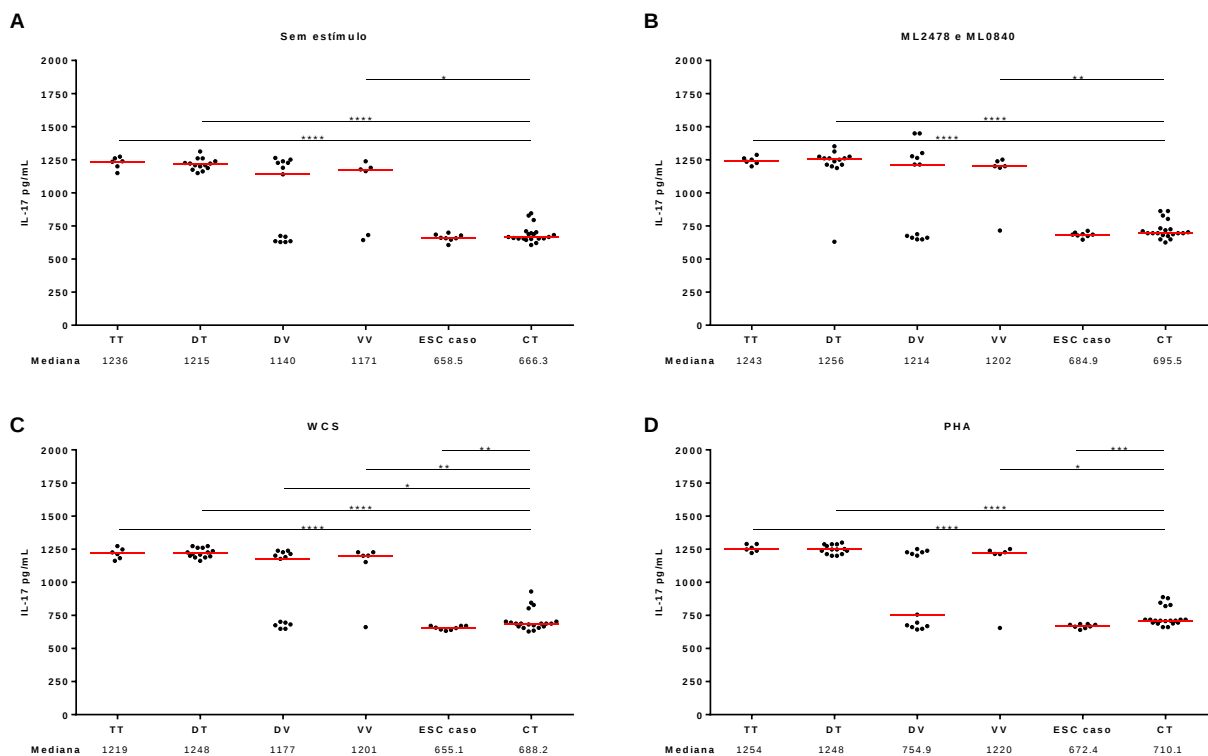
Os níveis de IL-17 com o estímulo pelo WCS conseguiu distinguir todos os grupos de casos dos CT (Figura 13). Em relação os ESC sadio, os ensaios sem estímulo, WCS e PHA diferenciaram os casos TT, DT, DV e VV do grupo ESC sadio (Figura 14). Além disso, destacamos a diferença dos grupos TT, DT e ESC caso do grupo ODD pelo estímulo com WCS (Figura 15), pois embora não tenha diferenciado os grupos DV e VV, conseguiu separar CT dos indivíduos com hanseníase (TT:

mediana IgM anti-PGL-I=0,176 e média IB=0; DT mediana IgM anti-PGL-I=0,215 e média IB=0) que podem não ser detectados com auxílio da sorologia IgM anti-PGL-I.

Para a IL-17 observamos que as proteínas ML2478 e ML0840 não conseguem diferenciar os casos oligossintomáticos do grupo CT (Figura 13) e de ESC sadio (Figura 14). Há diferença apenas em relação aos ODD, porém, essa diferença também ocorre nos demais ensaios do WBA (Figura 15).

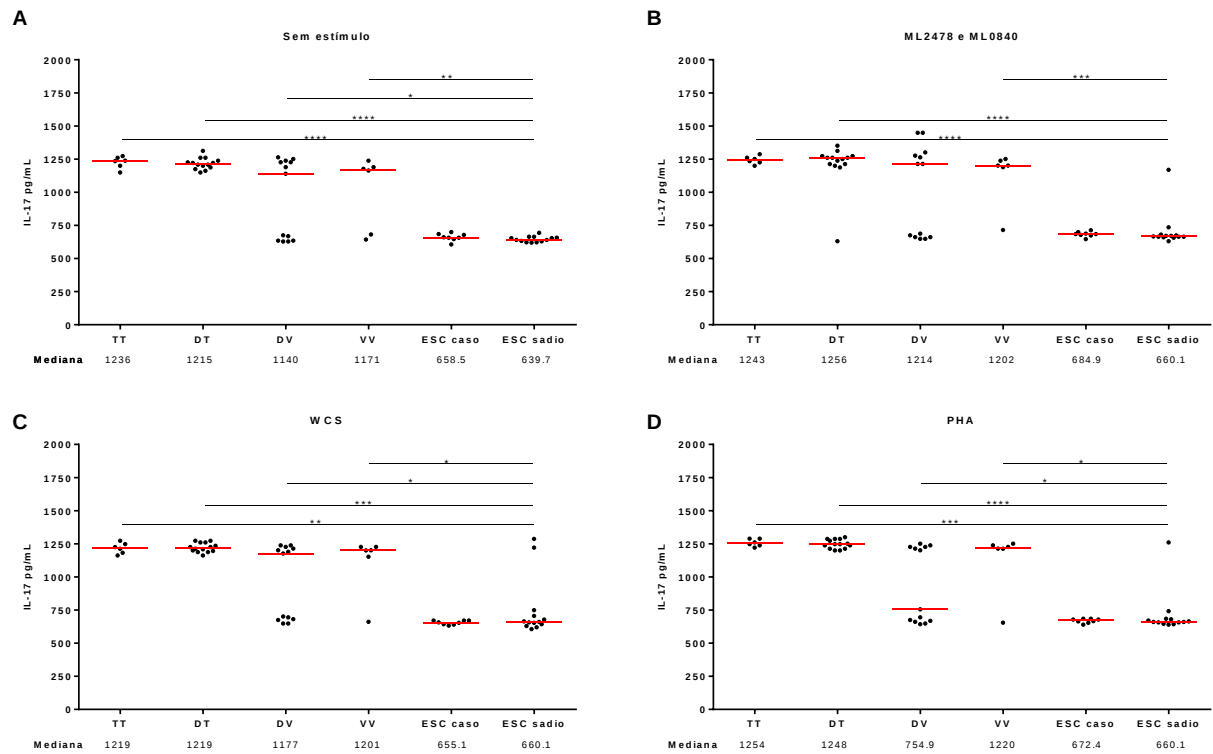
Ressaltamos que embora a diferenciação de ESC caso não tenha sido observada em todas os ensaios e comparações com os indivíduos sem hanseníase (CT, ESC sadio e ODD), em geral as medianas dos grupos TT, DT, DV e VV, os quais apresentam característica clínicas evidentes da doença, são superiores. Sugerindo acompanhar indivíduos que apresentarem níveis similares, como os do grupo ESC sadio ao estímulo por ML2478 e ML0840, WCS ou PHA.

Figura 13 - Comparação da produção de IL-17 em indivíduos com hanseníase e CT.



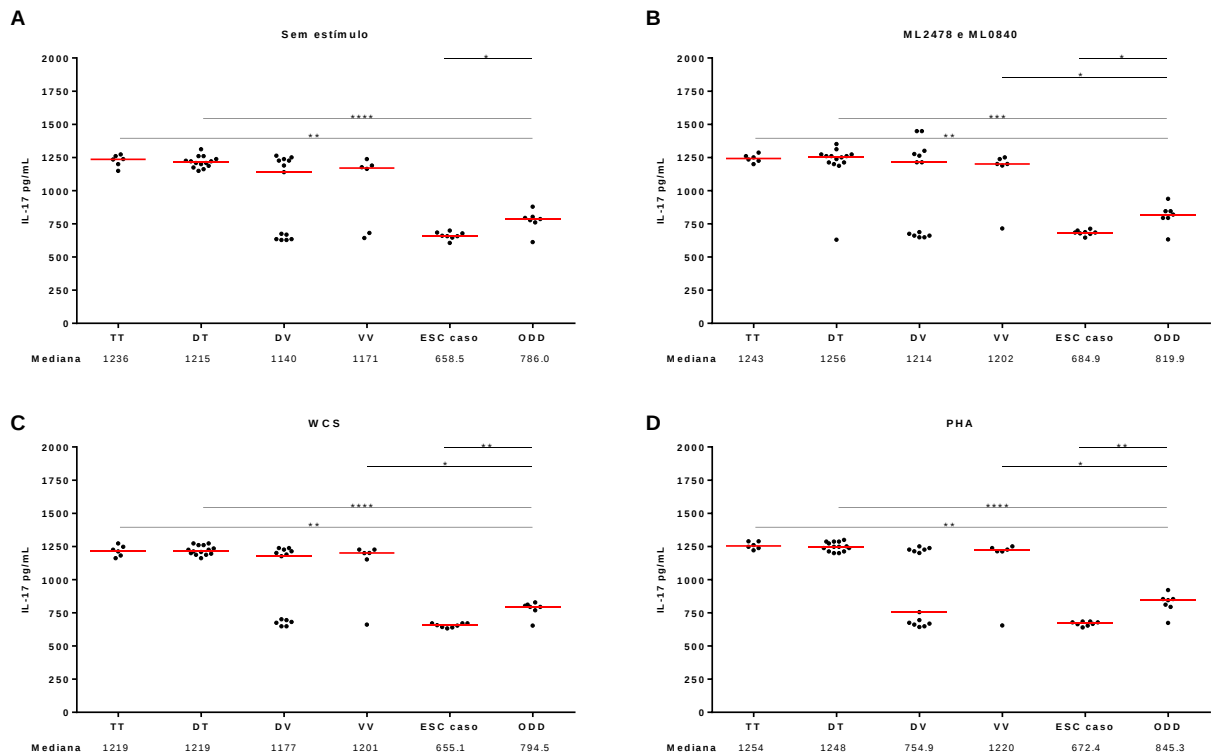
Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo. CT: contatos. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Figura 14 - Comparação da produção de IL-17 em indivíduos com hanseníase e ESC sadio.



Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo; ESC sadio: escolares sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo ensaio com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Figura 15 - Comparação da produção de IL-17 em indivíduos com hanseníase e ODD.



Fonte: elaborada pela autora. Comparação da produção de IL-17 em indivíduos com hanseníase e ODD. TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo. ODD: Indivíduos com outras doenças dermatológicas. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo ensaio com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

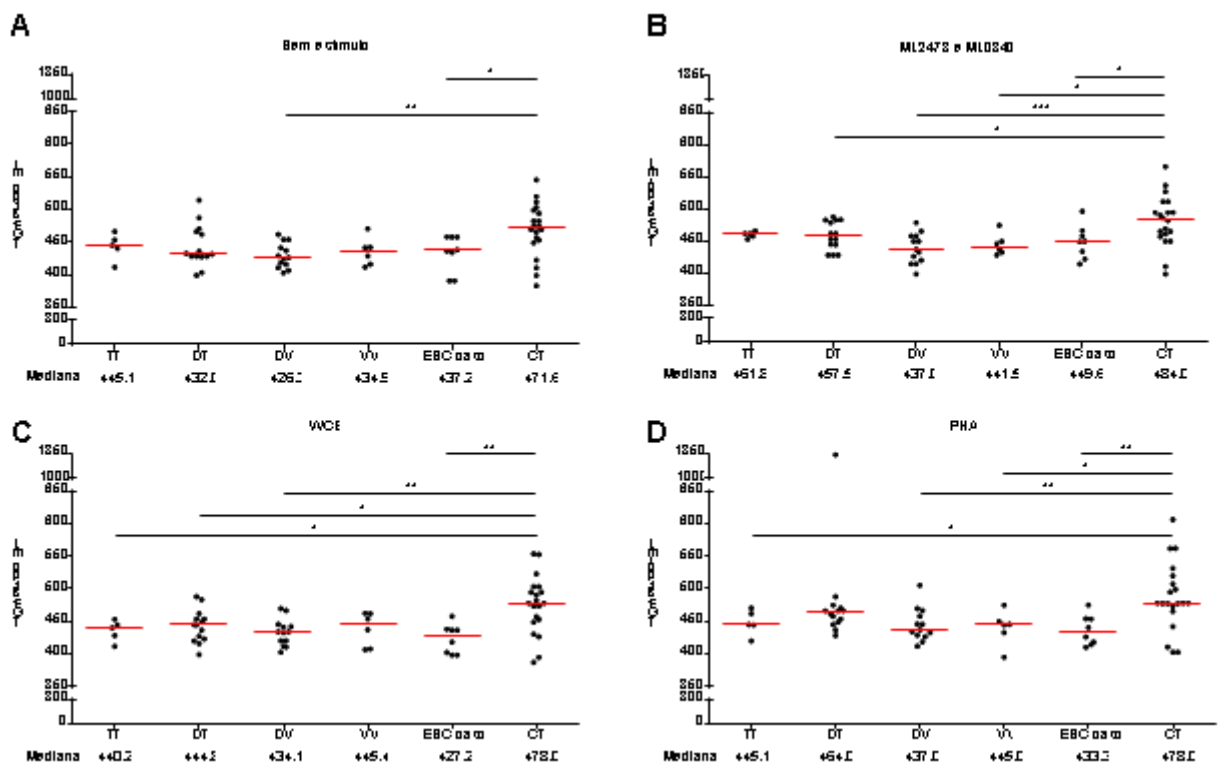
4.4. Produção de TGF- β 1

Para a citocina TGF- β 1, a qual é atribuída ação anti-inflamatória durante a infecção por *M. leprae* (GOULART; MINEO; T, 2000; PETITO et al., 2013), quando quantificada no ensaio pelo estímulo com WCS apresentou diferenciação entre os grupos TT, DT, DV e ESC caso dos CT (Figura 16). Na comparação com o grupo ESC sadio houve diferença apenas no estímulo com a PHA, porém essa diferença é em relação a todos os grupos de indivíduos com hanseníase (Figura 17). A comparação com grupo ODD também diferiu dos grupos TT, DT, DV, VV e ESC caso para o ensaio com WCS e o sem estímulo.

As proteínas ML2478 e ML0840 a partir dos níveis de TGF- β 1 conseguiram diferenciar todos os indivíduos com hanseníase nas formas clínicas dimorfas, VV e os oligossintomáticas dos CT (Figura 16), mas não de ESC sadio (Figura 17) e ODD (Figura 18).

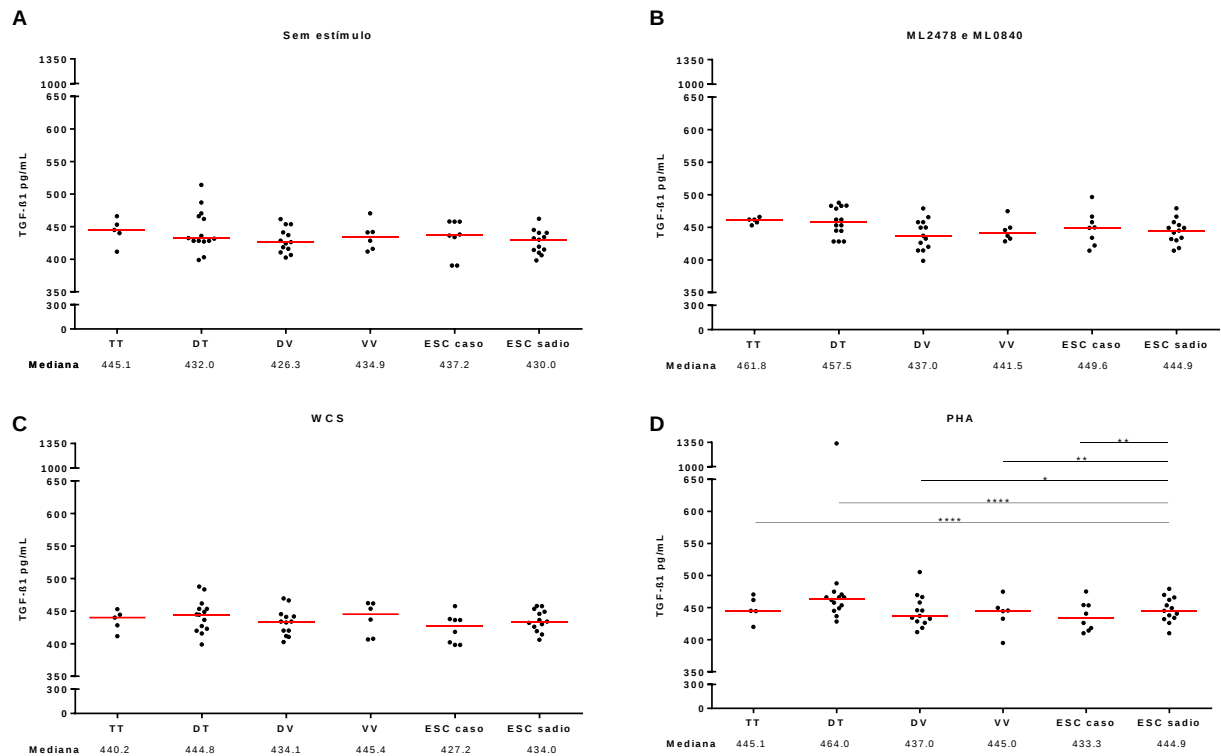
Destacamos que os níveis de TGF- β 1 no grupo CT apresentaram medianas superiores aos indivíduos com hanseníase em todos os ensaios, indicando que pode haver comprometimento na produção dessa citocina nos indivíduos doentes. Sendo de interesse averiguar os indivíduos que apresentam os níveis de TGF- β 1 abaixo da mediana.

Figura 16 - Comparação da produção de TGF- β 1 em indivíduos com hanseníase e CT.



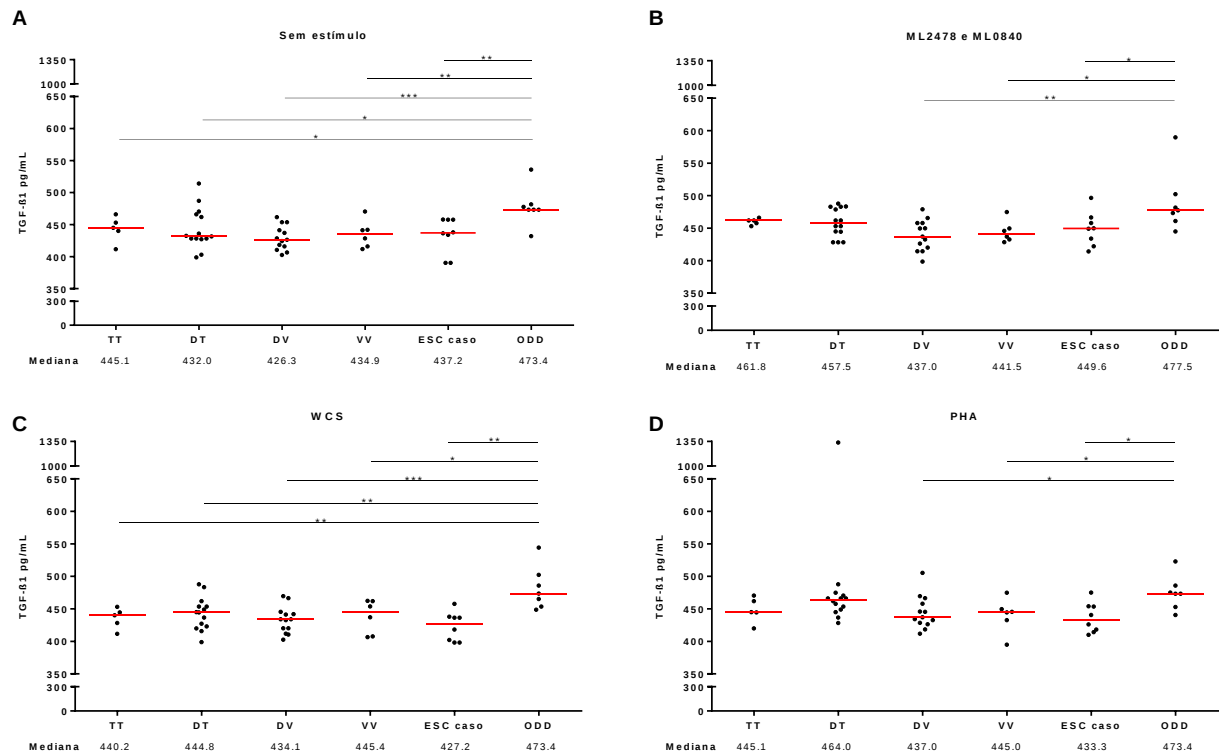
Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculose; DT: dimorfo-tuberculose; DV: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo. CT: contatos. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Figura 17 - Comparação da produção de TGF- β 1 em indivíduos com hanseníase e ESC sadio.



Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo; ESC sadio: escolares sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo ensaio com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Figura 18 - Comparação da produção de TGF- β 1 em indivíduos com hanseníase e ODD.



Fonte: elaborada pela autora. TT: tuberculose; DT: dimorfo-tuberculose; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo. ODD: Indivíduos com outras doenças dermatológicas. A: comparação no ensaio sem estímulo; B: comparação no ensaio com o estímulo pelas proteínas ML2478 e ML0840; C: comparação no ensaio com o estímulo pelo *M. leprae* sonicate (WCS); D: comparação pelo estímulo ensaio com o agente mitogênico fitohemaglutinina (PHA). Teste Mann-Whitney com $p < 0,05$.

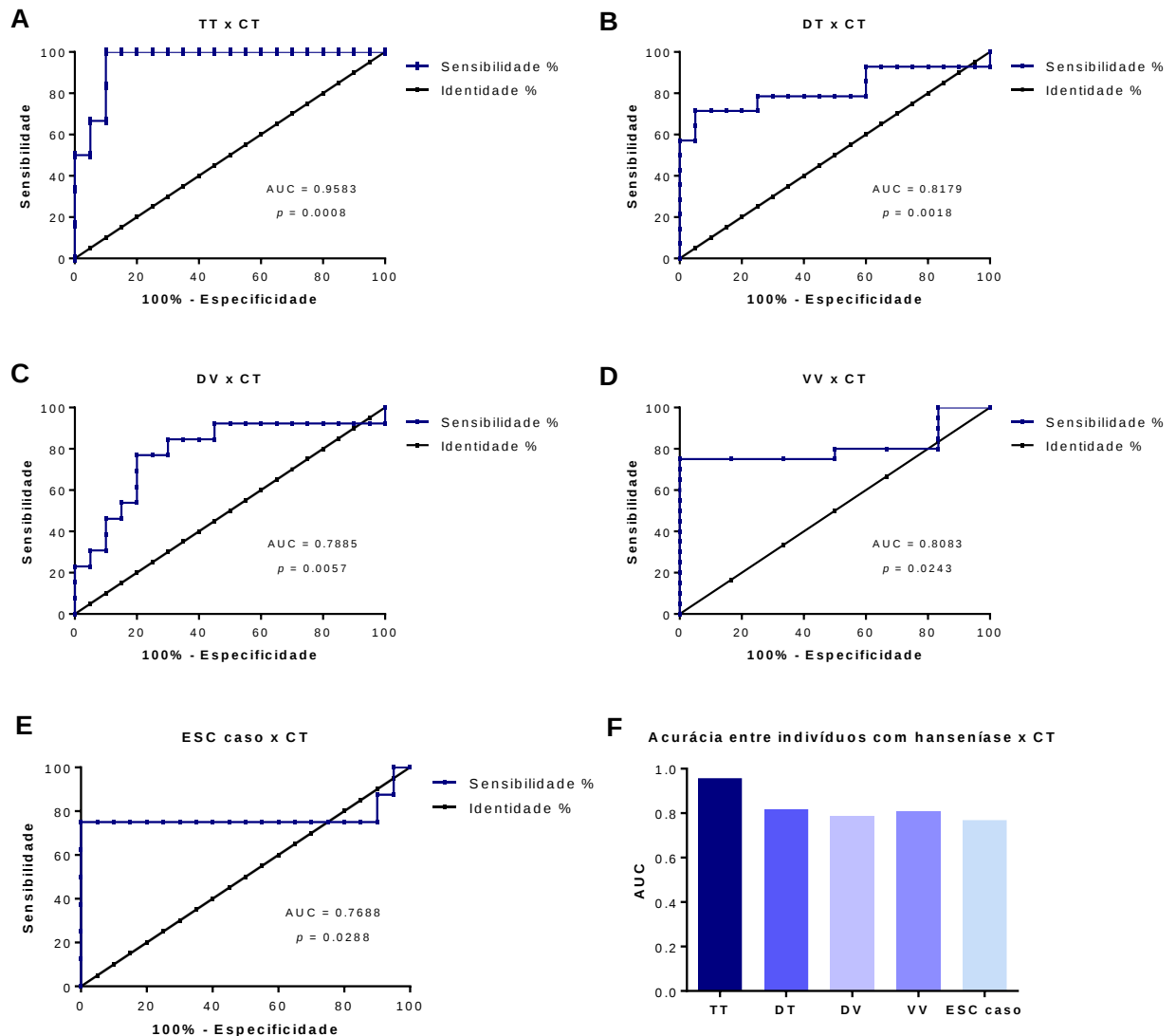
4.5. Discriminação entre indivíduos com hanseníase e contatos

As curvas *receiver operating characteristic* (ROC) caracterizam a acurácia de um teste de diagnóstico, ou seja, como os resultados diferenciam os indivíduos doentes e não doentes. Essa curva é construída a partir dos diferentes pontos de corte (*cut-off*) de um teste. Nesses pontos são atribuídos no eixo das ordenadas à taxa de verdadeiros resultados positivos (sensibilidade) e no eixo das abscissas à taxa de falsos positivos (100% - especificidade ou 1 - especificidade) (OBUCHOWSKI; BULLEN, 2018).

Como a produção de IFN- γ pelo estímulo com os antígenos ML2478 e ML0840 conseguiu diferenciar todos os indivíduos com hanseníase, tanto com características evidentes quanto casos oligossintomáticos, de CT, verificamos a acurácia (área sobre a curva ROC - AUC) dessa discriminação (Figura 19), a qual

classifica os resultados em: excelente (superior a 0,9), bom (0,8 a 0,9), razoável (0,7 a 0,8), pobre (de 0,6 a 0,7), e não discriminador (0,5 a 0,6).

Figura 19 - Curva ROC para o a produção de IFN- γ pelo estímulo das proteínas ML2478 e ML0840 entre os casos de hanseníase e CT.



Fonte: elaborada pela autora. AUC: área sob a curva. TT: tuberculoide; DT: dimorfo-tuberculoide; DV: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-Virchowiano; VV: Virchowiano; ESC caso: escolares diagnosticados com hanseníase durante estratégia de busca ativa do grupo. CT: contatos. A: comparação entre TT x CT; B: comparação entre DT x CT; C: comparação entre DV x CT; D: comparação entre VV x CT; E: comparação entre ESC x CT. Intervalo de confiança adotado de 95%.

Em todas as comparações de casos com CT a AUC apresentou valor superior a 0,7 (0,7688 a 0,9583) com intervalo de confiança adotado de 95%. O valor do AUC varia de 0,0 até 1,0, dessa forma quanto maior o valor de AUC melhor, pois um teste em que todas as previsões estão 100% erradas possui AUC igual a 0 e um teste na qual todas as previsões são 100% corretas tem AUC igual a 1 (SONEGO; KOCSOR; PONGOR, 2008).

Os valores para as comparações realizadas foram classificados como: excelente para TT x CT; bom para DT x CT e VV e CT; e razoável para DV x CT e ESC caso x CT. Destacamos a AUC observada entre os casos nas formas TT com os CT, pois um dos objetivos dos testes de diagnóstico para hanseníase é diferenciar os indivíduos que possam não ser detectados por exames laboratoriais como a sorologia IgM anti-PGL-I, na qual contatos com elevada positividade devem ser monitorados, pois a positividade está associada a um risco de adoecer de 8,6 vezes maior em contatos (BRASIL et al., 2003), porém não sendo capaz de descartar a possibilidade de contatos com sorologia negativa estarem doentes, já que eles podem estar apresentando uma resposta de perfil Th1.

5. CONCLUSÕES

A resposta celular avaliada pela produção das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-17 e TGF- β 1 pelo estímulo com as proteínas ML2478 e ML0840 não diferiu entre os escolares casos e escolares saudáveis.

E entre as citocinas quantificadas, a IL-17 demonstrou produção superior nos casos atendidos na URE em relação aos escolares caso e aos indivíduos dos grupos controles.

REFERÊNCIAS

- BAKKER, M. I. et al. Population survey to determine risk factors for Mycobacterium leprae transmission and infection. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 1329–1336, 2004.
- BARRETO, J. G. et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 527, 2015.
- BENJAK, A. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus Mycobacterium leprae. **Nature Communications**, v. 9, n. 2018, p. 1–11, 2018.
- BOURKE, C. D. et al. Current Understanding of Innate Immune Cell Dysfunction in Childhood Undernutrition. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. July, p. 1–15, 2019.
- BRASIL. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública : manual técnico-operacional**. [s.l: s.n.].
- BRASIL, M. DA S. Guia prático sobre a hanseníase. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, 2017.
- BRASIL, M. DA S. Registro ativo: número e percentual, Casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2017. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, p. 2018, 2018.
- BRASIL, M. DA S. Brasil Livre da Tuberculose: evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, v. 50, p. 1–18, 2019.
- BRASIL, M. T. L. R. F. et al. Sorologia Anti PGL-1 e risco de ocorrência de hanseníase em área de alta endemicidade do Estado de São Paulo: quatro anos de seguimento. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 3, p. 262–271, 2003.
- CARUSO, A M. et al. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 9, p. 5407–5416, 1999.
- CARVALHO, A P. et al. Factors associated with anti-phenolic glycolipid-I seropositivity among the household contacts of leprosy cases. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 219, 2015.
- CASANOVA, J.; ABEL, L. GENETIC DISSECTION OF IMMUNITY TO MYCOBACTERIA : The Human Model. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 581–620, 2002.
- DE SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; QUARESMA, J. A. S. Leprosy as a complex infection: Breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the

immunopathogenesis of the disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 18–21, 2017.

DECADE, T. F.; MUSTERMAN, M. I. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. **BioMol Concepts**, v. 1, n. 2, p. 64–79, 2018.

DOCKRELL, H. M. et al. A postgenomic approach to identification of Mycobacterium leprae-specific peptides as T-cell reagents. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5846–5855, 2000.

DUTHIE, M. S. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1400–1408, 2007.

DUTHIE, M. S. et al. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1659–1665, 2008.

FONSECA, A. B. D. 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. 5, 2017.

GELUK, A. et al. Rational combination of peptides derived from different Mycobacterium leprae proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of M. leprae infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 522–533, 2008.

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

GELUK, A. et al. ML1419c peptide immunization induces mycobacterium leprae-specific HLA-A*0201-restricted CTL in vivo with potential to kill live mycobacteria. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 187, n. 3, p. 1393–1402, 2011.

GELUK, A. et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 10, p. 4782–91, 2012a.

GELUK, A. et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. **The Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 10, p. 4782–91, 2012b.

GELUK, A. Biomarkers for leprosy: would you prefer T (cells)? **Leprosy review**, v. 84, n. 1, p. 3–12, 2013.

GOULART, I. M. B.; MINEO, J. R.; T, F. N. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-B1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 1, p. 330–334, 2000.

HAN, X. Y. et al. A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–864, 2008.

HAN, X. Y. et al. The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 8, p. 952–959, 2012.

HOOIJ, A. VAN et al. Quantitative lateral flow strip assays as User-Friendly Tools To Detect Biomarker Profiles For Leprosy. **Scientific Reports**, n. September, p. 2–11, 2016.

HOOIJ, A. VAN et al. Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil , China and Ethiopia. **Scientific Reports**, n. June, p. 1–9, 2018.

HOOIJ, A. VAN et al. Application of new host biomarker profiles in quantitative point-of-care tests facilitates leprosy diagnosis in the field. **EBioMedicine**, v. 2, n. xxxx, 2019.

HOUWELING, T. A J. et al. Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–28, 2016.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v. 147, n. 3, p. 728–735, 1981.

JIN, S.-H.; AN, S.-K.; LEE, S.-B. The formation of lipid droplets favors intracellular *Mycobacterium leprae* survival in SW-10, non-myelinating Schwann cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2017.

JORGE, B. et al. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. **PLoS Pathogens**, p. 1–29, 2017.

KERR-PONTES, L. R. S. et al. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: Results of a case-control study. **International Journal of Epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 994–1000, 2006.

KOUL, A. et al. INTERPLAY BETWEEN MYCOBACTERIA AND HOST SIGNALLING PATHWAYS. **Nature reviews Microbiology**, v. 2, n. March, 2004.

LAMBERT, S. A. et al. Review The Human Transcription Factors. **Cell**, v. 172, n. 4, p. 650–665, 2018.

LOPES, R. L. et al. Cytokine IL-10 is required for polarization of macrophages to M2-like phenotype by mycobacterial DnaK (heat shock protein 70). **Cytokine**, v. 85, p. 123–129, 2016.

LUCKHEERAM, R. V. et al. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

MARCOS, A.; NOVA, E.; MONTERO, A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, p. 66–69, 2003.

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 Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 Paradigm: Insights from Leprosy. **J invest Dermatol**, v. 102, p. 828–832, 1994.

NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 90–98, 2015.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin : An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes*. **The Jornal of Cancer Research**, p. 462–466, 1960.

OBUCHOWSKI, N. A.; BULLEN, J. A. Receiver operating characteristic (ROC) curves : review of methods with applications in diagnostic medicine Receiver operating characteristic (ROC) curves : review of methods with applications in diagnostic medicine. **Phys. Med. Biol.**, 2018.

PETITO, R. B. et al. Transforming growth factor- β 1 may be a key mediator of the fibrogenic properties of neural cells in leprosy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 72, n. 4, p. 351–66, 2013.

PINHEIRO, R. et al. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genet. **Future Microbiol**, v. 6, n. 2, p. 217–230, 2011.

PITT, J. M. et al. Blockade of IL-10 Signaling during *Bacillus Calmette-Guérin* Vaccination Enhances and Sustains Th1, Th17, and Innate Lymphoid IFN- γ and IL-17 Responses and Increases Protection to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **The jornal of immunology**, v. 189, p. 4079–4087, 2012.

REA, T. H.; JERSKEY, R. Clinical and histologic variations among thirty patients with Lucio's phenomenon and pure and primitive diffuse lepromatosis (Latapi's lepromatosis). **International Journal Of Leprosy**, v. 73, n. 3, p. 169–188, 2005.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. . H. Classification of Leprosy According to Immunity. **International Journal of Leprosy**, 1966.

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. 1–16, 2016.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, 2013.

SALGADO, C. G. et al. mirnome expression analysis reveals new Players on leprosy immune Physiopathology. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. March, p. 1–17, 2018.

SAMPAIO, L. H. et al. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 26,

2011.

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. **Human Immunology**, p. 40–49, 2017.

SILVA, D. et al. A whole blood assay as a simple, broad assessment of cytokines and chemokines to evaluate human immune responses to Mycobacterium tuberculosis antigens. **Acta Tropica**, v. 127, n. 2, p. 75–81, 2013.

SIMON, A. K. et al. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. **Proc. R. Soc. B**, p. 1–9, 2015.

SINSIMER, D. et al. Mycobacterium leprae actively modulates the cytokine response in naïve human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 293–300, 2010.

SONEGO, P.; KOCSOR, A.; PONGOR, S. ROC analysis : applications to the classification of biological sequences and 3D structures. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, n. 3, p. 198–209, 2008.

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 344–57, dez. 2011.

TANIUCHI, I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 579–601, 2018.

UPADHYAY, R. et al. Transcription factors STAT-4 , STAT-6 and CREB regulate Th1 / Th2 response in leprosy patients : effect of M . leprae antigens. **BMC infectious diseases**, p. 1–12, 2019.

VARGAS-OCAMPO, F. Diffuse leprosy of Lucio and Latapí: A Histologic study. **Leprosy Review**, v. 78, n. 3, p. 248–260, 2007.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of Mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biology**, v. 2, n. 8, p. reviews1023.1-reviews1023.8, 2001.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, v. 77–78, n. 1, p. 103–121, 2006.

WHO. **Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes** World Health Organization, 1982. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/38984>>

WHO. **Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy**, 2018.

WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **Weekly epidemiological record**, n. AUGUST 2019, p. 389–412, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A guide to eliminating leprosy as a public health problem**, 1998.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
VOLUNTÁRIOS COM IDADE IGUAL OU SUPERIOR A 18 ANOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Universidade Federal do Pará - URE Dr. Marcello Candia.

A equipe de pesquisadores liderada pelo Professor Dr. Claudio Guedes Salgado está realizando uma pesquisa cujo título é "**Hanseníase nos municípios do Pará: diagnóstico de novos casos, identificação de áreas críticas e treinamento de pessoal local para manutenção das estratégias de controle da doença**". Gostaríamos que você participasse desta pesquisa e para isso precisamos de sua autorização.

O estudo tem por objetivo identificar características relacionadas às pessoas, aos seus modos de vida, ao meio ambiente e à genética do micróbio que causa hanseníase, para entender melhor sobre a transmissão da doença, melhorando sua prevenção e tratamento.

As crianças e os adolescentes que participarem deste estudo serão submetidos à coleta de sangue e de raspado intradérmico, realizada por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificar o *Mycobacterium leprae*. Suas casas serão visitadas, para que seja feito um mapeamento dos casos de hanseníase por bairros e ruas.

A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável. A coleta de sangue e de raspado poderão causar dor e pequena reação no local.

A participação nessa pesquisa é voluntária e você participará apenas se você autorizar. Sempre que desejar, será fornecido esclarecimento sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, o participante poderá recusar-se a continuar o estudo e retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Está garantido o cumprimento do que fora informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identificação dos participantes.

Tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado, AUTORIZO A MINHA PARTICIPAÇÃO COMO VOLUNTÁRIO DESTA PESQUISA, SEM QUE ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Assinatura ou impressão dactiloscópica do participante

Doc: _____

Local: _____, Data: __/__/__

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
VOLUNTÁRIOS COM IDADE INFERIOR A 18 ANOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Universidade Federal do Pará - URE Dr. Marcello Candia.

A equipe de pesquisadores liderada pelo Professor Dr. Claudio Guedes Salgado está realizando uma pesquisa cujo título é “**Hanseníase nos municípios do Pará: diagnóstico de novos casos, identificação de áreas críticas e treinamento de pessoal local para manutenção das estratégias de controle da doença**”. Gostaríamos que seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade participasse desta pesquisa e para isso, precisamos de sua autorização.

O estudo tem por objetivo identificar características relacionadas às pessoas, aos seus modos de vida, ao meio ambiente e à genética do micróbio que causa hanseníase, para entender melhor sobre a transmissão da doença, melhorando sua prevenção e tratamento.

As crianças e os adolescentes que participarem deste estudo serão submetidos à coleta de sangue e de raspado intradérmico, realizada por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificar o *Mycobacterium leprae*. Suas casas serão visitadas, para que seja feito um mapeamento dos casos de hanseníase por bairros e ruas.

A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável. A coleta de sangue e de raspado poderão causar dor e pequena reação no local.

A participação nessa pesquisa é voluntária e seu filho participará apenas se você autorizar. Sempre que desejar, será fornecido esclarecimento sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, o participante poderá recusar-se a continuar o estudo e retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Está garantido o cumprimento do que fora informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identificação dos participantes.

Declaração de pais ou responsáveis

Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado,
AUTORIZO QUE MEU FILHO(A)
_____, PARTICIPE
DESTE ESTUDO, SEM QUE ISSO TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Assinatura ou impressão dactiloscópica do(a) pai/ mãe ou responsável legal.

Doc: _____

Local: _____, Data: __/__/__

ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Hanseníase nos municípios do Pará: diagnóstico de novos casos, identificação de áreas críticas e treinamento de pessoal local para manutenção das estratégias de controle da doença

Pesquisador: Claudio Guedes Salgado

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 26765414.0.0000.0018

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 517.394

Data da Relatoria: 28/01/2014

Apresentação do Projeto:

Mais de 80.000 casos de hanseníase foram diagnosticados nos últimos 20 anos no Pará, e ainda hoje, com um coeficiente de detecção anual de 50/100.000 habitantes (três vezes superior à média nacional) a doença permanece como um grave problema de saúde pública neste Estado. O objetivo geral deste estudo será avaliar a importância da epidemiologia espacial e sorológica anti-PGL-I no combate à hanseníase no Estado do Pará, especialmente no município de Breves. Inicialmente, realizaremos visitas domiciliares a famílias de pessoas afetadas pela hanseníase, diagnosticadas nos últimos cinco a seis anos. A equipe de pesquisadores com experiência no manejo da hanseníase, composta por médicos dermatologistas, enfermeiros, fisioterapeutas e técnicos de laboratório, realizará exame clínico dermatoneurológico em contatos intradomiciliares e em casos notificados além de coletar amostra de sangue para pesquisa sorológica de anticorpos IgM anti-PGL-I. adicionalmente, estudantes de escolas públicas do ensino fundamental e médio, com idade entre 6 e 20 anos, também serão selecionados aleatoriamente para serem submetidos

à mesma avaliação. As residências dos casos notificados, bem como a dos estudantes incluídos no estudo serão georreferenciadas para a análise da distribuição espacial da hanseníase.

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

Bairro: Campus Universitário do Guamá

CEP: 66.075-110

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3201-7735

Fax: (91)3201-8028

E-mail: cepccs@ufpa.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



Continuação do Parecer: 517.394

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Diagnosticar casos novos de hanseníase entre contatos de casos notificados e entre estudantes da rede pública de ensino fundamental e médio de diferentes municípios do Estado do Pará.

Objetivo Secundário:

i. Diagnosticar e encaminhar para tratamento os casos novos de hanseníase atendidos durante a semana de treinamento em serviço em cada município visitado; ii. Realizar o treinamento em serviço (manhã e tarde) de pelo menos 25 profissionais de saúde das diferentes categorias, de agentes comunitários a profissionais com nível superior de ensino; iii. Apresentar palestras de diferentes conteúdos relacionados a hanseníase, para públicos específicos de interesse do município, com o número de presentes limitado ao espaço físico disponível no local (noite). iv. Coletar plasma sanguíneo de todos os pacientes, comunicantes e escolares examinados, para análise da coorte a partir dos dados preliminares de 2011.v. Identificar áreas críticas e realizar treinamento de pessoal local para a manutenção das estratégias de controle da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Há risco mínimo de sangramento no local da punção para coleta de sangue e coleta de linfa.

Benefícios:

Todos os sujeitos da pesquisa serão avaliados por médicos dermatologistas e hansenólogos. Aqueles que forem diagnosticados com hanseníase serão notificados e iniciarão tratamento. Aqueles que não forem diagnosticados com hanseníase receberão os resultados dos exames e serão acompanhados em coorte.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo apresentado, dispõe de metodologia e critérios definidos, conforme resolução 466/12 do CNS/MS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão de acordo com os sugeridos pelo Sistema CEP/CONEP.

Recomendações:

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

Bairro: Campus Universitário do Guamá

CEP: 66.075-110

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3201-7735

Fax: (91)3201-8028

E-mail: cepccs@ufpa.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ - ICS/



Continuação do Parecer: 517.394

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto somos pela aprovação do projeto, Este é nosso parecer, SMJ.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELEM, 29 de Janeiro de 2014

Assinador por:
Wallace Raimundo Araujo dos Santos
(Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01-Sí do ICS 13 - 2º and.
Bairro: Campus Universitário do Guamá CEP: 66.075-110
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-7735 Fax: (91)3201-8028 E-mail: cepccs@ufpa.br