

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Enfermagem

**Expressão diferencial de biomarcadores imunológicos de infecção
subclínica em casos multibacilares de hanseníase e seus contatos
domiciliares**

Edson Alexandre de Queiroz

Belo Horizonte
Julho / 2019

Edson Alexandre de Queiroz

**Expressão diferencial de biomarcadores imunológicos de infecção
subclínica em casos multibacilares de hanseníase e seus contatos
domiciliares**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, da Escola de Enfermagem, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Enfermagem.

Linha de Pesquisa: Promoção da Saúde, Prevenção e Controle de Agravos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Corrêa de Oliveira

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Belo Horizonte

Julho / 2019

Q3e Queiroz, Edson Alexandre de.
Expressão diferencial de biomarcadores imunológicos de infecção subclínica em casos multibacilares de hanseníase e seus contatos domiciliares. / Edson Alexandre de Queiroz. - - Belo Horizonte: 2019. 128f.: il.
Orientador (a): Rodrigo Corrêa de Oliveira.
Coorientador (a): Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau.
Área de concentração: Epidemiologia, políticas e práticas de saúde das populações.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Hanseníase. 2. Saúde da Família. 3. Biomarcadores. 4. Infecções Assintomáticas. 5. Imunidade nas Mucosas. 6. Dissertação Acadêmica. I. Oliveira, Rodrigo Corrêa de. II. Estanislau, Juliana de Assis Silva Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: WC 335

Bibliotecário responsável: Fabiene Letizia Alves Furtado CRB-6/2745

Escola de Enfermagem da UFMG
Colegiado de Pós-Graduação em Enfermagem
Av. Alfredo Balena, 190 | 30130-100
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil
+55 31 3409-9836 | 31 3409-9889
caixa postal: 1556 | colpgrad@enf.ufmg.br

25
anos
1994 - 2019

enfermagem
pós-graduação • UFMG

UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

ATA DE NÚMERO 140 (CENTO E QUARENTA) DA SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA TESE APRESENTADA PELO CANDIDATO EDSON ALEXANDRE DE QUEIROZ PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENFERMAGEM.

Aos 15 (quinze) dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 13:30 horas, realizou-se no Anfiteatro da Pós-Graduação - 432 da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, a sessão pública para apresentação e defesa da tese "*EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS DE INFECÇÃO SUBCLÍNICA EM CASOS MULTIBACILARES DE HANSENÍASE E SEUS CONTATOS DOMICILIARES*", do aluno *Edson Alexandre de Queiroz*, candidato ao título de "Doutor em Enfermagem", linha de pesquisa "Promoção da Saúde, Prevenção e Controle de Agravos". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: Rodrigo Corrêa de Oliveira (orientador), Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (coorientadora), Ana Thereza Chaves, Angélica da Conceição Oliveira Coelho, Jacqueline Araújo Fiuza e Andréa Teixeira Carvalho, sob a presidência do primeiro. Abrindo a sessão, o Senhor Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

☒ APROVADA;
☐ REPROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Senhor Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Andréia Nogueira Delfino, Secretária do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 15 de julho de 2019.

Prof. Dr. Rodrigo Corrêa de Oliveira
Orientador (FIOCRUZ)

Profª. Drª. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau
(ICB/UFMG)

Profª. Drª. Ana Thereza Chaves
(UFMG)

Profª. Drª. Angélica da Conceição Oliveira Coelho
(UFJF)

Profª. Drª. Jacqueline Araújo Fiuza
(FIOCRUZ/ CPqRR)

Profª. Drª. Andréa Teixeira Carvalho
(FIOCRUZ/ CPqRR)

Andréia Nogueira Delfino
Secretária do Colegiado de Pós-Graduação

HOMOLOGADO em reunião do CPG
Em 05.08.19

Profª. Dra. Kênia Lara Silva
Coordenadora do Colegiado de Pós-Graduação em Enfermagem
Escola de Enfermagem da UFMG

EPÍGRAFE

Nada te perturbe, nada te amedronte.
Tudo passa, Deus não muda,
a paciência tudo alcança.
A quem tem Deus nada falta.
Só Deus basta!

Terezinha de Lisieux

“O mais importante e bonito do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais,
ainda não foram terminadas - mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam”.

João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Deus, presença constante e também distante... pela sua amizade e carinho desde sempre e para sempre... muito obrigado! Estamos em outras empreitadas!

Aos pacientes e seus contatos domiciliares que participaram desta pesquisa de maneira despojada e gratuita, meus sinceros agradecimentos.

À minha doce e suave Rosangela, meu amor... companheira, amiga... pelas ausências neste tempo longo, curto e difícil... obrigado pelo apoio e cumplicidades... Te amo cada dia mais!

À minha mãe Geralda, em quem me espelho e a quem devo muito de minha busca por tantas coisas nessa vida, inclusive pela busca de Deus, gratidão eterna!

À minha irmã Érika, grande tesouro que tenho, obrigado pela admiração e amizade!

Ao meu querido pai Nelson, que ao viajar sem combinar me deixou um vazio constante... mas também uma completude também constante de exemplos que, desde pequeno, fazem parte do mais profundo de mim... muito obrigado Sr. Nelson, pelos anos de prazer ao seu lado! Quanta saudade...

Aos Professores Rodrigo e Juliana, que sem conhecer minha pessoa acreditaram em mim, se dispuseram a me orientar e me ajudaram a chegar... mais uma vez!

Ao Professor Xico! Que abriu as portas do grupo de pesquisa e me incentivou a seguir.

À Nayara, Rafael, Bruna, Tereza, Isabela, Ana Paula, Rayssa, Eylen e todos que me ajudaram tanto neste caminho, principalmente a Nay... sem você ainda estaria caminhando!

A todos os integrantes do NEPHANS que partilharam o conhecimento e os trabalhos nestes anos de convívio!

Aos amigos Gustavo, João Batista, Silvano, Evanes, Ângelo! A todos os amigos do Hospital Odilon Behrens, da FUNEC e da FAPAM que me ajudaram e me incentivaram a chegar até aqui!

À Sociedade de São Vicente de Paulo pelos ensinamentos de caridade. Meu pai, grande vicentino, me ensinou esse bom propósito!

RESUMO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, com sintomatologia dermatoneurológica. Várias estratégias têm sido adotadas para o controle da hanseníase, porém o diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico. O desafio atual é identificar biomarcadores que possibilitem a identificação de parâmetros imunológicos de infecção subclínica e, em última análise, o diagnóstico precoce da hanseníase em indivíduos infectados e assintomáticos, para realização de imunoprevenção de forma oportuna quebrando, assim, a cadeia de transmissão do bacilo. Aprofundar nas diferenças entre casos índice multibacilares e seus contatos domiciliares foi a estratégia deste estudo, através da avaliação conjunta de parâmetros imunológicos gerais e específicos. **Objetivo:** o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil da resposta imune inata e adaptativa de casos multibacilares de hanseníase e seus contatos domiciliares para a identificação de parâmetros imunológicos de infecção subclínica. **Metodologia:** Para mensurar a expressão de moléculas de superfície foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo. Para dosar os níveis de citocinas e quimiocinas séricas foi utilizada a técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA). Os níveis de IgM anti PGL-1 foram mensurados pela técnica de ELISA. **Resultados:** Os níveis de IgM/IgG anti PGL-1, de linfócitos ativados T CD4⁺ e CD8⁺ e a frequência de monócitos circulantes estavam mais elevados em casos índice em relação aos seus contatos. A frequência de linfócitos T estava menor em casos índice MB. A distância imunológica entre casos e contatos domiciliares não foi significativa quando se avaliou em conjunto todos os parâmetros imunológicos. **Conclusão:** Nós inferimos, a partir dos parâmetros diferencialmente expressos em casos índice MB e contatos domiciliares, que a elevação da resposta humoral específica, o maior nível de ativação de linfócitos (com provável proliferação e diferenciação em células T efetoras e/ou de memória), a maior frequência de monócitos em trânsito no sangue periférico, podem ser opções de biomarcadores preditores de infecção subclínica em contatos domiciliares.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium leprae*, with dermatoneurological symptoms. Several strategies have been adopted for leprosy control, but the diagnosis of leprosy is essentially clinical. The current challenge is to identify biomarkers that enable the identification of immunological parameters of subclinical infection and, ultimately, the early diagnosis of leprosy in infected and asymptomatic individuals, to perform immunoprophylaxis in a timely manner, thus breaking the bacillus transmission chain. Deepening the differences between multibacillary index cases and their household contacts was the strategy of this study, through the joint evaluation of general and specific immunological parameters.

Objective: The aim of this study was to evaluate the profile of the innate and adaptive immune response of multibacillary leprosy cases and their household contacts for the identification of immunological parameters of subclinical infection. **Methodology:** To measure the expression of surface molecules, immunophenotyping was performed by flow cytometry. To measure serum cytokine and chemokine levels, the Cytometric Bead Array (CBA) technique was used. Anti-PGL-1 IgM/IgG levels were measured by ELISA. **Results:** Anti-PGL-1 IgM/IgG levels, CD4 + and CD8 + activated T lymphocytes and the frequency of circulating monocytes were higher in index cases compared to their contacts. The frequency of T lymphocytes was lower in MB index cases. The immunological distance between cases and home contacts was not significant when all immunological parameters were evaluated together. **Conclusion:** We infer from the differentially expressed parameters in MB index cases and household contacts that the elevation of specific humoral response, the highest level of lymphocyte activation (with probable proliferation and differentiation in effector and / or memory T cells), the higher frequency of peripheral blood transit monocytes, may be predictive biomarker options for subclinical infection in household contacts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da distribuição geográfica de casos novos de hanseníase no mundo no ano de 2016.

Figura 2 – Mapas do Brasil mostrando os *clusters* de alto risco de hanseníase

Figura 3 – Visão geral da resposta imune ao *M. Leprae*

Figura 4 - Representação esquemática de células T CD4+ (possivelmente) envolvidas no espectro da doença da hanseníase

Figura 5 – Sequência de execução da estratégia de análise para quantificar a porcentagem de expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 em neutrófilos.

Figura 6 – Sequência de execução da estratégia de análise para quantificar a porcentagem de expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 em monócitos.

Figura 7 – Sequência de execução da estratégia de análise para quantificar a porcentagem de expressão de CD25, CD28 e CTLA-4 em linfócito CD4+.

Figura 8 – Sequência de execução da estratégia de análise para quantificar a porcentagem de expressão de CD25, CD28 e CTLA-4 em linfócitos CD8+.

Figura 9. Avaliação imunofenotípica de neutrófilos e monócitos.

Figura 10. Avaliação imunofenotípica de linfócitos.

Figura 11. Avaliação dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas.

Figura 12. Avaliação dos níveis séricos de IgM/IgG anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID.

Figura 13 – Níveis de IgM (IE – índice ELISA) x tempo decorrido do início do tratamento medicamento em casos índice MB.

Figura 14 – Escalonamento multidimensional de casos e seus contatos domiciliares.

Figura 15

Figura 15A – Correlograma – Casos índice MB (CI)

Figura 15B – Correlograma - Contatos domiciliares (CD)

Figura 15C – Rede de correlações – Casos índice MB (CI)

Figura 15D – Rede de correlações - Contatos domiciliares (CD)

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1 - Características clínicas, epidemiológicas e demográficas dos casos-índice e seus contatos domiciliares.

TABELA 2 - Detalhamento das características clínicas, epidemiológicas de cada caso-índice.

TABELA 3 - Detalhamento das características clínico-epidemiológicas de cada contato domiciliar.

TABELA 4 – Variações da frequência (%) e da intensidade média de fluorescência (IMF) de neutrófilos e monócitos do sangue periférico de CI e CD.

TABELA 5 – Variações da frequência (%) e da intensidade média de fluorescência (IMF) de linfócitos do sangue periférico de CI e CD.

TABELA 6 – Variações em pg/mL dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas de CI e CD.

TABELA 7 – Variações em índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM/IgG anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID.

TABELA 8 – Comparação dos parâmetros imunológicos de casos índices MB por sexo

TABELA 9 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por sexo

TABELA 10 – Comparação dos parâmetros imunológicos de casos índice MB por presença de cicatriz de BCG

TABELA 11 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por presença de cicatriz de BCG

TABELA 12 – Comparação dos parâmetros imunológicos de casos índice MB por tempo de tratamento (em meses)

TABELA 13 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por grau de parentesco

TABELA 14 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por tipo de convívio

TABELA 15 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por tempo de convívio (em anos)

Quadro 1: Painel de anticorpos monoclonais utilizados para marcação das em linfócitos, monócitos, neutrófilos.

Quadro 2: Painel de marcação de anticorpos monoclonais utilizados para leitura no citômetro.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*

BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina sérica bovina)

BV421 – *Brilliant violet 421* (Brilhante violeta 421)

CBA - Cytometric Bead Array

CD – *Cluster of Differentiation* (Grupo de diferenciação)

CI – Caso Índice

CPqRR – Centro de Pesquisas René Rachou

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)

ENL – Eritema nodoso

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FITC – *Fluorescein isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)

FSC – *Forward Scatter* (Tamanho celular)

HLA-DR – *Human Leukocyte Antigen* (Antígeno de leucócito humano)

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

IMF – *Mean Intensity Fluorescence* (Intensidade média de fluorescência)

IP-10 - interferon- γ -induced protein-10 (CXCL10)

LID-1 - *Leprosy IDRI diagnostic 1*

MB – Forma multibacilar

MCP-1 - monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2)

MDT – Multidrogaterapia

MDS – Escalonamento multidimensional

MHC-II – Complexo de histocompatibilidade de classe II

MIG - monokine induced by interferon- γ (CXCL9)

NDOHSA – *Natural disaccharide linked to human serum albumin via octyl*

NDOLID – *Natural disaccharide octyl - Leprosy IDRI Diagnostic 1*

NK – Células Natural Killer

PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados à patógenos)

PB – Forma paucibacilar

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salínico)

PBS-P – PBS-W a 0,5% de saponina

PBS-W – PBS a 0,5% de albumina sérica bovina

PE – *Phycoerythrin* (Ficoeritrina)

PE-Cy7 – *Phycoerythrin cyanine 7* (Ficoeritrina cianina 7)

PerCP – *Peridinin Chlorophyll Protein* (Proteína piridina de clorofila)

PGL-1 – *Phenolic Glycolipid 1*

PQT - Poliquimioterapia

RR – Reação reversa

SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação

SSC – *Side Scatter* (Granulosidade celular)

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR – *T-cell receptor* (Receptor de células T)

TGF- β – *Transforming Growth Factor beta* (Fator transformante do crescimento beta)

TLR – *Toll-like receptor* (Receptor tipo Toll)

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor alpha* (Fator de Necrose Tumoral alfa)

Treg – Linfócito T regulador

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 HIPÓTESE.....	19
3 OBJETIVOS	20
4 REFERENCIAL TEÓRICO	21
4.1 HANSENÍASE	21
4.1.1 Etiologia, formas de transmissão.....	21
4.1.2 Aspectos clínicos e classificação.....	22
4.1.3 Epidemiologia da Hanseníase	23
4.1.4 Aspectos imunológicos da infecção pelo <i>M. leprae</i>	25
4.1.5 Diagnóstico	29
4.1.6 Tratamento e seus efeitos sobre a resposta imunológica na hanseníase	31
4.1.7 Imunoprofilaxia	33
4.1.8 Ações de controle e vigilância da hanseníase.....	34
5 METODOLOGIA.....	37
5.1 Tipo de estudo	37
5.2 Cenário do estudo	37
5.3 População de estudo	37
5.4 Variáveis do Estudo.....	39
5.4.1 Variáveis Independentes	39
5.4.1.1 Variáveis relacionadas aos casos índice MB.....	39
5.4.1.2 Variáveis relacionadas aos contatos domiciliares	39
5.4.2 Variáveis dependentes	39
5.5 Coleta de dados	39
5.5.1 Entrevista	40
5.5.2 Exame dermatoneurológico	40
5.5.3 Coleta de sangue	40
5.6 Análise de marcadores de superfície por reações de imunofluorescência através de citometria de fluxo	40
5.7 Estratégia de aquisição e análise do perfil de expressão de HLA-DR, CD80, CD86 em neutrófilos do sangue periférico por citometria de fluxo	43

5.8 Estratégia de aquisição e análise do perfil de expressão de HLA-DR, CD80, CD86 em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo	44
5.9 Estratégia de aquisição e análise do perfil de expressão de CD25, CD28 e CD152 em linfócitos T CD4 ⁺ CD3 ⁺ do sangue periférico por citometria de fluxo	45
5.10 Estratégia de aquisição e análise do perfil de expressão de CD25, CD28 e CD152 em linfócitos CD8 ⁺ CD3 ⁺ do sangue periférico por citometria de fluxo	46
5.11 Avaliação do padrão de citocinas e quimiocinas séricos	47
5.12 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> – ELISA	47
5.13 Tratamento e Análise dos dados.....	49
5.14 Aspectos Éticos.....	50
5.15 Limitações da Pesquisa	51
5.16 Benefícios Potenciais da presente Pesquisa	52
6 RESULTADOS	53
6.1 Descrição das características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos participantes do estudo.....	53
6.2 O perfil imunofenotípico de leucócitos é diferente entre casos índice MB e seus contatos domiciliares	57
6.3 O perfil de linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ ativados difere casos índice MB de seus contatos domiciliares	59
6.4 O perfil de citocinas e quimiocinas é semelhante em casos índice MB e seus contatos domiciliares	61
6.5 O perfil de IgM/IgG difere casos índice MB de seus contatos domiciliares.....	63
6.6 Os parâmetros imunológicos relativos às características clínicas e epidemiológicas de casos índice MB e seus contatos domiciliares são semelhantes.....	65
6.7 O Cenário imunológico geral de casos índice MB e seus contatos é semelhante	73
6.8 O perfil de correlações é diferente entre os parâmetros imunológicos analisados de casos índice MB e seus contatos domiciliares.....	75
7 DISCUSSÃO	80
8 CONCLUSÃO.....	86
9 REFERÊNCIAS	87
APÊNDICES	96
ANEXOS	124

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, com sintomatologia dermatoneurológica, caracterizada pelo aparecimento de manchas de diversos aspectos e formas, pela redução da sensibilidade periférica tátil, térmica, dolorosa e da força muscular nos membros (SCOLLARD et al., 2006).

A forma de transmissão mais provável se dá por meio das vias aéreas superiores, uma vez que o índice morfológico, relacionado à viabilidade do bacilo, é significativamente maior nas secreções de vias aéreas do que nas lesões (DAVEY; REES, 1974), além do contato diário entre pessoas (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

A hanseníase possui um período de incubação bastante variável, de 2 a 10 anos, com período menor nos casos em que a doença é menos agressiva (ARAÚJO, M. G., 2003; GOULART et al., 2002). Essa variação no período de incubação depende de vários fatores que podem influenciar diretamente nas manifestações clínicas da doença, a saber: fatores genéticos do hospedeiro (HAWN et al., 2007; JOHNSON et al., 2007; MISCH et al., 2010; MORAES et al., 2006), estado nutricional (MARTINEZ et al., 2009), carga bacilar do caso-índice, tempo de exposição (DOUGLAS et al., 2004), vacinação pelo *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (CONVIT, 1956), (BARRETO; PEREIRA; FERREIRA, 2006), a taxa de exposição ao bacilo em questão, fatores ambientais e condições socioeconômicas do indivíduo exposto (DUPPRE et al., 2008).

A manifestação clínica da doença apresenta um amplo espectro, variando de casos com poucas manchas/lesões na pele, poucos bacilos e vigorosa resposta imunológica (casos Paucibacilares - PB) a casos com incontáveis manchas/lesões e número elevado de nervos afetados, com alta taxa de bacilos e baixa resposta imunológica celular (casos Multibacilares - MB) (GOULART, 2002).

Apesar dos esforços para a redução das taxas de prevalência e detecção de casos novos, a hanseníase ainda persiste como um relevante problema de saúde pública em diversos países da Ásia, África e América Latina, como mostrado na figura 1. Pelo último relatório da Organização Mundial de Saúde de 2018, o Brasil vem apresentando redução progressiva do número de casos novos detectados anualmente (WHO, 2018). Em 2017, o Brasil contabilizou 26.875 casos novos, o que ainda representa 13% dos casos novos globais do mesmo ano, número muito expressivo (WHO, 2018). Os coeficientes de prevalência e de detecção são muito variáveis dependendo das regiões a serem analisadas

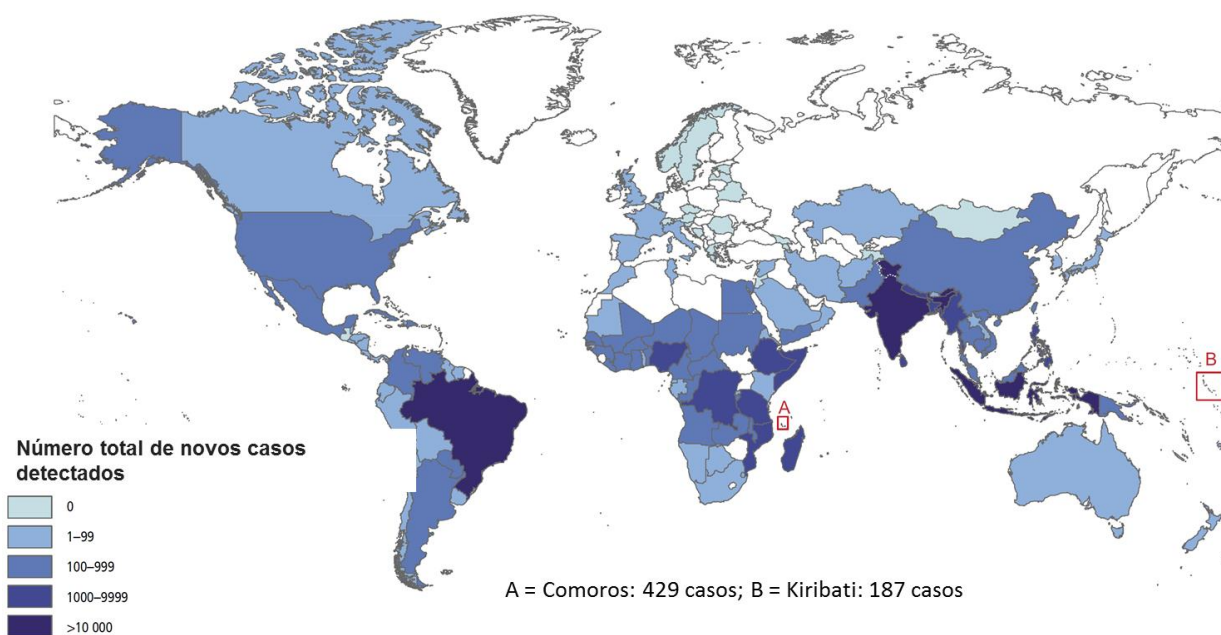


FIGURA 1 – Mapa da distribuição geográfica de casos novos de hanseníase no mundo no ano de 2107 – Fonte: OMS/Programa global de hanseníase. Adaptado de OMS, 2018 com traduções do autor.

Várias estratégias têm sido adotadas para o controle da hanseníase tais como educação em saúde; investigação epidemiológica para o diagnóstico oportuno de casos; tratamento até a cura; prevenção e tratamento de incapacidades; exame de contatos, orientações e aplicação de vacina BCG (BRASIL, 2016).

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico (ARAÚJO, 2003; BRASIL, 2016). No entanto, exames complementares como a baciloscopia, o exame histopatológico de tecido cutâneo e a reação de Mitsuda, podem ser utilizados para a confirmação do diagnóstico e para classificação dos pacientes (ARAÚJO, 2003).

Entretanto, estratégias adotadas atualmente e citadas acima não tem sido suficientes para garantir o diagnóstico precoce, pois são baseadas em parâmetros clínicos e, para tanto, se faz necessário a manifestação de sinais característicos da doença, atrasando assim, o diagnóstico e aumentando a possibilidade de transmissão da infecção (NATH; SAINI; VALLURI, 2015).

O desafio atual é identificar biomarcadores que possibilitem a identificação de parâmetros imunológicos de infecção subclínica e, em última expectativa o diagnóstico precoce da hanseníase em indivíduos infectados e assintomáticos, para realização de imunoprofilaxia de forma oportuna quebrando, assim, a cadeia de transmissão do bacilo. A infecção subclínica está presente quando o *M. leprae* está replicando e invadindo o hospedeiro

sem ainda causar sintomas clínicos, assim biomarcadores para infecção precoce seriam detectados (GELUK, 2013).

A utilização de outros testes, além da avaliação periódica por exame clínico dos contatos, como o detalhamento da sua resposta imune e do seu estado bacteriológico pode contribuir para identificação de indivíduos infectados e de novos casos de hanseníase (CARDONA-CASTRO et al., 2005). Faz-se necessário, portanto, aprimorar e desenvolver novas tecnologias para o diagnóstico precoce da hanseníase, integrando outras áreas do conhecimento, tais como biologia molecular, genética e imunologia, uma vez que essas podem contribuir para a detecção precoce de casos novos.

A resposta imune tem sido apontada como um dos componentes decisivos no desenvolvimento da hanseníase, pois essa resposta pode determinar a gravidade da doença, através da produção de citocinas e consequente polarização de formas clínicas. Vários tipos celulares estão envolvidos na imunopatologia da hanseníase e desempenham papel relevante neste contexto (NATH et al., 2015).

O resultado clínico após a infecção pelo *M. leprae* é determinado pelo equilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias e pela produção de anticorpos. Portanto, o balanço de citocinas e quimiocinas, representa um elemento chave no estabelecimento e na manutenção dos diferentes graus de infecção em geral e especificamente pode determinar as formas clínicas da hanseníase (SADHU; MITRA, 2018).

Além dos marcadores sorológicos citados acima, outros podem ajudar a compor um perfil para a identificação precoce dos indivíduos infectados. Em relação às respostas celulares, exacerbada em casos paucibacilares e com baixa resposta humoral, estudos têm focado em antígenos proteicos que podem ativar células T específicas induzindo, por exemplo, a produção de IFN- γ , IL-1 β , IL-17, IL-6, TNF- α , IL-10, TGF- β , MCP-1, IP-10, MIP-1 β em indivíduos infectados (GELUK, 2013; GELUK et al., 2012). Porém a quantificação dessas citocinas e quimiocinas após estimulação específica é muito variável, a depender dos antígenos utilizados e das populações de contatos domiciliares, com respostas celulares que não apresentam certo padrão, o que dificulta a descoberta de marcadores que se destacam em grupos populacionais distintos.

Apesar da necessidade premente de identificação de indivíduos infectados pelo *M. leprae*, faltam testes de campo de fácil aplicação com sensibilidade aprazível e biomarcadores conhecidos para prever a progressão da doença em indivíduos infectados. Um teste largamente utilizado em trabalhos de campo é a identificação sorológica para detectar IgM contra o PGL-1 (glicolípido fenólico-1) o qual é útil para identificar contatos de pacientes

multibacilares. Esses pacientes possuem vigorosa resposta humoral e fraca resposta mediada por células, com baixo valor preditivo em contatos de paciente paucibacilar e até mesmo reatividade negativa em casos de hanseníase paucibacilar (CHANTEAU et al., 1993). Outros marcadores sorológicos têm sido testados a fim de ampliar e melhorar as opções em termos de especificidade e sensibilidade (CARVALHO et al., 2017).

Todo esse esforço de monitorar a resposta imune é com intuito de ampliar as possibilidades de identificar indivíduos infectados e com infecção subclínica, além de auxiliar na classificação dos casos.

Aprofundar as diferenças entre casos índices MB e seus contatos domiciliares foi a estratégia deste estudo, através da avaliação conjunta e correlacionada de parâmetros imunológicos, como os anticorpos IgM contra o PGL-1, e outros prováveis a partir do aprofundamento da expressão diferencial das moléculas, além do perfil de ativação celular. Por fim a dosagem comparativa de citocinas/quimiocinas permitirá o estabelecimento de um padrão/perfil da resposta imune, em pacientes com hanseníase e seus contatos domiciliares. Além disso, pretende-se avaliar a associação desta resposta com variáveis sociodemográficas e clínico-epidemiológicas dos casos-índice e seus contatos domiciliares. Considera-se contato domiciliar toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o doente de hanseníase. Contato social é qualquer pessoa que conviva ou tenha convivido em relações familiares ou não, de forma próxima e prolongada. Os contatos sociais, que incluem vizinhos, colegas de trabalhos e de escola, entre outros, devem ser investigados de acordo com o grau e tipo de convivência, ou seja, aqueles que tiveram contato muito próximo e prolongado com o paciente não tratado. Atenção especial deve ser dada aos contatos familiares do paciente (pais, irmãos, avós, tios etc.) (BRASIL, 2016).

2 HIPÓTESE

O perfil da resposta imune é diferenciado entre casos índice multibacilares de hanseníase e seus contatos domiciliares, em uma análise transversal, e está relacionado com variáveis clínicas e epidemiológicas.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil da resposta imune inata e adaptativa de casos multibacilares (MB) de hanseníase e seus contatos domiciliares para a identificação de possíveis biomarcadores imunológicos de infecção subclínica diferencialmente expressos.

Objetivos específicos

- Avaliar a expressão das moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD56, CD28, CD80, CD86, HLA-DR, CD25, CTLA-4) em células da imunidade inata e adaptativa de casos MB e seus contatos domiciliares de hanseníase;
- Avaliar os níveis séricos de citocinas (IL-17A, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF) e quimiocinas (CXCL8/IL-8, CXCL9-MIG, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10) de casos MB e seus contatos domiciliares de hanseníase;
- Avaliar a reatividade de IgM contra os antígenos LID-1, NOD-HSA e IgM/IgG contra NDO-LID, em casos MB e seus contatos de hanseníase;
- Correlacionar a expressão das moléculas de superfície com os níveis séricos de citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas;
- Associar a resposta imune às variáveis clínicas, epidemiológicas e sociodemográficas dos casos índice e seus contatos domiciliares.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 HANSENÍASE

4.1.1 Etiologia, formas de transmissão

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, causada pelo bacilo *M. leprae*, com sintomatologia dermatoneurológica, caracterizada pelo aparecimento de manchas de diversos aspectos e formas, pela redução da sensibilidade periférica tátil, térmica, dolorosa e da força muscular nos membros (SCOLLARD et al., 2006).

O agente etiológico da hanseníase é o *M. leprae* que possui forma de bastonete com dimensões de 1 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura. O *M. leprae*, ou bacilo de Hansen, é uma bactéria intracelular obrigatória. Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos os bacilos são vistos isolados, em agrupamentos variados ou em arranjos especiais denominados globias, peculiar do *M. leprae*, que resultam da sólida união de bacilos através de uma substância chamada gléia. O *M. leprae* tem a característica de ser um bacilo gram-positivo, álcool-ácido resistente (BAAR) e de reproduzir por divisão binária (SCOLLARD et al., 2006).

Alguns fatores dificultam o avanço nas pesquisas em hanseníase. O primeiro é ausência de bons modelos experimentais. Shepard em 1960 conseguiu, com a injeção de bacilos por via intradérmica na pata de camundongo, a criação do único modelo animal disponível atualmente (SHEPARD, 1960). A outra dificuldade é o cultivo do bacilo em modelos animais. Após inúmeras tentativas em várias espécies animais, o tatu apresentou características fisiológicas que proporcionaram o seu cultivo para fins de pesquisa. Em 1971 conseguiu-se infectar tatus, os quais apresentaram comprometimento de pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971).

A análise bioquímica mostrou que a parede celular do *M. leprae* é composta por estruturas macromoleculares altamente complexas, ricas em glicídeos conjugados com lipídios. O glicolípídeo mais específico, associado à parede celular do bacilo, é o glicolípídeo fenólico I (PGL-I), utilizado como agente imunogênico durante experimentos *in vitro* (YOUNG; BUCHANAN, 1983). O PGL-1 está envolvido com o dano das células de Schwann, com consequente lesão dos nervos periféricos (NG et al., 2000). Mais recentemente

houve a demonstração de que a infecção pelo *M. leprae* induz à desmielinização e este fenômeno é dependente de PGL-1, o qual é o estímulo para o macrófago produzir óxido nítrico em excesso, prejudicando os nervos periféricos pelo dano causado às mitocôndrias do neurônio, com consequente morte celular (MADIGAN et al., 2017).

A forma de transmissão mais provável é por meio das vias aéreas superiores, pois o índice morfológico, índice relacionado à viabilidade do bacilo, é significativamente maior nas secreções de vias áreas do que nas lesões hansênicas (DAVEY; REES, 1974). Os mesmos autores relataram sobrevivência do bacilo de até uma semana no meio ambiente, ao abrigo da luz. Em trabalho de revisão sobre as formas de transmissão do bacilo, BRATSCHI e colaboradores (2015) mostram que o bacilo pode ser transmitido pela deposição na mucosa respiratória, penetração por feridas provenientes de lesões por objetos inanimados ou por picadas de insetos (BRATSCHI et al., 2015; HASTINGS et al., 1988). Os estudos são unânimes em afirmar que o contato próximo e prolongado é essencial para a transmissão do bacilo.

A hanseníase possui, na literatura, ampla variação em relação ao período de incubação. Os estudos mostram um período de 2 a 10 anos, com período menor nos casos paucibacilares, a forma mais branda da doença (ARAUJO, M. G., 2003; FINE, 1982; GOULART et al., 2002; VAN BEERS; DE WIT; KLATSER, 1996).

Essa variação no período de incubação depende de vários fatores que podem influenciar diretamente nas manifestações clínicas da doença, tais como fatores genéticos do hospedeiro (MORAES et al., 2006; MISCH et al., 2010, HAWN et al., 2007; JOHNSON et al., 2007), estado nutricional (MARTINEZ et al., 2009), carga bacilar do caso-índice, tempo de exposição (DOUGLAS et al., 2004), vacinação pelo *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (CONVIT, 1956; BARRETO et al., 2006), a taxa de exposição ao bacilo em questão, fatores ambientais e condições socioeconômicas do indivíduo exposto (DUPPRE et al., 2008).

4.1.2 Aspectos clínicos e classificação

A manifestação clínica da doença apresenta um espectro amplo, variando de casos com poucas manchas/lesões na pele, baixo índice baciloscópico e vigorosa resposta imunológica celular (paucibacilar - PB), a casos com incontáveis manchas/lesões e número elevado de nervos afetados, com alto índice baciloscópico e elevada resposta imunológica humoral (multibacilar - MB) (GOULART et al., 2002).

A classificação das manifestações clínicas da hanseníase obedece a critérios clínicos e histológicos. A Classificação de Madri, em 1953, apresentou quatro formas de classificação da doença: tuberculóide, indeterminada, dimorfa e virchoviana (Madrid Congress, 1953). Ridley e Jopling (1966), usando critérios clínico-histopatológicos, aprimoraram a classificação anterior, aumentando para cinco os níveis de classificação: tuberculóide, tuberculóide-dimorfa, dimorfa-dimorfa, dimorfa-virchoviano, virchoviano-virchoviano (RIDLEY; JOPLING, 1966). Devido à dificuldade global de realização dos testes histopatológicos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs, no ano de 1982, uma classificação operacional simplificada, baseada em critérios clínicos, dividindo a doença nas formas paucibacilar (correspondente a tuberculóide e indeterminada na classificação de Madri e tuberculóide, tuberculóide-dimorfa na classificação de Ridley e Jopling) e multibacilar (correspondente às formas dimorfa e virchoviana na classificação de Madri e dimorfa-dimorfa, dimorfa-virchoviana, virchoviana - virchoviana na classificação de Ridley e Jopling), o que promoveu a reorientação na classificação e na forma do esquema terapêutico, apresentando esse novo programa de classificação uma redução significativa do número de casos em todo mundo (WHO, 1982).

4.1.3 Epidemiologia da Hanseníase

Apesar dos esforços para a redução das taxas de prevalência e detecção de casos novos, a hanseníase ainda persiste como um relevante problema de saúde pública em diversos países da Ásia, África e América Latina. Pelo último relatório da Organização Mundial de Saúde, de 2016, o número global de casos caiu de 265.661 em 2006 para 210.671 casos novos em 2017, uma redução de 21% do número global de casos novos. O Brasil ocupa uma incômoda segunda posição no ranking global, com 13% dos casos globais (WHO, 2018).

O Brasil, a exemplo do resto do mundo, também vem apresentando redução progressiva do número de casos novos detectados anualmente. Em 2006 o número de casos foi de 44.436 e em 2017 o Brasil contabilizou 26.875 casos novos, uma redução de 41%, uma queda mais acentuada que a média global. Ainda mais, o Brasil, juntamente com 7 países tiveram aumento de casos novos entre os anos de 2016 para 2017 (WHO, 2018).

Os coeficientes de prevalência e de detecção são muito variáveis dependendo das regiões a serem analisadas. No Brasil, em 2012, a taxa de detecção geral de casos novos foi de 17,17/100.000 hab., o que corresponde a um padrão alto de endemicidade pelos parâmetros da

Organização Mundial da Saúde. A redução desta taxa de 2003 a 2012 correspondeu a 41%, dessa forma, este parâmetro apresenta tendência constante no Brasil, contudo, nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte ainda permanecem com padrão alto de endemidade, apresentando, respectivamente, taxas de 25,78/100.000 hab., 40,04/100.000 hab. e 42,24/100.000 hab. As regiões Sul e Sudeste apresentam parâmetros médios de endemidade, com taxas de, respectivamente, 4,83/100.000 hab. e 6,60/100.000 hab. A taxa de detecção em menores de 15 anos indica focos de infecção ativos e transmissão recente. Essa taxa apresentou queda constante ou estacionária em todos os estados da federação. A média da taxa de detecção foi de 5,77 por 100 mil habitantes entre os anos de 2001-2016 (SCHNEIDER; FREITAS, 2018). Os casos novos diagnosticados com grau II de incapacidade no Brasil teve aumento entre os anos de 2016 e 2017, indicando regressão na eficiência do controle da doença e atraso no diagnóstico (WHO, 2018).

Com a finalidade de melhor operacionalização do controle e eliminação da hanseníase no Brasil foram identificados *clusters*, que delimitam áreas de maior risco, onde se concentram a maioria dos casos de hanseníase, permitindo assim a orientação dos programas de controle, com enfoque em espaços geograficamente contínuos e maior efetividade e eficiência epidemiológicas (BRASIL, 2008). Dentre os clusters atualmente existentes, a partir da análise dos casos notificados no período de 2007 a 2009, está o *cluster* nº 6 que engloba municípios dos estados Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo (figura 2) (BRASIL, 2010).

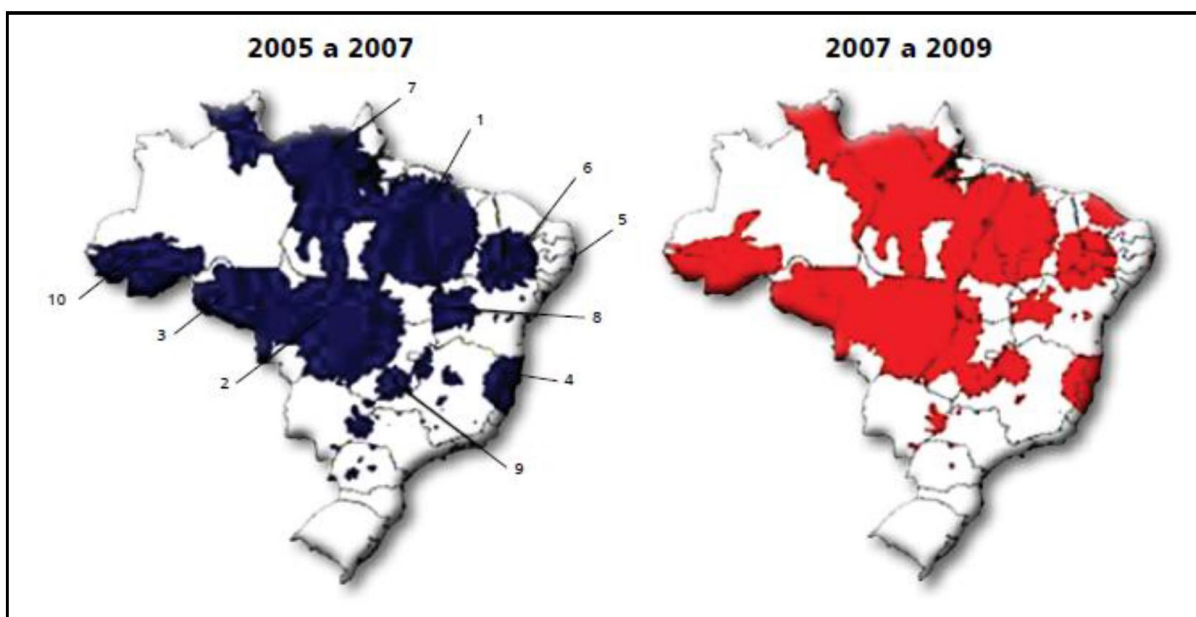


FIGURA 2 – Mapas do Brasil mostrando os *clusters* de alto risco de hanseníase – 2005 – 2007 e 2007 – 2009. (BRASIL, 2010).

4.1.4 Aspectos imunológicos da infecção pelo *M. leprae*

A resposta imune tem sido apontada como um dos componentes decisivos no desenvolvimento ou não da hanseníase, pois pode determinar a gravidade da doença pela competência de produção de citocinas e consequente polarização das formas clínicas da doença. Vários tipos celulares estão envolvidos na imunopatologia da hanseníase e desempenham papel relevante neste contexto (SADHU; MITRA, 2018).

Os macrófagos apresentam papel de destaque no contexto de interação com vários antígenos, dentre eles o bacilo da hanseníase. Os macrófagos atuam tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, apresentando antígenos do bacilo, produzindo citocinas e sendo ativados por linfócitos, a fim de promover o englobamento bacilar na tentativa de extirpar o agente bacteriano pela produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (GINHOUX; JUNG, 2014). Quando existe falha na ativação dos macrófagos, pelos linfócitos T, esses não conseguem eliminar os bacilos, ocorrendo sua proliferação e consequente evolução para as formas mais graves da hanseníase. O balanço de citocinas influencia diretamente no aspecto quantitativo e qualitativo da ativação do macrófago (BRITO DE SOUZA, 2014).

Os neutrófilos também atuam na fase inicial da interação do bacilo com o hospedeiro, rotineiramente chamada de imunidade inata, em ambas as fases efetuando fagocitose e ou lisando os bacilos, além de produzir mediadores que desencadeiam a inflamação para consequente evolução da resposta imune (BRITO DE SOUZA, 2014). Tanto neutrófilos, quanto macrófago possuem padrões moleculares associados a patógenos que permitem a interação destes com as moléculas da parede celular do bacilo. A interação dessas moléculas com o domínio extracelular dos TLRs (*Toll-like receptors*) das células do hospedeiro leva à ativação de uma via de sinalização e à expressão de quimiocinas e citocinas. Essas por sua vez ajudam a orquestrar a resposta imune a fim de ativar outros fagócitos com o objetivo de extirpar o bacilo.

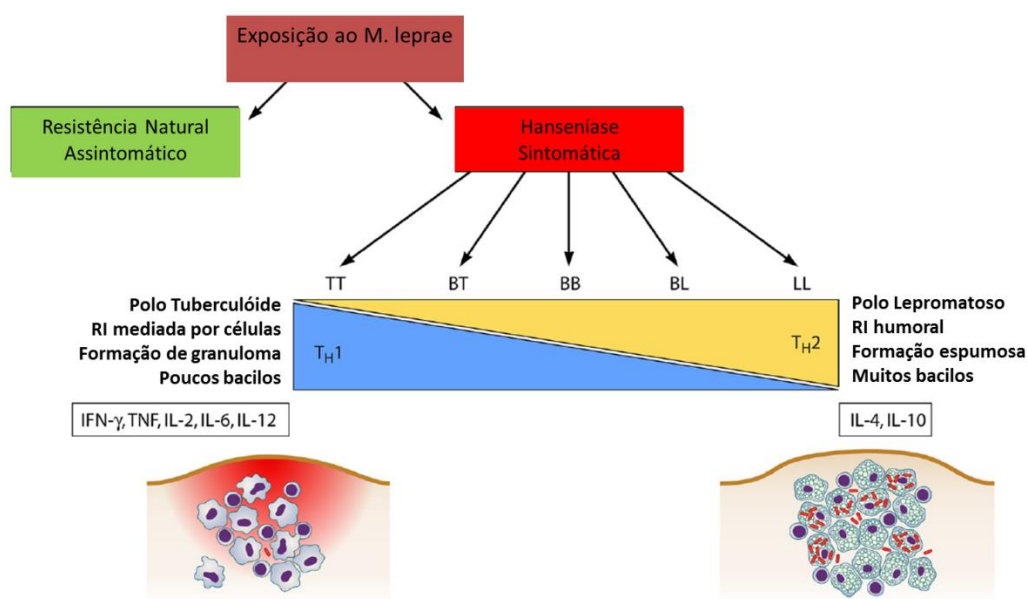


FIGURA 3 – Visão geral da resposta imune ao *M. Lepra* a partir da exposição ao bacilo com desfecho assintomático e sintomático, mostrando o espectro da doença, os tipos celulares e as citocinas envolvidas. Por fim o fenótipo histológico tecidual observado em cada polo clínico da hanseníase. Traduzido e modificado a partir de MISCH et al. 2010.

As citocinas e quimiocinas servem como marcadores que geram informações sobre o status da resposta imune e também como desfecho daquela resposta de interação entre o organismo e qualquer agente infeccioso. Mais recentemente, tem-se atribuído à produção conjunta e diferenciada de citocinas a definição de padrões de resposta de células T CD4⁺, essenciais na montagem de uma resposta que interaja de maneira eficiente com o patógeno, uma vez que as células T CD4⁺ virgem são ativadas devido à interação com o complexo antígeno-MHC, diferenciando-se em subtipos específicos, dependendo principalmente do microambiente celular e das citocinas ali presentes. As manifestações da hanseníase são classificadas ao longo de um espectro clínico de tuberculóide (TT), tuberculóide-dimorfa (BT), dimorfa-dimorfa (BB), dimorfo-virchoviana (LB) e hanseníase virchoviana (LL) (RIDLEY; JOPLING, 1966). Cada pólo está associado a um perfil imunológico celular ou humoral característico (**Figura 3**). A resposta mediada por células (Th1) do pólo TT caracteriza a eliminação ou contenção do organismo em granulomas, enquanto a resposta humoral ineficaz no polo LL (Th2) permite a proliferação de micobactérias dentro e ao redor de macrófagos espumosos. Reações Reversa (RR) refletem uma mudança repentina em direção ao pólo Th1 do estado BT, BB ou BL e podem levar a dano irreversível do nervo (neurite). As reações do *Erythema nodosum leprosum* (ENL) ocorrem em pacientes com hanseníase BL ou LL e refletem um aumento nas respostas mediadas por células e pelas

imunoglobulinas produzidas em resposta ao *M. leprae*. O ENL está associado à liberação sistêmica de TNF e IL-4, um influxo de leucócitos polimorfonucleares vivos (PMN) e deposição do complexo antígeno-anticorpo (Ag / Ac). Todos esses critérios definem o pólo de resistência (tuberculóide) ou susceptibilidade (virchoviana). O mecanismo de lesão do nervo não é claro, mas pode envolver lesão imune devido à liberação de citocinas inflamatórias ou atividade de células T citotóxicas, isquemia devido a edema dentro da bainha perineural, apoptose ou desmielinização (LUCKHEERAM et al., 2012; MISCH et al. 2010; SAINI; RAMESH; NATH, 2013).

Além disso, o paciente com hanseníase virchoviana (multibacilar) apresenta uma vigorosa resposta humoral com produção crescente de anticorpos. Mais recentemente, outras populações celulares têm sido implicadas na resposta imune: linfócitos Th17, relacionados à hanseníase do tipo tuberculóide com produção de IL-17A e IL-17F desempenhando um papel concorrente de proteção ao perfil celular Th1. Linfócitos T reguladores (Treg) apresentam expressão aumentada de citocinas IFN- γ , TGF- β e IL-10, ambas fortemente supressoras da resposta imune celular, portanto relacionados com pacientes na forma multibacilar, os quais apresentam lesões do tipo virchoviana e em grande quantidade. Ainda existem pacientes que não apresentam resposta imune polarizada, sendo considerados Th0, produzindo elevadas quantidades de IFN- γ e IL-4, ampliando a variedade da resposta imunológica na hanseníase (FONSECA et al., 2017; GELUK, 2013; SAINI et al., 2017). A **figura 4** apresenta uma visão geral da reposta imune adaptativa à hanseníase.

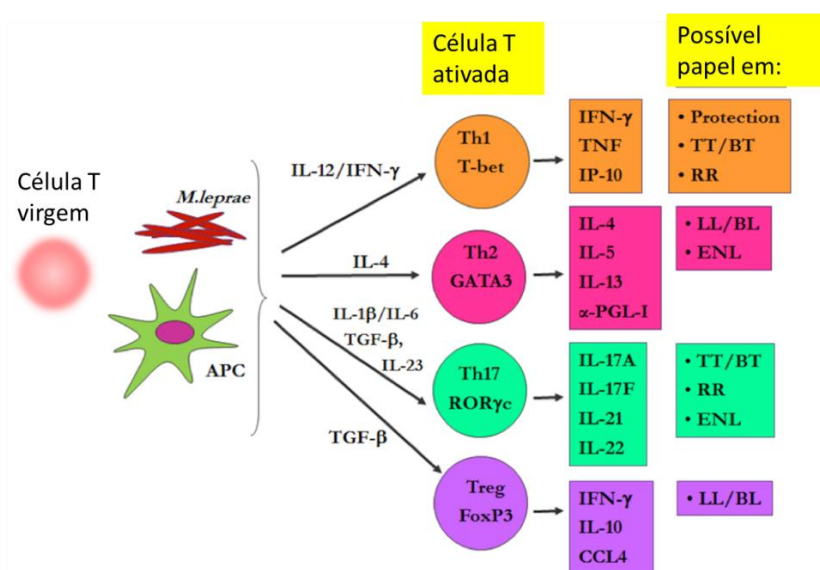


Figura 4 - Representação esquemática de células T CD4+ (possivelmente) envolvidas no espectro da doença da hanseníase. Fatores de transcrição (T-bet, GATA3, ROR γ c e FoxP3) para todos os tipos de células T. APC: Célula apresentadora de antígeno; IL: Interleucina; LL/BL/BT/TT: formas clínicas da Hanseníase; ENL: eritema nodoso; RR: reação reversa. (Modificado de GELUK, 2013).

Em biópsias de lesões tuberculóides foi encontrada uma proporção de células T CD4⁺ duas vezes maior que T CD8⁺, já em lesões virchovianas foi encontrado o contrário (MODLIN et al., 1986). A ocorrência, nas lesões, de células T de memória é 14 vezes maior que a de células T virgem, enquanto que no sangue essa proporção é igual, ou seja, 1:1 (MODLIN et al., 1988).

Quanto ao perfil de citocinas, através de análise de RNA mensageiro em biópsias de paciente com as formas clínicas tuberculóide e virchoviano, encontrou-se predomínio de RNA mensageiro de IL-2 e IFN- γ em lesões tuberculóides e IL-4, IL-5 e IL-10 em lesões virchovianas (YAMAMURA et al., 1991).

Pelo exposto acima se constata a importância desses tipos celulares que interagem com o bacilo a fim de evitar sua replicação no hospedeiro. Também o microambiente imunológico em geral, no contexto da hanseníase, é bem diverso e por vezes esse ambiente tecidual pode repercutir em nível plasmático e fornecer um cenário de informações que evidencie pistas para caracterizar diversamente a imunopatologia da hanseníase.

Apesar do diagnóstico da hanseníase atualmente ser essencialmente clínico se constata o esforço da comunidade científica na procura por biomarcadores de infecção subclínica, os quais devem estar presentes em casos de hanseníase em ambas as formas clínicas. Esses biomarcadores estão presentes em menor expressão nos contatos domiciliares, porém a avaliação conjunta e correlacionada da resposta imune celular, a quantificação do perfil de citocinas e quimiocinas e, por fim, a resposta humoral (sorológica) ainda não foi realizada de maneira ampla, avaliando amplo número de tipos celulares, de forma que ainda não se sabe se essas moléculas, de superfícies celulares e sorológicas, podem apresentar valor preditivo para caracterizar o desenvolvimento da hanseníase. A avaliação conjunta e correlacionada de biomarcadores clássicos, como o PGL-1, e os “novos e prováveis”, permitirá o estabelecimento de um padrão/perfil da resposta imune, em pacientes com hanseníase e seus contatos domiciliares, e a associação desta com variáveis sociodemográficas e outras características clínico-epidemiológicas do caso-índice e seus contatos. Todos esses esforços são na tentativa de melhor caracterização de um novo caso de hanseníase o mais precocemente, a fim de programar a quimioprofilaxia oportuna, quebrando a cadeia de transmissão do bacilo e reduzindo os casos da doença.

4.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, realizado por meio da anamnese e pelo exame físico dermatoneurológico, na busca por lesões de formas e aspectos variados, com alteração da sensibilidade tátil e térmica, comprometimento de nervos periféricos, com alterações anatômicas, motoras e sensitivas. No entanto, exames complementares como a baciloscopia, o exame histopatológico de tecido cutâneo e a reação de Mitsuda, podem ser utilizados para a confirmação do diagnóstico e para classificação dos pacientes no espectro proposto da doença (ARAUJO, M. G., 2003).

Entretanto, essas estratégias não tem sido suficientes para garantir o diagnóstico precoce, pois são baseadas em parâmetros clínicos e para tanto se faz necessário a manifestação de sinais característicos da doença, atrasando assim o diagnóstico e aumentando a possibilidade de transmissão da infecção (NATH et al., 2015).

O desafio atual, consensual entre vários estudiosos, é identificar novas ferramentas que possibilitem a realização do diagnóstico da hanseníase em indivíduos infectados e assintomáticos, para realização de imunoprofilaxia de forma oportuna quebrando, assim, a cadeia de transmissão do bacilo.

A manutenção de indivíduos infectados, assintomáticos e não diagnosticados na população é influenciada pelo longo período de incubação do bacilo, variando de 2 a 10 anos, pela cronicidade dos sinais e sintomas clínicos, geralmente lentamente manifestados (SAMPAIO; RIVITTI, 2007; VAN BEERS et al., 1999), pela dificuldade operacional dos serviços de saúde (LANZA; LANA, 2011), pelo desconhecimento, por parte da população e dos serviços de saúde, das manifestações clínicas da doença e, por fim, pelo estigma histórico inerente e indissociável da doença (BRASIL, 2008).

Os primeiros estudos de infecção subclínica foram feitos com uma metodologia que induzia a transformação de linfócitos, a qual media a resposta própria ao *M. leprae*. Essa transformação nos contatos era dependente da forma clínica do caso e do tempo de convívio, usada, sobretudo, para verificar a resposta imune celular (GODAL; NEGASSI, 1973).

A falta de sensibilidade e especificidade nos teste de lepromina, de transformação de linfócitos e o de inibição de migração de leucócitos incorria na reação cruzada com as respostas promovidas pelo *M. tuberculosis* (ABE et al., 1980). ABE et al. utilizou um teste sorológico de absorção de anticorpo fluorescente específico para hanseníase, o qual alcançou sensibilidade de 100% para casos com a forma multibacilar da doença e de 80% para casos com a forma paucibacilar, além de negatividade para pacientes portadores de tuberculose

pulmonar e em indivíduos saudáveis que não tiveram contato com indivíduos hansênicos. Em contatos domiciliares de casos multibacilares o teste apresentou 91,9% de positividade (ABE et al., 1980).

Posteriormente, com o aperfeiçoamento da técnica de absorbância (ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) os estudos ganharam força, com consequente desenvolvimento de testes cada vez mais sensíveis e específicos. Os resultados de Wu e colaboradores demonstraram gradual aumento dos níveis de anticorpos ao longo do espectro da doença, com valores bem elevados nos pacientes do polo virchoviano decrescendo para os pacientes do polo tuberculóide (WU et al., 1985). Um teste largamente utilizado em trabalhos de campo é a identificação sorológica para detectar IgM contra o PGL-1 (glicolípido fenólico-1), um glicolípido específico para o bacilo, que é mais útil para identificar contatos de pacientes multibacilares, os quais possuem vigorosa resposta sorológica e fraca resposta mediada por células, com baixo valor preditivo em contatos de paciente paucibacilar e até mesmo reatividade negativa em casos de hanseníase paucibacilar (CHANTEAU et al., 1990a;1990b; CHANTEAU et al., 1993). Ao mesmo tempo houve o incremento de outros antígenos, como o *Natural Disaccharide Octyl Bovine Serum Albumin* (ND-O-BSA). Novamente Wu e seus colaboradores mostraram alta correlação positiva entre os antígenos utilizados (WU, 1987; WU; YE; LI, 1988). Outros antígenos mais recentemente produzidos foram o LID-1 (*Leprosy IDRI diagnostic 1*) e o NDOLID (*Natural disaccharide octyl - Leprosy IDRI Diagnostic-1*), com sensibilidade e especificidades acima de 95% contra IgM e IgG (DUTHIE et al., 2014; DUTHIE et al., 2007).

Recente estudo demonstrou que ao se analisar outros antígenos, tais como NDOHSA, LID-1 e NDOLID, estes se encontram mais elevados nos casos em tratamento do que naqueles tratados e menores ainda em contatos domiciliares (FABRI et al., 2015). Isso amplia as possibilidades de identificar indivíduos infectados e como estratégia de vigilância de contatos domiciliares, além de serem auxiliares para determinar a classificação dos casos.

Apesar da necessidade premente de identificação de indivíduos infectados pelo *M. leprae*, faltam testes de campo de fácil aplicação com sensibilidade aprazível e biomarcadores conhecidos para prever a progressão da doença em indivíduos infectados. Existem alguns testes rápidos disponíveis, sendo um deles o ML-flow, teste com boa sensibilidade na identificação de casos multibacilares, com 97,4% de sensibilidade, porém com baixa sensibilidade para casos paucibacilares e contatos domiciliares fracamente reativos (BUHRER-SEKULA et al., 2003). Outro teste rápido recém criado, que combina marcadores

celulares (IP-10, CCL4 e PCR) e sorológicos (IgM anti PGL-1), é útil para identificar infecção pelo bacilo e diferentes fenótipos clínicos da doença (VAN HOOIJ et al., 2018).

Além dos marcadores sorológicos citados, outros podem ajudar a compor um perfil para a identificação precoce dos indivíduos infectados. Em relação às respostas celulares, exacerbada em casos paucibacilares e com baixa resposta humoral, estudos têm focado em antígenos proteicos que podem ativar células T específicas induzindo, por exemplo, a produção de IFN- γ , IL-1 β , IL-17, IL-6, TNF- α , IL-10, TGF- β , MCP-1, IP-10, MIP-1 β em indivíduos infectados. No entanto, a quantidade produzida dessas citocinas e quimiocinas após estimulação é muito variável, a depender dos antígenos utilizados e das populações de contatos domiciliares, com respostas celulares que não apresentam certo padrão, o que dificulta a descoberta de marcadores que se destacam em grupos populacionais distintos (GELUK, 2013; GELUK et al., 2012).

Outra estratégia que pode ser adotada foi avaliar o fenótipo celular mensurando as quantidades da expressão das várias moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, CD28, CD80, CD86, HLA-DR, CD25, CD5, CD23, CD95, PD-1, CD39, CD95L, CTLA-4, TLR's, CD40) e níveis séricos de quimiocinas CC e CXC em células da imunidade inata e adaptativa de contatos domiciliares de casos de hanseníase, casos índice MB de hanseníase e indivíduos não expostos residentes em áreas não endêmicas (MENDONCA et al., 2007; MENDONCA et al., 2008; PALERMO et al., 2012).

4.1.6 Tratamento e seus efeitos sobre a resposta imunológica na hanseníase

O tratamento atual disponível para a hanseníase foi introduzido em 1982 pelo grupo de estudos da OMS, recomendando diferentes estratégias terapêuticas dependendo da forma clínica diagnosticada, além de simplificar a classificação dos casos índice, criando uma nova maneira de classificar, chamada de classificação operacional, dividindo as formas clínicas em dois tipos: paucibacilar e multibacilar. Essa nova abordagem foi motivada pela crescente resistência microbiana aos antibacterianos disponíveis à época (dapsona, rifampicina e outros). Ficou definido que os casos multibacilares fariam uso de três antibacterianos (Rifampicina, Dapsona e Clofazimina) por 12 meses e os casos paucibacilares fariam uso de rifampicina e dapsona por seis meses (WHO, 1982). Este esquema terapêutico ainda é vigente como estratégia de combate e eliminação da hanseníase no Brasil (BRASIL, 2016) e em todo o mundo.

Os efeitos do tratamento sobre a resposta imune à hanseníase são vários, afetando tanto moléculas de primeiro e segundo sinal, quanto à produção de citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas específicas para o bacilo, substâncias chamadas de terceiro sinal. O entendimento dos resultados aqui apresentados depende, pelo menos em parte, dos efeitos promovidos pela poliquimioterapia, pois todos os casos índice no momento da coleta de sangue estavam em tratamento ou já o haviam terminado.

Vários estudos evidenciam mudanças nos parâmetros clínicos e no índice baciloscópico, evidenciando a eficácia bactericida e bacteriostática do tratamento (REES; PEARSON; WATERS, 1970; VU et al., 1994). Os estudos sobre os efeitos do tratamento sobre a resposta imune também são extensos, com exceção sobre o fenótipo das moléculas de superfície, os quais são relativamente escassos.

Em relação às moléculas de superfície os efeitos da poliquimioterapia sobre a histologia são diversos em casos com a forma paucibacilar e multibacilar. Em ambas as formas houve incremento na expressão de HLA-DR com o início do tratamento, além de redução do índice baciloscópico e ativação da imunidade mediada por células (CREE et al., 1995). Casos multibacilares não tratados apresentam percentual de redução maior de moléculas coestimulatórias (CD80, CD28) em comparação com casos tratados, casos paucibacilares e com indivíduos saudáveis (AGREWALA; KUMAR; VOHRA, 1998), ou seja, os casos multibacilares possuíam menor expressão dessas moléculas em comparação aos casos paucibacilares e ao grupo sem contato com pacientes com hanseníase, indicando anergia, com consequente prejuízo na apresentação de antígenos (FAFUTIS-MORRIS et al., 1999).

Outro estudo, avaliando moléculas de expressão, demonstrou que o tratamento promove elevação da frequência de células Th17 e de células CD4+IL-17+ no sangue periférico, após estimulação, de casos multibacilares, indicando a participação deste tipo celular na patogenia da hanseníase (DE ALMEIDA-NETO et al., 2015).

O tratamento parece que aumenta a expressão da molécula co-estimuladora CD86 em todas as populações de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos) em pacientes PB, após 90 dias do início do tratamento, sem efeitos aparentes em MB (FRANCISCON, 2013).

A maioria dos estudos sobre os efeitos da poliquimioterapia sobre a resposta imune é sobre o perfil de citocinas e anticorpos específicos contra o PGL-1. Em estudo de CASSIRER-COSTA et al. (2017) o tratamento foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 em casos multibacilares e aumentar os níveis de IFN- γ em casos paucibacilares (CASSIRER-COSTA et al., 2017).

A poliquimioterapia foi efetiva na alteração dos níveis de citocinas, em ambas as formas clínicas polarizadas da hanseníase como mostrado em dois estudos de Moubasher et al.: em pacientes TT houve aumento de IL-2, TNF- α e IFN- γ , ambas citocinas protetoras de perfil Th1, além de apresentar correlação negativa com o índice baciloscópico; em pacientes LL houve aumento de IL-2R, IL-10, IL-1 β em comparação com pacientes TT e correlação positiva com o mesmo índice após o tratamento. Os estudos também evidenciaram redução dos índices baciloscópico e morfológico, confirmando a efetividade do tratamento (MOUBASHER et al., 1998a;1998b).

Alguns trabalhos sequenciais não evidenciam um padrão claro de evolução dos níveis de IgM ou IgG específicos para antígenos do *M. leprae*, porém mostram correlação da resposta imune mediada por células com a redução do índice baciloscópico promovida pelo tratamento, além de, ao fim do tratamento, produzirem mais citocinas inibitórias (TGF- β e IL-10), e menos IL-4 e IFN- γ , independente da forma clínica (TRAO et al., 1998; VU et al., 1994).

Os estudos sobre efeitos do tratamento na sorologia de anticorpos são vastos. Freitas et al., utilizando os antígenos LID-1 e PGL-1 e estimulando com uma série de antígenos, obteve redução de anticorpos na primeira aferição por volta dos 4 meses e isso se manteve por 22 meses após o início do tratamento. Também os níveis de IFN- γ se elevaram após o tratamento, tanto em PB quanto em MB, na primeira aferição, porém, sofreram redução na segunda aferição, por volta dos 20 meses, retornando aos níveis anteriores ao tratamento. Os níveis de IgM e IgG também declinaram após a conclusão do tratamento na maioria dos casos MB (FREITAS et al., 2015).

Outros estudos sorológicos também evidenciam a eficácia do tratamento na redução da resposta humoral específica ao *M. leprae*. CARVALHO et al. (2017), avaliando a reatividade a diversos antígenos, demonstrou redução do índice ELISA anti LID-1, NDO-LID, NDO-HSA em casos MB em tratamento de dois anos seguidos.

4.1.7 Imunoprofilaxia

A vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) é a única imunoprofilaxia contra a hanseníase disponível atualmente, sendo uma das primeiras vacinas a serem desenvolvidas. Utilizada e desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin desde o ano de 1921, foi originalmente idealizada para a profilaxia da tuberculose (GRANGE et al., 1983).

Um fato muito importante é a variação na sua efetividade em proteger contra a tuberculose ou hanseníase. Esse fato é devido a vários fatores: diferentes cepas e concentrações de BCG, as diferenças regionais das respostas dos hospedeiros, os efeitos de prévios contatos com outros tipos de micobactérias no ambiente (GRANGE et al., 1983). Os primeiros estudos envolvendo a efetividade da vacina BCG contra a hanseníase verificaram a conversão do teste Mitsuda de negativo para positivo após a aplicação da vacina via oral.

O primeiro estudo epidemiológico foi realizado em 1956 na Venezuela. Na ocasião, os autores fizeram o acompanhamento por cinco anos de contatos domiciliares vacinados ou não com BCG. Transcorrido o período do estudo os autores encontraram um coeficiente de morbidade de 5,11/1000 entre vacinados e 45,70/1000 entre não vacinados, demonstrando fortemente a proteção vacinal contra a doença (CONVIT, 1956).

Em outro estudo de acompanhamento, cuja duração foi de 16 anos, os autores atribuíram uma proteção de 48% contra a hanseníase, sendo mais efetiva contra a hanseníase tuberculóide e em crianças vacinadas quando menores de 15 anos. A proteção era mais eficiente no prazo de 12 meses nos vacinados entre as idades de 10 e 15 anos, mas o foi também em outros grupos etários. (BAGSHAWE et al., 1989). Outro estudo demonstrou que a proteção conferida pela vacina foi dose dependente, ainda que de maneira modesta em crianças de 0 a 14 anos (LWIN et al., 1985). Em outro estudo, com crianças de 0 a 10 anos, houve redução de 80% na incidência em vacinadas quando comparado com não vacinadas (STANLEY et al., 1981). Em estudo de revisão os autores mostram a variação na proteção conferida pela BCG, a qual depende de fatores relacionados à cepa de partida da vacina, contato prévio com outras micobactérias no ambiente e à variação da resposta imune em diversas populações, além de diferenças metodológicas dos estudos (BARRETO et al., 2006).

Pelo descrito acima se pode concluir que a vacinação é medida profilática e de combate à infecção pelo *M. leprae*, medida reforçada pela atual Diretriz Brasileira para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase (BRASIL, 2016). A vacina apresenta melhores resultados quando aplicada em idades menores, protege mais contra as formas mais graves da hanseníase e facilita a polarização da forma mais branda, a forma paucibacilar.

4.1.8 Ações de controle e vigilância da hanseníase

As ações de controle da hanseníase foram sendo aperfeiçoadas com o passar dos anos, com ações medicamentosas e de controle da disseminação da infecção, além do controle dos

contatos domiciliares com a aplicação de reforço da vacina BCG. Em 2016, e em anos anteriores, a Organização Mundial da Saúde lançou a Estratégia Global para a Hanseníase 2016-2020, com o objetivo de acelerar a eliminação da hanseníase no mundo. Tal estratégia reforça e se baliza em três pilares/componentes: primeiro é fortalecer o controle, a coordenação e a parceria do governo; segundo é combater a hanseníase e suas complicações e por fim combater a discriminação e promover a inclusão (OMS, 2016).

As estratégias citadas acima estão alinhadas com a Diretriz Brasileira para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública (BRASIL, 2016). Essa diretriz aponta várias estratégias, dentre elas, a educação em saúde dirigida às equipes de saúde, aos casos suspeitos e doentes, aos contatos de casos índices, aos líderes da comunidade e ao público em geral, enfim, a todos que de alguma maneira estão envolvidos no processo saúde/doença. A investigação epidemiológica para o diagnóstico oportuno de casos é outra estratégia chave para o sucesso no controle e combate à hanseníase. A investigação compreende o exame dermatoneurológico de pessoas suspeitas de hanseníase que procuram a unidade de saúde espontaneamente, exames de indivíduos com dermatoses e/ou neuropatias periféricas e dos casos encaminhados por meio de triagem. A vigilância de contatos tem por finalidade a descoberta de casos novos entre aqueles que convivem ou conviveram, de forma prolongada, com o caso novo de hanseníase diagnosticado, além de incluir, pela primeira vez, o contato social, que inclui vizinhos, colegas de trabalho e de escola, entre outros. Esses devem ser investigados de acordo com o grau e tipo de convivência, ou seja, aqueles que tiveram contato muito próximo e prolongado com o paciente não tratado.

O terceiro pilar da diretriz a ser cumprida é o tratamento até a cura, que deve ser realizados em nível ambulatorial, seja em serviços de referência ou na atenção primária à saúde. Outro aspecto diretivo preconizado é prevenção e tratamento de incapacidades. Educação em saúde, diagnóstico precoce da doença, tratamento regular com poliquimioterapia, vigilância de contatos, detecção precoce e tratamento adequado das reações e neurites, apoio à manutenção da condição emocional e integração social e, por fim, a realização de autocuidado, são medidas que garantem o sucesso desse aspecto diretivo (BRASIL, 2016).

A vigilância epidemiológica constante, principalmente dos contatos domiciliares e sociais, é componente do sucesso das ações de controle da doença, além da imunoprofilaxia com a aplicação de BCG conforme esquema específico de reforço (BRASIL, 2016).

Outra estratégia que pode melhorar a dinâmica no controle da hanseníase é a descentralização e o fortalecimento da atenção primária à saúde, processo que depende das

especificidades locais e regionais e do engajamento dos gestores e profissionais assistenciais envolvidos no processo de tratamento, combate e controle da hanseníase (LANZA; LANA, 2011).

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo transversal, analítico, que busca avaliar o perfil da resposta imune celular de casos multibacilares de hanseníase e seus contatos domiciliares e sua relação com os níveis séricos de citocinas, quimiocinas, imunoglobulinas e variáveis clínico-epidemiológicas e sociodemográficas.

5.2 Cenário do estudo

O estudo foi realizado no município de Almenara, localizado na região nordeste do Estado de Minas Gerais, no Vale do Jequitinhonha, cuja população é de 38.775 habitantes, segundo dados do IBGE no ano de 2010. Está inserido na região identificada e definida pelo Ministério da Saúde como *cluster* n.º 6, o qual identifica regiões com risco elevado para a ocorrência de hanseníase, caracterizando-se como um município hiperendêmico para a doença (BRASIL, 2010).

5.3 População de estudo

A população do estudo foi escolhida por conveniência, baseada em disponibilidades de recursos financeiros e possibilidades técnicas de análise, processamento e armazenamento de amostras no campo de coleta, composta por 13 casos-índice de hanseníase e 14 contatos domiciliares que foram expostos à infecção ao mesmo grupo de casos, portanto organizada de forma pareada, selecionada nos anos de 2014 e 2015.

As informações clínicas e epidemiológicas pertinentes ao caso índice e seus contatos domiciliares foram adquiridas no Sistema de Informação de Agravos e Notificação (SINAN) e por meio de entrevista estruturada realizada por ocasião das visitas domiciliares, respectivamente (APÊNDICES A e B, respectivamente).

Os critérios de inclusão para o grupo de casos-índice foram: apresentar a forma multibacilar e/ou classificação de Madri nas formas Dimorfa e Virchoviana. Tal critério se justifica devido ao maior risco de desenvolvimento da doença pelos contatos domiciliares

quando expostos a estes tipos de forma clínica (ARAUJO, S. et al., 2012; GOULART et al., 2008).

Os demais critérios de inclusão para o grupo de casos-índice foram: ter pelo menos 1 (um) contato domiciliar a fim de realizar pareamento para associar a resposta imune dos contatos domiciliares às características dos casos-índice; não fazer uso de corticosteroides, não ter apresentado doenças infecciosas há pelo menos dois anos; não ter tido Reação Reversa (RR) ou reação do tipo 1 e/ou Eritema Nodoso (ENL) ou reação do tipo 2, e, por fim, não possuir doenças inflamatórias.

Os critérios de inclusão para o grupo de contatos domiciliares foram: ser contato domiciliar do grupo caso índice, a fim de realizar pareamento para relacionar a resposta imune dos contatos domiciliares às características dos casos-índice. Além deste critério os demais foram: não possuir histórico de hanseníase; não fazer uso de corticosteroides; não possuir doenças inflamatórias e por fim não ter apresentado doença infecciosa há pelo menos dois anos (APENDICE A e B). Considerou-se contato domiciliar toda e qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o doente de hanseníase. O contato social é qualquer pessoa que conviva ou tenha convivido em relações familiares ou não, de forma próxima e prolongada (BRASIL, 2016).

A inclusão de pacientes paucibacilares e seus contatos não foi possível devido ao baixo número desses participantes que compõe o banco de dados do nosso grupo de pesquisa, apenas dois pacientes estavam incluídos em tal banco.

5.4 Variáveis do Estudo

As variáveis elegíveis, por meio da aplicação do questionário, do exame dermatoneurológico e pela característica dicotômica da distribuição das variáveis, foram as seguintes:

5.4.1 Variáveis Independentes

5.4.1.1 Variáveis relacionadas aos casos índice MB

- Sexo; Tempo de tratamento (≤ 6 meses, > 6 meses); Presença de BCG (sem BCG, com BCG).

5.4.1.2 Variáveis relacionadas aos contatos domiciliares

- Sexo; Grau de parentesco (parentesco primeiro grau, sem parentesco primeiro grau); Tempo de convívio; Tipo de convívio (dorme no mesmo cômodo ou no mesmo domicílio) (MOET et al., 2006).

5.4.2 Variáveis dependentes

- Soropositividade IgM/IgG aos antígenos: anti-LID-1, NDO-LID, NDO-HSA; os níveis séricos das citocinas e quimiocinas; o nível de expressão de moléculas de superfície das células da resposta imune.

5.5 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada por meio de visitas domiciliares pelos pesquisadores, os quais deram início à coleta dos dados mediante a concordância em participar do estudo e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICES C, D e E).

Os dados secundários relacionados aos casos índice MB foram obtidos por meio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

Os dados foram coletados entre os anos de 2014 e 2015. A pesquisa foi aprovada no Comitê de ética em Pesquisa da UFMG sob o número 624.116.

5.5.1 Entrevista

Os dados clínicos, epidemiológicos e demográficos dos sujeitos da pesquisa foram obtidos pela aplicação de um questionário estruturado, criado especificamente para esta coleta, durante as visitas domiciliares (APENDICE A e B). O questionário possui duas versões, uma para contatos domiciliares e outra para casos índice MB de hanseníase.

5.5.2 Exame dermatoneurológico

Foi realizado o exame clínico dermatoneurológico nos contatos domiciliares que concordaram em participar da pesquisa de acordo com o roteiro do APÊNDICE F. Este exame foi realizado pela equipe do Núcleo de Pesquisas em Hanseníase da UFMG (NEPHANS), devidamente treinada, visando identificar sinais e sintomas sugestivos de hanseníase. Os indivíduos que apresentaram características suspeitas da doença foram encaminhados a um serviço de saúde de referência no município para esclarecimento do diagnóstico (APÊNDICE G). Este exame não se aplicou em casos de hanseníase, uma vez que estes poderiam apresentar sequelas da doença gerando exame físico falso positivo.

5.5.3 Coleta de sangue

Foram coletadas amostras de 20 mL (vinte mililitros) de sangue total dos indivíduos que concordaram em participar da pesquisa. As amostras foram identificadas com etiquetas, contendo códigos alfanuméricos correspondentes ao município e ao indivíduo (Apêndice H). Essas amostras foram processadas e colocadas em solução de congelamento para posterior análise de acordo com o Apêndice I (amostra celular) e APÊNDICE J (amostra sorológica).

5.6 Análise de marcadores de superfície por reações de imunofluorescência através de citometria de fluxo

Para avaliar a expressão de moléculas de superfície celular em leucócitos no sangue periférico dos voluntários adicionou-se 10 mL da solução de lise (50.000 USP/L de heparina, 2,85g/L de citrato de sódio, 30mL/L de dietilenoglicol e 54mL/L de formaldeído), incubou-se

à temperatura ambiente durante 15 minutos, centrifugou-se a 400g durante 7 minutos, verteu-se, adicionou-se 10 mL de tampão fosfato -PBS (pH 7.4, contendo 0.5% BSA e 0.1% de azida sódica), homogeneizado em vórtex por um minuto. Centrifugado novamente a 400g durante 7 minutos e adicionado 5 mL da solução de congelação contendo 2% de solução de formaldeído. As alíquotas foram armazenadas a -80°C. No dia do experimento as amostras foram descongeladas. Cem (100) µL de sangue foram ressuspensos e colocados em tubos com 2 µL de anticorpos monoclonais não diluídos: anti-CD14 (clone M5E2) - marcado com PerCP (Proteína Clorofila Peridinina); anti-CD80 (L307.4) - marcado com PE (ficoeritrina); anti-CD86 (clone 2331 (FUN-1) - marcado com APC (Aloficocianina); anti-HLA-DR (G46-6) - marcado com FITC (Isotiocianato de fluoresceína), anti-CD3 (17a2) - marcado com FITC, anti-CD4 (RPA-T4) - marcado com BV421 (Violeta brilhante), anti-CD8 (C8/144B) - marcado com PerCP, anti-CD152 (BNI3), anti-CD25 (M-A251) - marcado com APCCy7 (Aloficocianina Cianina 7), anti-CD28 (MABF408) - marcado com PECy7 para marcação das moléculas de superfície. As amostras foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e em ausência de luz. Em seguida, foi submetido à lise de eritrócitos por incubação com 2 mL de uma solução comercial de lise (FACS Lysing Solution-BD, EUA) durante 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com solução salina, tamponadas com fosfato (PBS) com 1% de albumina de soro bovino (BSA). Setenta mil eventos totais foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Biosciences, Breda, Netherlands). Os anticorpos utilizados foram dos fabricantes BD Pharmingen™ e BD Bioscience™ combinados em painel multicolor. Foi utilizado controles de compensação para cada fluorocromo usado apenas para estabelecer os parâmetros de compensação. As análises foram realizadas usando o software FlowJo 10.2 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

As moléculas de superfície analisadas são mostradas detalhadamente nos quadros 1 e 2.

Quadro 1: Pannel de anticorpos monoclonais utilizados para marcação das populações de linfócitos, monócitos, neutrófilos.

Marcador	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Lote
Anti-CD14	PerCP	M5E2	BD Bioscience	3304672
Anti-CD80	PE	L307.4	BD Pharmingen	37102
Anti-CD86	APC	2331 (FUN-1)	BD Pharmingen	35274
Anti-HLA-DR	FITC	G46-6	BD Pharmingen	43391
Anti-CD3	FITC	17a2	BD Pharmingen	26573
Anti-CD4	BV421	RPA-T4	BD Bioscience	50223679
Anti-CD8	PerCP	C8/144B	BD Bioscience	78163
Anti-CD152	PE	BNI3	BD Pharmingen	1818
Anti-CD25	APC Cy7	M-A251	BD Bioscience	4101676
Anti-CD28	PECy7	MABF408	BD Bioscience	4341606

Quadro 2: Pannel de marcação de anticorpos monoclonais utilizados para leitura no citômetro.

Tubos	Marcações
Tubo 1	Sem marcação - somente células
Tubo 2	CD14 PerCP + CD80 PE + CD86 APC + HLA-DR FITC
Tubo 3	CD3 FITC + CD4 BV421 + CD8 PerCP + CD152 PE + CD25 APCCy7 + CD28 PECy7

5.7 Estratégia de aquisição e análise do perfil de expressão de HLA-DR, CD80, CD86 em neutrófilos do sangue periférico por citometria de fluxo

Após todo o procedimento de fenotipagem dos leucócitos e da análise no citômetro FACSCanto II o software FlowJo, versão 10.2 foi utilizado para a identificação da população celular de interesse e determinação da expressão de HLA-DR, CD80 e CD86. O anticorpo anti-CD14-PerCP, molécula expressa em neutrófilos, foi empregado nos ensaios para facilitar a seleção da população de neutrófilos.

A população de neutrófilos foi selecionada por uma janela (*gate*) (R1 região 1 abaixo no gráfico), através da construção de gráficos de densidade de fluorescência (CD14- PerCP+) *versus* granulosidade celular (*Side Scatter* – SSC-A), como representado na FIGURA 5A. Em seguida, foi construído o histograma de HLA-DR-FITC, CD86-APC, CD80-PE *versus* número de células para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de cada molécula na população selecionada, como representado na figura 5B.

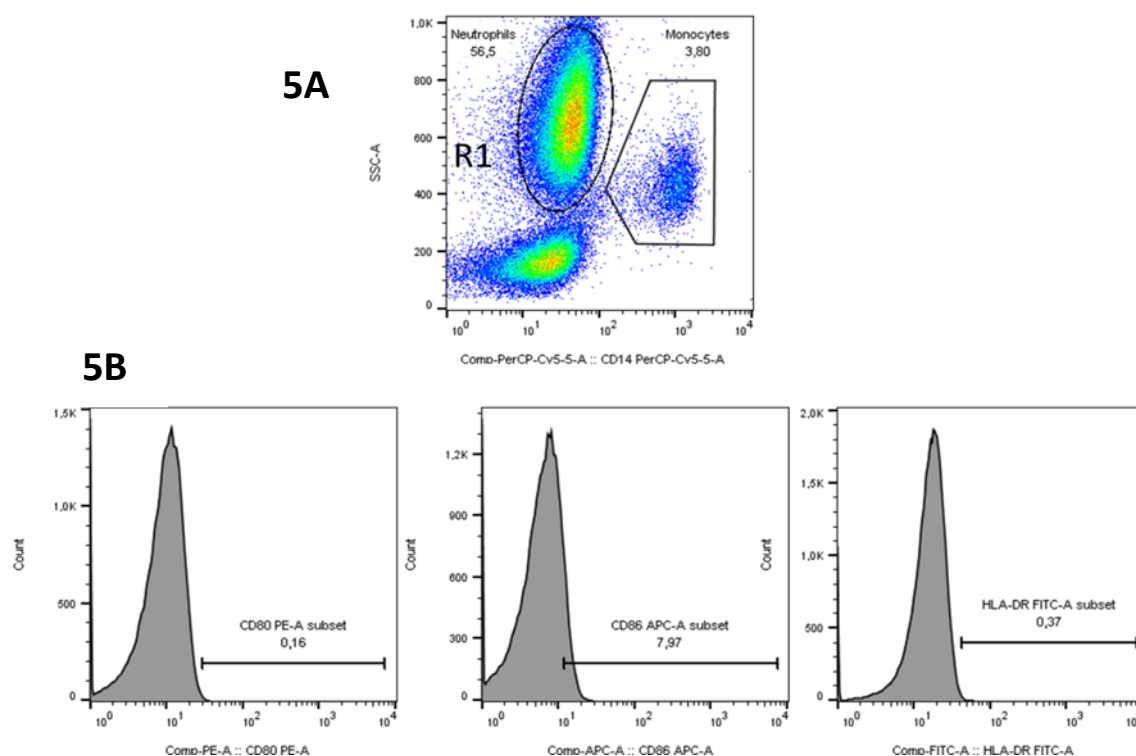


Figura 5 – Sequência de execução da estratégia de análise para quantificar a porcentagem de expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 em neutrófilos. (A) Gráfico de distribuição pontual CD14-PerCP *versus* SSC para a seleção da população de neutrófilos fenótipo CD14+. (B) Histograma de IMF de CD80-PE, CD86-APC e HLA-DR-FITC em sequência, *versus* número de células selecionadas na região R1.

5.8 Estratégia de aquisição e análise do perfil de expressão de HLA-DR, CD80, CD86 em monócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Após a imunofenotipagem dos leucócitos e da análise no citômetro foi identificada a população de monócitos e determinada a expressão de HLA-DR, CD80 e CD86. O anticorpo anti-CD14-PerCP, molécula expressa em monócitos, foi empregado nos ensaios para facilitar a seleção da população de monócitos.

A população de monócitos foi selecionada por uma janela (R1), através da construção de gráficos de densidade de fluorescência (CD14+ PerCP+) *versus* granulosidade celular (*Side Scatter* – SSC-A), como representado na FIGURA 6A. Em seguida, foi construído o histograma de HLA-DR-FITC, CD86-APC, CD80-PE *versus* número de células para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de cada molécula na população selecionada, como representado na figura 6B, 6C e 6D.

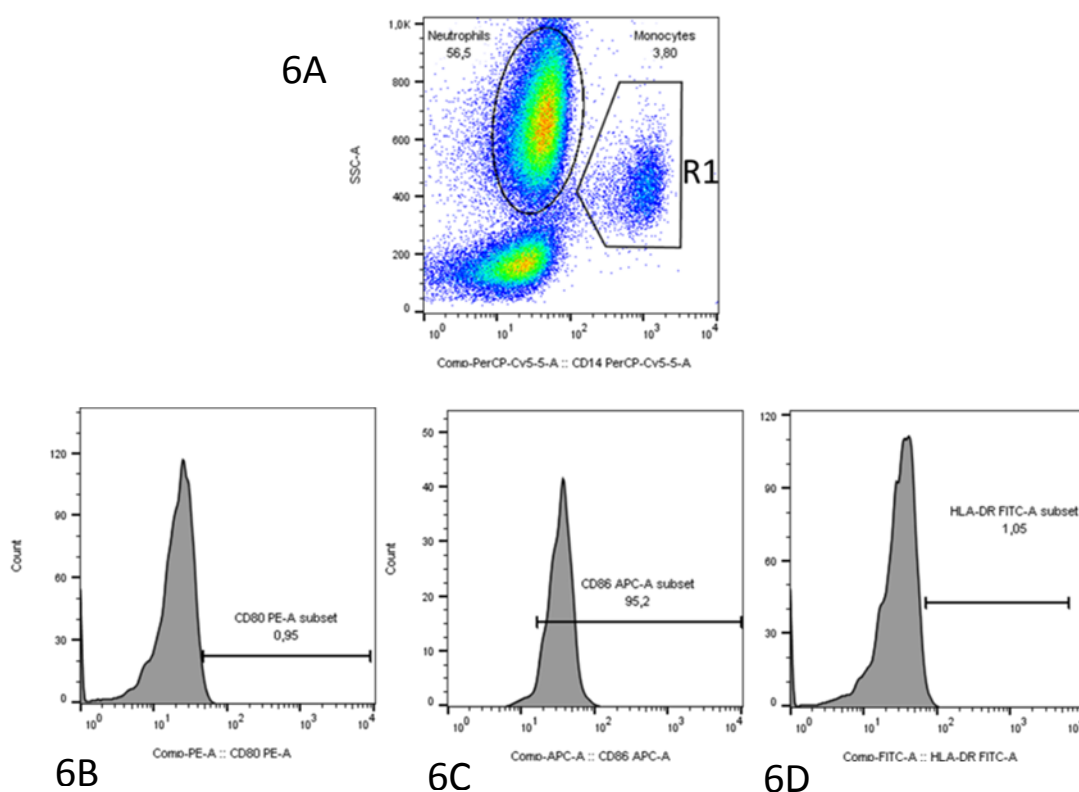


Figura 6 – Sequência de execução da estratégia de análise para quantificar a porcentagem de expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 em monócitos. (A) Gráfico de distribuição pontual CD14-PerCP *versus* SSC para a seleção da população de monócitos fenótipo CD14+. (B, C, D) Histograma de IMF de CD80-PE, CD86-APC e HLA-DR-FITC em sequência *versus* número de células selecionadas na região R1.

5.9 Estratégia de aquisição e análise do perfil de expressão de CD25, CD28 e CD152 em linfócitos T CD4⁺CD3⁺ do sangue periférico por citometria de fluxo

Após a fenotipagem dos leucócitos e da análise no citômetro foi identificada a população de linfócitos CD4⁺ e determinada a expressão de CD25, CD28 e CD152.

A população de linfócitos foi selecionada por uma janela R1, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência granulosidade celular (*Side Scatter* – SSC-A) *versus* tamanho (FSC-A - *Forward-scatter*) como representado na Figura 7A. Em seguida, foi construído outro gráfico de densidade de fluorescência CD4⁺ *versus* CD3⁺ (R2) na figura 7B. Por fim foram feitos histogramas a partir de R2 de CD25, CD28 e CD152 *versus* número de células para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de cada molécula na população selecionada, como representado nas figuras 7C, 7D e 7E.

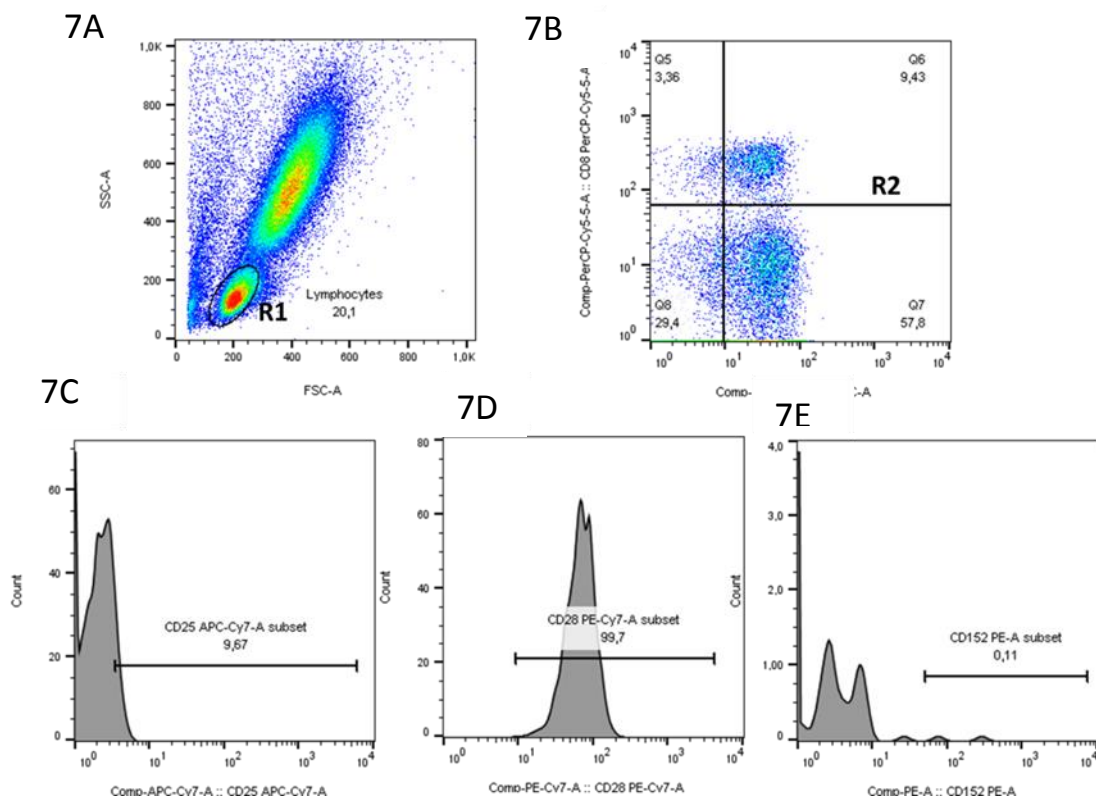


Figura 7 – Sequência de execução da estratégia de análise para quantificar a porcentagem de expressão de CD25, CD28 e CD152 (CTLA-4) em linfócito CD4⁺. (A) Gráfico de distribuição pontual FCS-A *versus* SSC-A para a seleção da população linfócitos (R1). (B) Gráfico de distribuição pontual CD4⁺ *versus* CD3⁺ para a seleção da população linfócitos fenótipo CD4⁺CD3⁺ (R2). (C, D, E) Histograma de IMF de CD25-APC-Cy7, CD28-PE-Cy7 e CD152-PE selecionadas a partir de R2.

5.10 Estratégia de aquisição e análise do perfil de expressão de CD25, CD28 e CD152 em linfócitos CD8+CD3+ do sangue periférico por citometria de fluxo

Após todo o procedimento de fenotipagem dos leucócitos e da análise no citômetro foi identificada a população de linfócitos CD8+ e determinada a expressão de CD25, CD28 e CD152.

A população de linfócitos foi selecionada por uma janela R1, através da construção de gráficos de densidade de fluorescência granulosidade celular (*Side Scatter* – SSC-A) *versus* tamanho (FSC-A - *Forward-scatter*) como representado na Figura 8A. Em seguida, foi construído outro gráfico de densidade de fluorescência CD8+ *versus* CD3+ (R2) na figura 8B. Por fim foram feitos histogramas a partir de R2 de CD25, CD28 e CD152 *versus* número de células para determinar a intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de cada molécula na população selecionada, como representado nas figuras 8C, 8D e 8E.

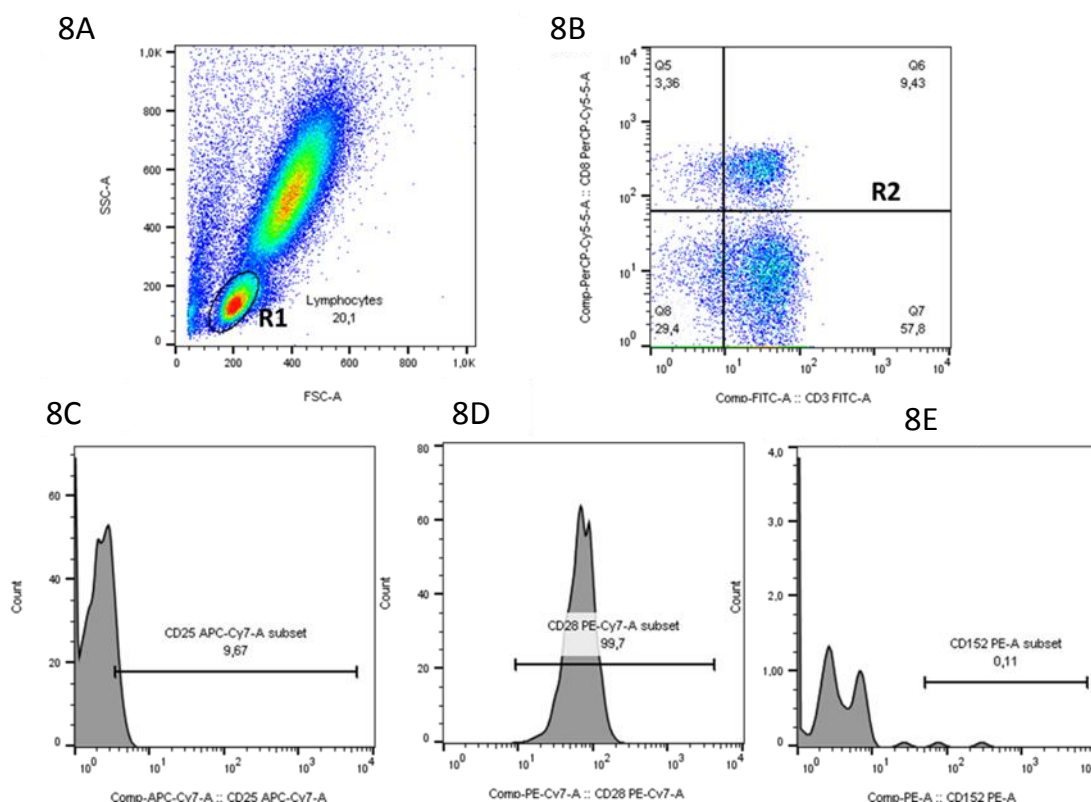


Figura 8 – Sequência de execução da estratégia de análise para quantificar a porcentagem de expressão de CD25, CD28 e CD152 (CTLA-4) em linfócitos CD8+. (A) Gráfico de distribuição pontual FCS-A *versus* SSC-A para a seleção da população linfócitos (R1). **(B)** Gráfico de distribuição pontual CD8+ *versus* CD3+ para a seleção da população linfócitos fenótipo CD8+CD3+ (R2). **(C, D, E)** Histograma de IMF de CD25-APC-Cy7, CD28-PE-Cy7 e CD152-PE selecionadas a partir de R2.

5.11 Avaliação do padrão de citocinas e quimiocinas séricos

Os níveis séricos de citocinas TNF, IL-6, IFN- γ , IL-2, IL-17A, IL-4 e IL-10 e de quimiocinas CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1 - *monocyte chemoattractant protein-1*), CXCL9 (MIG - *monokine induced by interferon- γ*) CXCL10 (IP-10 - *interferon- γ -induced protein-10*) foram medidas em todas as amostras dos pacientes. O soro foi centrifugado a 400 giros durante 40 minutos a 18°C, dividido em alíquotas e armazenado a -80°C até o dia do experimento. As citocinas e quimiocinas séricas foram quantificadas a partir do sobrenadante após centrifugação da alíquota em 400 giros por 7 minutos utilizando o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA), (Becton Dickinson, BD-USA) de acordo com Peruhype-Magalhães *et al.* (PERUHYPE-MAGALHAES *et al.*, 2006) A aquisição de dados foi realizada por citometria de fluxo FACsCanto (BD-USA) e analisado no software BD FACS Array, onde os valores foram expressos em pg/mL para ambos os analitos. Detalhes do protocolo no APÊNDICE L.

5.12 Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA

Para avaliar os níveis de IgM anti NDOHSA, LID-1 e NDOLID nas amostras de soro de casos índice e seus contatos domiciliares foi utilizada a técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). A análise laboratorial foi realizada no Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), unidade da Fundação Oswaldo Cruz em Minas Gerais (FIOCRUZ Minas) com apoio técnico e científico dos pesquisadores da instituição.

O protocolo para realização dos testes sorológicos anti NDOHSA, LID-1 e NDOLID (APÊNDICE M) foi previamente padronizado no Centro de Referência Nacional de Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH) da Universidade Federal de Uberlândia (FABRI, 2015). Os antígenos foram disponibilizados de forma liofilizada pelo *Infectious Disease Research Institute* com 500 μ g de cada antígeno por *vial*. Os lotes utilizados foram: NDOHSA (lote 668-58H, 05022014), LID-1 (lote 599-02) e NDOLID (lote 516-118). A reconstituição foi realizada com 500 μ L de água ultra pura de forma que a concentração de cada antígeno diluído foi de 1 μ g/ μ L.

Para a sensibilização das placas cada antígeno foi diluído em 5mL de tampão carbonato (carbonato de sódio - Na₂CO₃ e bicarbonato de sódio - NaHCO₃), sendo utilizados 1 μ L de NDOHSA, 5 μ L de LID-1 e 1 μ L de NDOLID, de forma que a concentração final fosse 0,2 μ g/mL para os antígenos NDOHSA e NDOLID e 1,0 μ g/mL para o antígeno LID-1. A

sensibilização foi realizada com 50µL dos antígenos diluídos, por poço, no dia anterior a realização do ELISA e as placas foram armazenadas overnight a 4°C.

No dia da realização do ELISA o bloqueio das placas foi feito com 300µL, por poço, de solução de bloqueio PBS1%BSA (*Bovine Serum Albumin* - BSA e *Phosphate Buffered Saline* - PBS) a 37°C. Após o bloqueio, a solução foi descartada e foi adicionado 50 µL de soro diluído em PBS1%BSA, por poço, na proporção de 1:300 das amostras de casos de hanseníase e de contatos domiciliares, além de amostras de um controle positivo (caso de hanseníase com baciloscopia e sorologia anti PGL-I nativo positivas) e de três controles negativos (residentes em áreas não endêmicas para hanseníase, sem relato de convivência com caso de hanseníase e com teste ML-flow negativo).

Ao final do período de incubação, 60 minutos, as placas foram lavadas quatro vezes com 300 µL de solução de lavagem (Tween 20 e PBS) por poço. Após esta etapa, foi adicionado 50 µL, por poço, do anticorpo secundário IgM anti humana ligado a peroxidase (Sigma/Ref.A4290), com diluição de 1:10.000 em PBS1%BSA nas placas sensibilizadas com NDOHSA; 50µL, por poço, do anticorpo secundário IgG anti humana ligado a peroxidase (Sigma/Ref.A4290), com diluição de 1:20.000 em PBS1%BSA nas placas sensibilizadas com LID-1 e 50µL, por poço, dos anticorpos secundários IgM e IgG ligados a peroxidase, com diluição 1:10.000 e 1:20.000, respectivamente nas placas sensibilizadas com NDOLID.

Após incubação a 37° C, por 60 minutos, as placas foram novamente lavadas conforme descrito anteriormente e foi adicionado 50µl de o-phenylenediamine (OPD) diluído em tampão citrato de fosfato (ácido cítrico - $C_6H_8O_7$, fosfato de sódio e Na_2HPO_4), por poço, conforme recomendação do fabricante (Invitrogen®). As placas foram incubadas por 5 minutos, em seguida foi adicionado 50µl de ácido sulfúrico 2,5N - H_2SO_4 , por poço, e a leitura foi em espectrofotômetro a 492 nm.

As amostras e os controles foram testados em duplicatas e o título de anticorpos foi expresso como Índice ELISA (IE). A fórmula utilizada para o cálculo foi $IE = \text{Densidade Ótica (DO) da amostra} / \text{Densidade ótica do cut-off}$. O valor do *cut-off* foi calculado pela média da DO dos três controles negativos mais três vezes o valor do desvio padrão. Valores de IE superiores a 1,1 foram considerados positivos (LOBATO et al., 2006).

As análises por ELISA foram repetidas para as amostras que apresentaram valores de IE classificados como positivo em um dos poços da duplicata e negativo no outro poço da duplicata. Também foram repetidas as análises das amostras cujos valores de IE tiveram 25% ou mais de variação entre os poços das duplicatas.

5.13 Tratamento e Análise dos dados

O *Software* Epi Info versão 3.5.1 foi utilizado para elaboração do banco de dados e o *software* GraphPad Prim 6.0 (San Diego, CA, EUA) para as análises estatísticas. O teste Shapiro Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados. A identificação de outliers foi feita pelo método ROUT (*Robust Regression and Outlier removal*), com coeficiente $Q = 1\%$ no *software* GraphPad Prim 6.0. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de duas caudas de Mann-Whitney para cada variável. A construção dos correlogramas foi realizada com auxílio do pacote Corplot, disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/index.html>, do *software* R, na versão RStudio.

Para mostrar o perfil imunológico global entre casos e contatos utilizamos a abordagem de escalonamento multidimensional (MDS), em amostras não pareadas, para verificar a similaridade/dissimilaridade imunológica entre esses dois grupos. Pelo cálculo das distâncias euclidianas e seus coeficientes de correlação foram calculados a partir de matrizes de correlação como pré-processamento, usando cmdscale na base R *Software*, versão 3.4.2. Os pacotes utilizados foram para essa abordagem foram: pacote vegan (<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>), pacote stringr (<https://cran.r-project.org/web/packages/stringr/stringr.pdf>), pacote relaimp (<https://cran.r-project.org/web/packages/relaimp/relaimp.pdf>), pacote ellipse (<https://cran.r-project.org/web/packages/ellipse/ellipse.pdf>), pacote RColorBrewer (<https://cran.r-project.org/web/packages/RColorBrewer/RColorBrewer.pdf>), pacote pspearman (<https://cran.r-project.org/web/packages/pspearman/ps>). Os scripts estão disponíveis no Anexo C.

O MDS é uma técnica de interdependência que permite mapear distâncias entre pontos em uma representação gráfica espacial. Geralmente considerado como análise exploratória de dados porque reduz grandes quantidades de dados em estruturas de fácil visualização. Os pontos são dispostos dentro desse espaço, de modo que as distâncias entre os pares de pontos tem a relação mais forte possível de semelhanças entre os pares de objetos. Em outras palavras, os pontos que estão juntos representam objetos semelhantes, enquanto os objetos diferentes são representados por pontos que estão distantes, expressando no caso específico desta tese uma “distância imunológica” a partir de um “espaço imunológico”. Nesta análise, múltiplas dimensões (cada uma representando os parâmetros imunológicos avaliados (citocinas e quimiocinas: IL-17A, IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10; reatividade aos antígenos: NDOHSA, LID-1, e NDOLID; as

moléculas de superfície marcadas: CD80+, CD86+, HLA-DR de monócitos e neutrófilos, CD4+, CD4+CD25+, CD4+CD28+, CD4+CTLA-4+, CD8+, CD8+CD25+, CD8+CD28+, CD8+ CTLA-4+ de linfócitos)) foram reduzidas para duas dimensões, representadas em um plano cartesiano x e y.

A análise estatística foi realizada com o teste *t*-student para distribuições simétricas para comparações de médias das variáveis dependentes entre os grupos. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para distribuições não simétricas para comparações de medianas das variáveis dependentes entre os grupos. Para análise de correlação foi empregado o teste de Spearman para verificar a correlação entre as variáveis dependentes e independentes. As correlações com $r > 0,6$, positivas ou negativas, foram consideradas fortes e incluídas como significativas (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Em todas as análises a significância foi considerada quando $p < 0,05$.

5.14 Aspectos Éticos

Este estudo atende às determinações da Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, que estabelece diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

O projeto foi aprovado pelo Departamento de Enfermagem Materno Infantil e Saúde Pública, aprovado e autorizado pela Secretaria Municipal de Saúde de Almenara e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob Parecer n.º 13639 (Anexo A).

Os sujeitos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa, sem nenhum tipo de remuneração e esclarecidos quanto aos objetivos do estudo e à garantia do anonimato. Foram utilizados códigos alfanuméricos para a identificação do sujeito e dos materiais coletados. Os sujeitos incluídos no estudo assinaram o TCLE, no caso de indivíduos menores de 18 anos, os pais ou responsáveis autorizaram sua participação e assinaram o termo. Todos os participantes receberam uma via assinada do TCLE.

Foi respeitado o direito à recusa em participar, sem que haja nenhum ônus para os sujeitos envolvidos.

Para a proteção e bem-estar dos indivíduos incluídos neste estudo, não foi divulgado o nome de nenhum dos participantes.

5.15 Limitações da Pesquisa

A presente pesquisa apresenta limitações, as quais foram condicionadas às condições de coleta, processamento e armazenagem das amostras sanguíneas dos participantes da pesquisa. As amostras tiveram de ser fixadas com solução de congelamento contendo formol e tiveram de ser armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise do perfil de moléculas de superfície das células, citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas séricas. Este procedimento de congelamento das amostras pode ter clivado algumas moléculas de superfície, tais como CD14, CD16 e CD56, as quais são ancoradas à membrana pela proteína GPI (*glycosyl-phosphatidyl-inositol*) impossibilitando sua marcação por completo, com prejuízo na análise de algumas populações celulares. Ademais o congelamento e o tempo decorrido até a análise e o descongelamento podem ter prejudicado a configuração de outros epítomos de outras moléculas e isso prejudicou a marcação pelos anticorpos utilizados.

A não estimulação *in vitro* com frações lipídicas ou proteicas do *M. leprae* reduziu a especificidade dos resultados das análises.

A classificação dos casos índice incluídos na população do estudo foi realizada pelos serviços de saúde da cidade e não em centros de referência com aporte tecnológico que garantisse a certeza na classificação dos casos, assim como na avaliação clínica para a classificação do grau de incapacidade.

A população do estudo não apresentou as condições consideradas ideais para avaliação em plenitude da resposta imune, pois todos os pacientes já encontravam tratados ou em processo de tratamento. Para caracterizar melhor a resposta imune de casos de hanseníase, diferenciados pela classificação operacional, não houve pacientes paucibacilares em quantidade considerável (somente dois) para se formar um terceiro grupo de comparação, impossibilitando caracterizar melhor as possíveis diferenças ou similaridades imunológicas entre os grupos estudados.

Os recursos financeiros escassearam durante a execução do trabalho, impedindo a compra de insumos, o que restringiu tornar este estudo transversal em longitudinal.

5.16 Benefícios Potenciais da presente Pesquisa

Os potenciais benefícios da pesquisa são o conhecimento mais aprofundado da resposta imune celular associada à resposta humoral (citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas) em nível basal, sem estimulação com antígenos do *M. leprae*, em pacientes que já estavam sob os efeitos do tratamento medicamentoso. O enfoque nos contatos domiciliares que porventura apresentem um perfil diferenciado de resposta celular e humoral. Isso pode contribuir para o estabelecimento de um padrão da resposta imune que ajude a compor um padrão mais geral e mais aproximado para a confecção de um conjunto de biomarcadores de infecção subclínica. Consequentemente poder-se-á realizar quimioprofilaxia oportuna e a quebra da transmissão do bacilo em questão e a erradicação da hanseníase em futuro mais breve possível.

6 RESULTADOS

6.1 Descrição das características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos participantes do estudo

A tabela 1, abaixo, apresenta as características clínicas, epidemiológicas e demográficas dos casos-índice e seus contatos domiciliares. O grupo casos-índice foi composto por indivíduos portadores da forma multibacilar (100%, n=13), em tratamento (n=10) (77%) e com o tratamento finalizado (n=3) (23%), variando de 1 a 18 meses. Este grupo apresentou 69% de participantes do sexo masculino, com idade média de 51 anos (variação: 16-76 – mínimo-máximo). O grupo de contatos domiciliares (n=14) apresentou 57% (n=8) de indivíduos do sexo feminino e 43% (n=6) de indivíduos do sexo masculino, com idade média de 36 anos (variação: 16-65 anos). Em relação à presença da cicatriz da vacina BCG 55% (n=7) dos casos índice não apresentaram nenhuma cicatriz, 31% (n=4) apresentaram uma cicatriz e 7% (n=1) apresentou duas cicatrizes, ao passo que todos os contatos domiciliares (100%) apresentavam uma ou duas cicatrizes. Em relação à classificação de Madri 77% (n=10) foram classificados como dimorfos, 15% (n=2) como virchovianos e 8% (n=1) não havia informação na base de dados do SINAN (TABELA 1).

O tempo de convivência dos contatos domiciliares com o caso variou de 4 a 36 anos, com média de 19 anos. A maioria dos contatos, 57% (n=8), possuía algum grau de parentesco com o caso índice (TABELA 1).

Relativo ao grau de escolaridade os resultados mostram 38% (n=5) dos casos índice eram analfabetos e outros 38% (n=5) apresentaram ensino fundamental incompleto. A maioria dos contatos domiciliares apresentava ensino fundamental incompleto, 64% (n=9), e 21% (n=3) apresentava ensino médio incompleto (TABELA 1).

Tabela 1 - Características clínicas, epidemiológicas e demográficas dos casos-índice e seus contatos domiciliares.

Variável	Casos Índice MB	Contatos Domiciliares
Sexo		
Masculino	9 (69%)	6 (43%)
Feminino	4 (31%)	8 (57%)
Idade^a		
Média ($\pm$ DP)	51 ($\pm$ 18) *	36 ($\pm$ 36)
Mediana	54	30,5
Mínimo	16	16
Máximo	76	65
Presença de Cicatriz BCG		
0	7 (55%)	0 (0%)
1	4 (31%)	8 (57%)
2	1 (7%)	6 (43%)
Informação não coletada	1 (7%)	0 (0%)
Classificação Operacional		
Multibacilar	13 (100%)	NA
Classificação de Madri		
Dimorfa	10 (77%)	NA
Virchoviana	2 (15%)	NA
Informação não coletada	1 (8%)	NA
Tempo de tratamento^b		
Em tratamento	10 (77%)	NA
Tratamento finalizado	3 (23%)	NA
Tempo de convívio do contato com o caso (em anos)		
Média ($\pm$ DP)	NA	19
Mediana	NA	16
Mínimo	NA	4
Máximo	NA	36
Grau de parentesco do contato com o caso índice		
Sem grau de parentesco	NA	6 (43%)
Com grau de parentesco	NA	8 (57%)
Grau de escolaridade		
Analfabeto	5 (38%)	1 (7,5%)
Fundamental incompleto	5 (38%)	9 (64%)
Fundamental completo	0 (0%)	0 (0%)
Ensino médio incompleto	2 (16%)	3 (21%)
Ensino médio completo	1 (8%)	0 (0%)
Superior completo	0 (0%)	1 (7,5%)

Nota: ^a Idade à época da entrevista

^b Tempo de tratamento à época da entrevista/coleta de sangue

* $p < 0,05$. NA – Não se aplica; DP – Desvio padrão. Dados obtidos no SINAN.

A tabela 2 mostra o detalhamento das características clínicas, epidemiológicas de cada caso-índice, tais como idade, sexo, classificação de Madri, tempo de tratamento a partir da data do diagnóstico, número de cicatrizes da vacina BCG, número de lesões e de nervos afetados, o resultado da baciloscopia e o índice baciloscópico. As caselas preenchidas com NI (não informado) foram em decorrência da ausência de informações na base de dados do SINAN.

Tabela 2 - Detalhamento das características clínicas e epidemiológicas de cada caso-índice.

Caso Índice	Idade	Sexo	Class. Madri	Tempo tratamento (Meses) *	Nº Cicatriz BCG	Nº Lesões	Nº Nervos	Baciloscopia	IB
CI1	58	M	V	10	0	20	4	Positiva	NI
CI2	53	F	D	5	NI	10	NI	Positiva	NI
CI3	46	M	D	10	0	10	3	Positiva	NI
CI4	47	M	D	3	1	7	3	Positiva	NI
CI5	54	F	D	12	1	5	2	Positiva	NI
CI6	16	M	V	4	1	0	4	Positiva	NI
CI7	16	M	D	7	2	10	NI	Positiva	NI
CI8	75	F	D	30	0	12	2	Positiva	0
CI9	62	M	D	1	0	NI	NI	Positiva	NI
CI10	58	M	D	1	0	15	2	Positiva	4
CI11	76	M	D	11	0	2	1	Positiva	NI
CI12	48	F	D	8	0	8	6	Positiva	NI
CI13	54	M	NI	30	1	NI	NI	Positiva	3

CI: Caso-Índice; D: Dimorfa; V: Virchoviana; IB: Índice Baciloscópico; M: Masculino, F: Feminino; NI: Não Informado.

* Tempo de tratamento decorrido a partir da data do diagnóstico até a visita domiciliar. Importante: todos os CI que terminaram o tratamento, o receberam por 12 meses.

Dados provenientes do SINAN. Tabela elaborada pelo autor.

A Tabela 3 mostra o detalhamento das características clínico-epidemiológicas de cada contato domiciliar (idade, sexo, número de cicatrizes da BCG, grau de parentesco, tempo de convívio, tipo de convívio, situação de convívio) em relação a si e em relação ao caso índice. Oito (n=8) contatos domiciliares apresentavam algum grau de parentesco com o caso índice (neto, filho, irmão) e o restante, n=6, era cônjuge, portanto, sem qualquer grau de parentesco. O tempo de convívio com o caso índice variou de 4 a 36 anos. O número de contatos domiciliares que compartilhavam o mesmo cômodo do caso índice, à data do diagnóstico, foram de 6 indivíduos (tipo de convívio). A grande maioria dos contatos domiciliares ainda residia com o caso índice à data da visita domiciliar (n=12).

Tabela 3 - Detalhamento das características clínico-epidemiológicas de cada contato domiciliar.

Contato Domiciliar	Idade	Sexo	Número de Cicatrizes de BCG	Grau Parentesco	Tempo Convívio (anos) *	Tipo Convívio**	Situação de contato***
CD1	65	F	1	Cônjuge	4	Cômodo	Reside
CD2	16	F	2	Neto	16	Domicílio	No diag.
CD3	36	F	1	Cônjuge	20	Cômodo	Reside
CD4	23	F	2	Filho	23	Domicílio	5 anos antes diag.
CD5	25	M	1	Filho	NI	Domicílio	Reside
CD6	18	M	1	Irmão	16	Domicílio	Reside
CD7	18	M	2	Irmão	16	Cômodo	Reside
CD8	36	M	1	Filho	36	Domicílio	Reside
CD9	27	F	2	Não Cons.	10	Domicílio	Reside
CD10	62	M	1	Irmão	13	Domicílio	Reside
CD11	59	F	2	Cônjuge	32	Cômodo	Reside
CD12	57	M	1	Cônjuge	32	Cômodo	Reside
CD13	32	F	2	Irmão	13	Domicílio	Reside
CD14	29	F	1	Cônjuge	14	Cômodo	Reside

CD: Contato Domiciliar; Não Cons: Não consanguíneo; Diag: diagnóstico.

* Tempo total de convivência do CD com o CI.

** Relativo à data da visita domiciliar.

*** Relativo à data da visita domiciliar.

Dados coletados através de questionário no momento da visita domiciliar - Tabela elaborada pelo autor.

6.2 O perfil imunofenotípico de leucócitos é diferente entre casos índice MB e seus contatos domiciliares

O perfil fenotípico das populações celulares de neutrófilos e monócitos do sangue periférico está representado na Figura 9. Não observamos diferenças significativas na frequência de neutrófilos entre os grupos CI e CD (Figura 9A). Neutrófilos dos grupos CI e CD também não demonstraram diferença significativa na expressão de CD80, CD86 e HLA-DR (Figura 9A).

A frequência dos monócitos foi significativamente maior em CI que CD (Figura 9B). Observamos ainda maior expressão de CD86 nos monócitos do grupo CI que em CD (Figura 9B). Quanto à expressão das moléculas CD80 e HLA-DR não foi observada diferenças entre os dois grupos estudados (Figura 9B).

As variações detalhadas da frequência (%) e da intensidade média de fluorescência (IMF) de neutrófilos e monócitos do sangue periférico de CI e CD estão detalhadas na tabela 4.

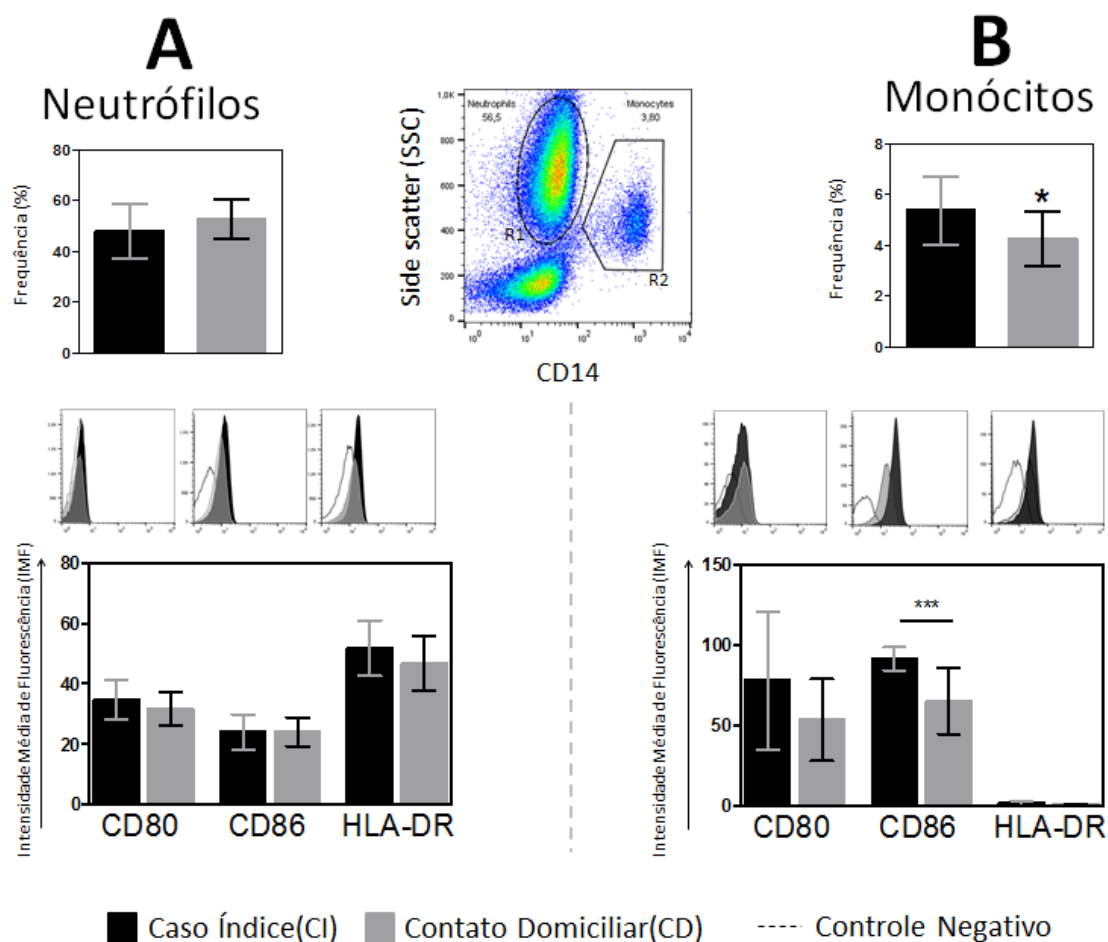


Figura 9. Avaliação imunofenotípica de neutrófilos (A) e monócitos (B). Os gráficos de barras destacam a mediana e o intervalo interquartil. O gráfico de dispersão de pontos mostra as estratégias de análises adotadas. Os histogramas são representativos de uma das amostras aleatoriamente. Os grupos avaliados foram casos-índices (CI, preto, n=13) e seus contatos domiciliares (CD, cinza, n=14). Diferenças estatísticas (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) entre os grupos foram avaliadas de acordo com o teste de Mann-Whitney e demonstradas por linhas e asteriscos.

Tabela 4 – Variações da frequência (%) e da intensidade média de fluorescência (IMF) de neutrófilos e monócitos do sangue periférico de CI e CD.

	Caso-índice (CI)	Contato Domiciliar (CD)
	Média (±DP) - (mínimo-máximo)	
Neutrófilos (%)	47,9 (±10,7) - (29,9-67,8)	52,72 (±7,9) - (34,7-64,2)
CD80 (IMF)	34,7 (±6,4) - (22,8-47,2)	31,6 (±5,6) - (20,7-38,8)
CD86 (IMF)	23,9 (±5,8) - (14,2-36,4)	24,1 (±4,8) - (16,9-31,9)
HLA-DR (IMF)	51,7 (±9,2) - (39-65,5)	46,7 (±8,9) - (32,5-61,9)
Monócitos (%)	5,3 (±1,3) - (3,2-7,3)	4,25 (±1,1) - (3,1-5,9) *
CD80 (IMF)	77,7 (±42,8) - (27,3-172)	53,4 (±25,5) - (28,2-105)
CD86 (IMF)	30,3 (±3,3) - (23,3-35,1)	25 (±2,8) - (20-28,2) ***
HLA-DR (IMF)	57 (±15,5) - (37,8-94)	52,3 (±7,7) - (39-63,8)

DP: desvio padrão. IMF: intensidade média de fluorescência. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Teste de Mann-Whitney – CD em relação a CI. Tabela elaborada pelo autor.

6.3 O perfil de linfócitos TCD4+ e TCD8+ ativados difere casos índice MB de seus contatos domiciliares

O perfil fenotípico das populações celulares de linfócitos do sangue periférico está representado na Figura 10. A frequência de linfócitos totais demonstrou-se semelhante entre os grupos avaliados (Figura 10A). Entretanto, o grupo CI demonstrou menor frequência de linfócitos T CD4+ comparado com CD (Figura 10B). Diferenças na frequência de linfócitos T CD8+ não foram observadas entre CI e CD (Figura 10C). Ambos, linfócitos T CD4+ e CD8+, demonstraram a expressão de CD25 diminuída em CD comparado a CI (Figuras 10B-C). A expressão de CD28 e CTLA-4 foi semelhante em linfócitos T CD4 e CD8 entre os grupos avaliados (Figuras 10B-C).

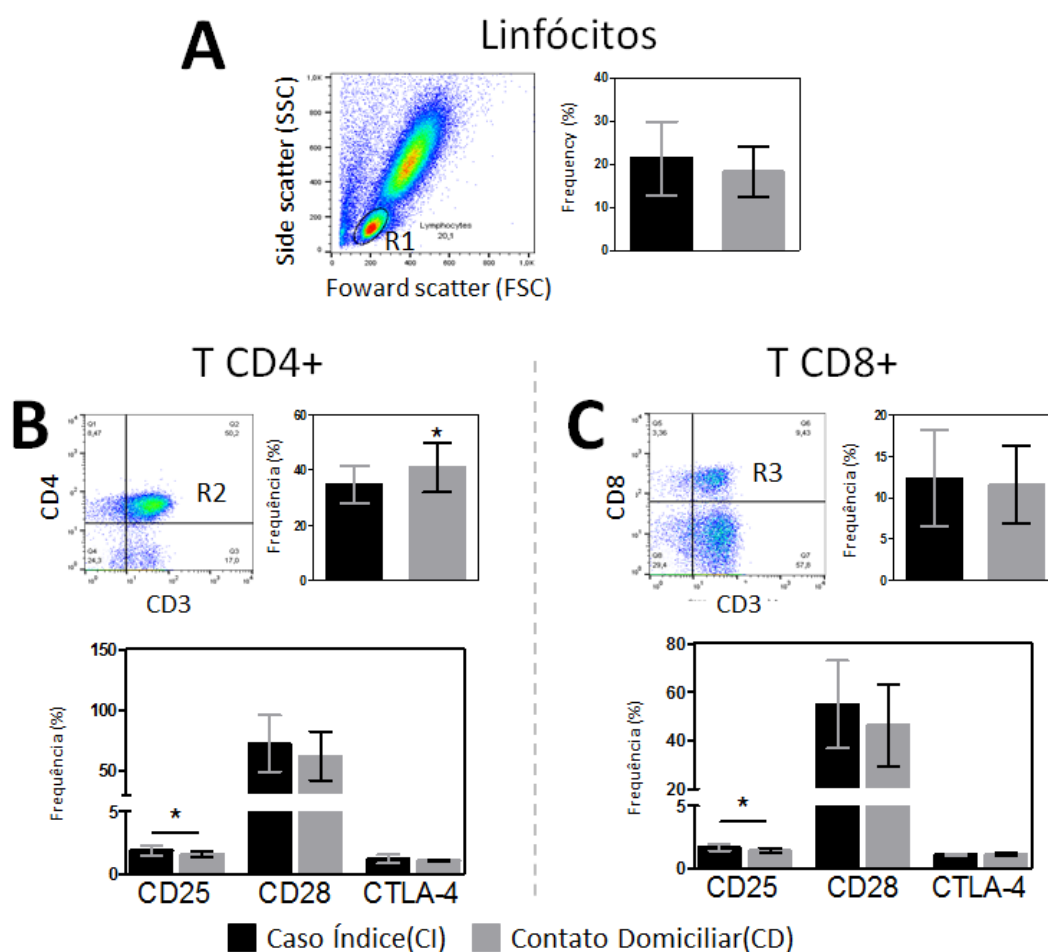


Figura 10. Avaliação imunofenotípica de linfócitos. Os gráficos de barras destacam a mediana e o intervalo interquartil. Os gráficos de dispersão de pontos mostram as estratégias de análises adotadas. (A) Linfócitos totais. (B) Linfócitos T CD4+. (C) Linfócitos T CD8+. Os grupos avaliados foram casos índices (CI, preto, n=13) e seus contatos domiciliares (CD, cinza, n=14). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos foram avaliadas de acordo com o teste de Mann-Whitney e demonstradas por linhas e asteriscos.

Tabela 5 – Variações da frequência (%) e da intensidade média de fluorescência (IMF) de linfócitos do sangue periférico de CI e CD.

	Caso índice (CI)	Contato Domiciliar (CD)
	Média ($\pm$ DP) / mediana (mínimo-máximo)	
Linfócitos Totais (%)	21,3 ($\pm$ 8,5) / 20,9 (8,7-35,2)	18,2 ($\pm$ 5,8) / 18,9 (8,9-30,1)
Linfócitos TCD4+ (%)	34,7 ($\pm$ 6,9) / 34,1 (24,8-50,6)	40,9 ($\pm$ 8,8) / 37,5 (30,6-61,5) *
CD4+CD25+	1,8 ($\pm$ 0,37) / 1,8 (1,36-2,67)	1,6 ($\pm$ 0,37) / 1,5 (1,17-1,95) *
CD4+CD28+	72,3 ($\pm$ 23) / 70,4 (35,4-117)	61,8 ($\pm$ 20,1) / 59,5 (25,9-95,9)
CTLA-4	1,2 ($\pm$ 0,35) / 1,04 (1,01-1,17)	1,06 ($\pm$ 0,46) / 1,07 (1,01-1,17)
Linfócitos TCD8+ (%)	12,3 ($\pm$ 5,8) / 13,2 (0,5-23,1)	11,6 ($\pm$ 4,7) / 13,4 (5,7-18,9)
CD8+CD25+	1,6 ($\pm$ 0,27) / 1,58 (1,24-2,14)	1,4 ($\pm$ 0,19) / 1,37 (1,14-1,81) *
CD8+CD28+	55 ($\pm$ 18) / 52,4 (25-85,5)	46,2 ($\pm$ 17) / 44 (17,7-75,1)
CTLA-4	1,07 ($\pm$ 0,07) / 1,05 (1-1,26)	1,1 ($\pm$ 0,07) / 1,09 (1,01-1,22)

DP: desvio padrão. Tabela elaborada pelo autor. Teste de Mann-Whitney - * $p < 0,05$ – CI em relação a CD

6.4 O perfil de citocinas e quimiocinas é semelhante em casos índice MB e seus contatos domiciliares

Para quantificar os níveis séricos basais de citocinas (TNF, IL-6, IFN- γ , IL-17A, IL-2, IL-4, IL-10) (Figura 11A) e quimiocinas (CXCL8, CCL2, CXCL9, CXCL10) (Figura 11B), em pg/mL, foi realizada a técnica de CBA (*Cytometric Bead Array*). Os resultados mostram que os níveis séricos foram semelhantes entre CI e CD. A tabela 6 mostra as variações, em pg/mL, dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas de CI e CD.

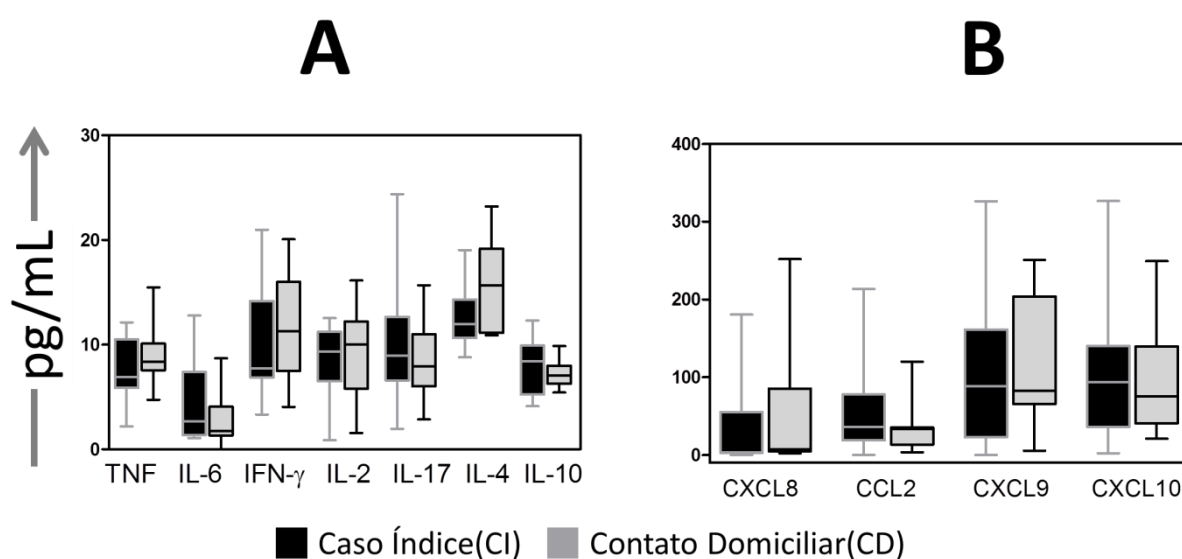


Figura 11. Avaliação dos níveis séricos de citocinas (A) e quimiocinas (B). A concentração sérica foi demonstrada em pg/mL. As barras destacam os quartis 1-3 e os whiskers (bigodes) destacam os limites inferior e superior. Os grupos avaliados foram casos índices (CI, preto, n=13) e seus contatos domiciliares (CD, cinza, n=14). Foi utilizada a técnica de CBA (*Cytometric Bead Array*) (Diferenças estatísticas ($p < 0,05$; Teste de Mann-Whitney) entre os grupos foram avaliadas de acordo com o teste de Mann-Whitney e demonstradas por linhas e asteriscos.

Tabela 6 – Variações em pg/mL dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas de CI e CD.

	Caso índice (CI)	Contato Domiciliar (CD)
	Média (±DP) / mediana (mínimo-máximo) (pg/mL)	
TNF	7,4 (±2,9) / 6,9 (2,18-12,13)	8,8 (±2,6) / 8,3 (4,72-15,47)
IL-6	4,3 (±3,6) / 2,6 (1,07-12,79)	2,7 (±2,4) / 1,7 (0,0-8,71)
IFN-γ	10,5 (±5,1) / 7,7 (3,33-20,98)	11,7 (±4,9) / 11,3 (4,0-20,06)
IL-2	8,5 (±3,7) / 9,3 (0,87-12,53)	9,3 (±4,1) / 10,0 (1,55-16,13)
IL-17	10,3 (±5,4) / 8,9 (1,95-24,37)	8,2 (±3,6) / 7,9 (2,84-15,68)
IL-4	12,4 (±2,9) / 12 (8,79-19,04)	15,6 (±4,3) / 15,7 (10,89-23,21)
IL-10	7,8 (±2,5) / 8,4 (4,11-12,30)	7,2 (±1,3) / 7,0 (5,43-9,87)
CXCL8	33,9 (±58,8) / 3,4 (0,00-180,6)	44,9 (±76,3) / 7,4 (2,25-251,8)
CCL2	57,3 (±59,1) / 36,4 (0,25-213,5)	34,7 (±59,1) / 33,4 (3,73-120,0)
CXCL9	114,2 (±106,5) / 88,4 (0,00-326,3)	109,7 (±77,7) / 82,6 (5,76-250,8)
CXCL10	112,3 (±94,0) / 94,1 (2,30-326,6)	99,8 (±76,6) / 75,4 (21,21-249,3)

Níveis séricos de citocinas e quimiocinas em pg/mL em CI e CD. Teste de Mann-Whitney. DP: desvio padrão. Tabela elaborada pelo autor.

6.5 O perfil de IgM/IgG difere casos índice MB de seus contatos domiciliares

Para demonstrar o perfil de imunoglobulinas de CI e CD, foram dosados os níveis de IgM a partir de antígenos NDO-HSA, LID-1 e IgM/IgG NDOLID. CI apresentaram níveis significativamente maiores das imunoglobulinas que CD (Figura 12). A tabela 7 mostra as variações, em índice ELISA (IE), dos níveis séricos de IgM anti- NDOHSA, LID-1, NDOLID. A figura 13 mostra os níveis de IgM/IgG (IE – índice ELISA) pelo tempo decorrido do início do tratamento medicamentoso em CI. Pode-se observar que coeficiente de correlação de Spearman ($r=-0,25$) indica uma correlação negativa fraca, porém não significativa ($p=0,39$). A linha tracejada define o IE positivo maior que 1,1. Constata-se que 4 dos 13 CI ainda apresentavam níveis negativos de IgM no momento da coleta de sangue por ocasião da visita domiciliar.

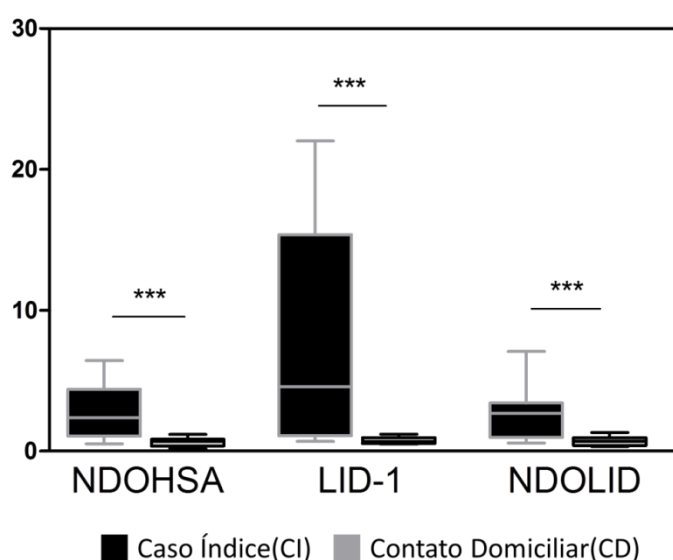


Figura 12. Avaliação dos níveis séricos IgM/IgG anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID. A concentração sérica foi demonstrada em índice ELISA (IE). As barras destacam os quartis 1-3 e os whiskers destacam os limites inferior e superior. Os grupos avaliados foram casos índices (CI, preto, $n=13$) e seus contatos domiciliares (CD, cinza, $n=14$). Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos foram avaliadas de acordo com o teste de Mann-Whitney e demonstradas por linhas e asteriscos.

Tabela 7 – Variações em índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM/IgG anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID.

	Caso índice (CI)	Contato Domiciliar (CD)
	Média ($\pm$ DP) / mediana (mínimo-máximo)	
NDOHSA	2,85 ($\pm$ 1,9) / 2,4 (0,52-6,43)	0,6 ($\pm$ 0,3) / 0,69 (0,16-1,18) ***
LID-1	7,7 ($\pm$ 8) / 4,5 (0,7-22,03)	0,76 ($\pm$ 0,25) / 0,67 (0,51-1,21) ***
NDOLID	2,6 ($\pm$ 2,02) / 2,6 (0,57-7,08)	0,7 ($\pm$ 0,33) / 0,7 (0,33-1,33) ***

DP: desvio padrão. LID-1 - *Leprosy IDRI diagnostic 1*. NDOHSA – *Natural disaccharide linked to human serum albumin via octyl*. NDOLID – *Natural disaccharide octyl - Leprosy IDRI Diagnostic 1*. Teste de Mann-Whitney. *** $p < 0,001$ – CD em relação a CI. Tabela elaborada pelo autor.

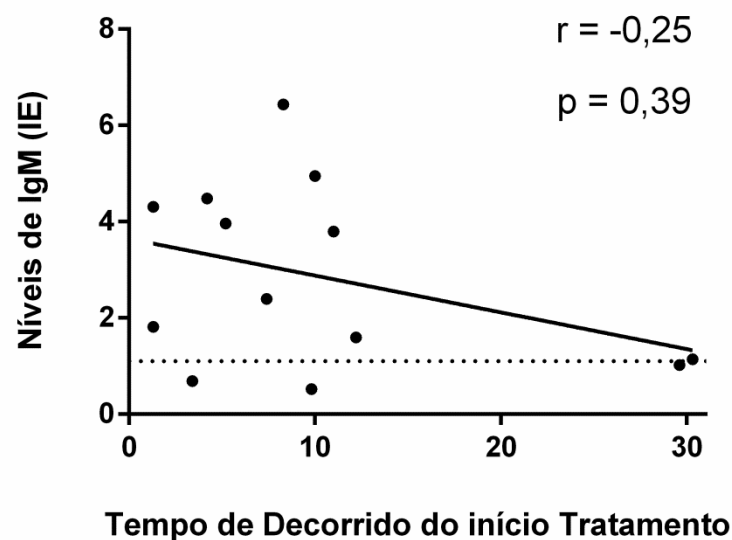


Figura 13 – Níveis de IgM/IgG (IE – índice ELISA) x tempo decorrido do início do tratamento medicamento em CI (n=13). Linha tracejada define o IE positivo maior que 1,1. r: coeficiente de correlação de Spearman. p: valor p de significância.

6.6 Os parâmetros imunológicos relativos às características clínicas e epidemiológicas de casos índice MB e seus contatos domiciliares são semelhantes

A tabela 8 mostra a comparação dos parâmetros imunológicos de casos índices por sexo (masculino e feminino) de casos índice. Não houve nenhuma diferença significativa entre os sexos.

Tabela 8 – Comparação dos parâmetros imunológicos de casos índices MB por sexo

	Masculino (n=9)			Feminino (n=4)		
	Mediana	Mín	Máx	Mediana	Mín	Máx
IL-17A	2,0	8,4	24,4	8,3	11,5	11,9
IFN- γ	3,3	7,7	21,0	6,7	10,6	15,9
TNF	4,2	6,9	12,1	2,2	8,2	10,8
IL-10	4,9	8,9	12,3	4,1	7,5	10,6
IL-6	1,1	2,7	7,6	1,1	4,8	12,8
IL-4	8,8	11,8	15,6	9,0	13,3	19,0
IL-2	0,9	10,2	11,7	1,8	6,5	12,5
CCL2	10,3	44,0	213,5	0,3	9,7	19,1
CXCL9	19,9	63,8	161,5	0,0	200,2	326,3
CXCL8	2,6	3,4	180,6	0,0	22,2	44,3
CXCL10	22,0	93,0	249,3	2,3	116,2	326,6
NDOHSA	0,5	2,4	5,0	1,0	2,8	6,4
LID-1	0,8	4,6	19,6	0,7	9,2	22,0
NDOLID	0,6	2,7	5,8	1,0	2,6	7,1
Neutr CD80+	0,0	0,2	0,6	0,1	0,1	0,1
Neutr CD86+	0,0	0,5	3,9	0,8	1,3	4,2
Neutr HLA-DR	0,0	0,3	1,1	0,3	0,5	0,8
Mono CD80+	0,1	0,2	1,2	0,1	0,3	0,7
Mono CD86+	74,3	95,8	97,3	87,4	94,2	97,7
Mono HLA-DR	0,3	0,7	3,0	1,1	2,2	5,2
CD4+	27,5	34,1	50,6	24,8	32,8	40,6
CD4+CD25+	0,2	7,3	27,6	7,5	16,6	34,1
CD4+CD28+	35,4	59,6	100,0	70,4	89,1	117,0
CD4+CD152+	0,0	0,3	0,5	0,1	0,3	0,4
CD8+	0,5	13,2	19,7	6,9	12,9	23,1
CD8+CD25+	0,2	3,0	13,7	3,1	10,3	15,0
CD8+CD28+	25,0	45,3	79,5	52,4	70,9	85,5
CD8+CD152+	0,0	0,2	0,4	0,0	0,4	0,9

Citocinas e quimiocinas: pg/mL; Índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM/IgG anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID; Moléculas de superfície expressas em intensidade média de fluorescência (MFI) ou frequência. Mono: Monócitos; Neutr: Neutrófilos; Mín: Mínimo; Máx: Máximo. * $p < 0,05$.

A tabela 9 compara os parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por sexo (masculino e feminino). Os contatos do sexo masculino apresentaram níveis mais elevados de IFN- γ e IL-10 em relação ao sexo feminino.

Tabela 9 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por sexo

	Masculino (n=8)			Feminino (n=6)		
	Mediana	Mín	Máx	Mediana	Mín	Máx
IL-17A	4,38	8,52	15,68	2,84	7,583	12,52
IFN- γ	10,2 *	14,11	20,06	4,043	8,77	15,86
TNF	7,6	8,86	10,7	4,729	8,24	15,47
IL-10	6,62 *	8,345	9,87	5,43	6,38	7,74
IL-6	1,76	3,64	4,39	0	1,49	8,71
IL-4	11,1	14,27	23,21	10,89	17,09	20,83
IL-2	4,19	7,74	10,76	1,55	12,2	16,13
CCL2	3,73 *	25,23	33,28	9,74	35,11	120
CXCL9	5,76	71,91	250,8	58,78	84,37	218,5
CXCL8	2,25	6,83	95,2	4,7	7,96	251,8
CXCL10	21,21	49,75	100,5	42,3	123,6	249,3
NDOHSA	0,1686	0,4922	0,7754	0,1887	0,8553	2,192
LID-1	0,511	0,583	1,214	0,5226	0,8352	18,54
NDOLID	0,3377	0,4995	0,9535	0,3875	0,8505	5,063
Neutr CD80+	0,013	0,125	0,39	0,075	0,145	0,22
Neutr CD86+	0,14	0,47	0,8	0,25	0,46	0,63
Neutr HLA-DR	0,013	0,2	0,54	0,11	0,3	0,52
Mono CD80+	0,13	0,18	0,64	0,062	0,21	0,44
Mono CD86+	41,5	61,35	89,5	19,1	66,25	91,5
Mono HLA-DR	0,15	0,49	1,82	0,31	0,985	1,88
CD4+	34,2	37,7	47,7	30,6	37,15	61,5
CD4+CD25+	0,34	5,37	14,8	2,22	6,655	8,55
CD4+CD28+	25,9	55,6	95,9	48,4	59,5	79,3
CD4+CD152+	0,031	0,295	0,58	0,1	0,255	0,37
CD8+	6,17	14,8	15,7	5,7	7,525	18,9
CD8+CD25+	0,03	0,98	5,45	0,38	1,695	2,8
CD8+CD28+	17,7	42,95	75,1	32,2	44,15	59,1
CD8+CD152+	0	0,23	0,34	0,097	0,315	0,88

Citocinas e quimiocinas: pg/mL; Índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID; Moléculas de superfície expressas em intensidade média de fluorescência (MFI) ou frequência. Mono: Monócitos; Neutr: Neutrófilos; Mín: Mínimo; Máx: Máximo. * p<0,05.

A tabela 10 compara os parâmetros imunológicos de casos índices por presença de cicatriz de BCG. Não houve diferenças dos parâmetros analisados.

Tabela 10 – Comparação dos parâmetros imunológicos de casos índice MB por presença de cicatriz de BCG

	Sem Cicatriz BCG (n=7)			Com Cicatriz BCG (n=6)		
	Mediana	Mín	Máx	Mediana	Mín	Máx
IL-17A	6,45	11,56	24,37	1,95	6,73	14,34
IFN- γ	5,287	7,37	15,86	3,33	13,24	20,98
TNF	5,54	7,961	11	4,24	6,18	12,13
IL-10	4,96	7,04	12,3	4,86	8,94	9,97
IL-6	1,07	3,62	12,79	1,09	2,65	7,45
IL-4	10,61	12,15	19,04	8,79	12,32	15,63
IL-2	4,44	10,96	12,53	0,87	8,77	11,46
CCL2	10,25	77,91	87,34	19,08	36,42	213,5
CXCL9	19,92	140,8	326,3	23,06	88,47	161,5
CXCL8	2,61	9,4	180,6	3,04	3,395	44,34
CXCL10	21,98	118,9	326,6	26,4	84,73	145,3
NDOHSA	0,5261	3,8	6,439	0,691	1,6	4,486
LID-1	0,6948	4,588	22,03	1,012	1,507	19,6
NDOLID	0,9196	2,669	4,008	0,5781	1,16	5,842
Neutr CD80+	0,032	0,155	0,24	0,05	0,12	0,57
Neutr CD86+	0,23	0,835	2,12	0,025	2,185	4,2
Neutr HLA-DR	0,26	0,38	1,12	0,015	0,33	0,42
Mono CD80+	0,054	0,13	1,16	0,098	0,205	0,51
Mono CD86+	82,5	91,75	97,3	74,3	96	97,7
Mono HLA-DR	0,27	1,12	5,18	0,26	1,465	2,98
CD4+	27,5	31,4	42,5	24,8	34,2	50,6
CD4+CD25+	0,21	7,33	34,1	6,67	8,44	27,6
CD4+CD28+	35,4	59,6	117	44,4	70,4	100
CD4+CD152+	0,074	0,31	0,46	0,028	0,21	0,44
CD8+	10,6	14	19,7	0,48	7,66	23,1
CD8+CD25+	0,17	2,99	15	1,18	5,21	13,7
CD8+CD28+	25	45,3	85,5	41,3	52,4	79,5
CD8+CD152+	0	0,2045	0,86	0,13	0,16	0,26

Citocinas e quimiocinas: pg/mL; Índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID; Moléculas de superfície expressas em intensidade média de fluorescência (MFI) ou frequência. Mono: Monócitos; Neutr: Neutrófilos; Mín: Mínimo; Máx: Máximo. Teste de Man-Whitney. * p<0,05.

A tabela 11 apresenta o comparativo dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por presença de cicatriz de BCG. Não diferenças entre os parâmetros analisados.

Tabela 11 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por presença de cicatriz de BCG

	Uma Cicatriz BCG (n=8)			Duas Cicatriz BCG (n=6)		
	Mediana	Mín	Máx	Mediana	Mín	Máx
IL-17A	6,01	8,208	15,68	2,84	7,043	12,52
IFN- γ	4,043	11,85	20,06	5,287	10,3	16,31
TNF	4,729	8,474	10,14	6,078	8,24	15,47
IL-10	6,26	7,74	9,87	5,43	6,515	7,49
IL-6	0	1,76	4,39	1,12	1,765	8,71
IL-4	10,89	14,27	19,56	10,89	17,71	23,21
IL-2	1,55	7,74	16,13	9,34	12,2	14,21
CCL2	3,73	29,31	35,44	25,23	35,07	120
CXCL9	5,76	90,91	250,8	58,78	77,28	86,09
CXCL8	2,25	7,1	95,2	5,08	46,49	251,8
CXCL10	21,21	59,7	100,5	27,59	139,9	249,3
NDOHSA	0,1686	0,7343	2,192	0,1887	0,6383	1,185
LID-1	0,511	0,837	18,54	0,5226	0,6448	1,193
NDOLID	0,3377	0,6075	5,063	0,3875	0,8438	1,331
Neutr CD80+	0,013	0,12	0,39	0,075	0,16	0,22
Neutr CD86+	0,14	0,44	0,79	0,27	0,545	0,8
Neutr HLA-DR	0,013	0,31	0,54	0,11	0,28	0,42
Mono CD80+	0,092	0,18	0,64	0,062	0,35	0,44
Mono CD86+	41,5	64,1	89,5	19,1	66	91,5
Mono HLA-DR	0,15	0,52	1,88	0,31	0,985	1,39
CD4+	34,2	36,9	47,7	30,6	43	61,5
CD4+CD25+	0,34	4,82	14,8	2,93	6,27	8,16
CD4+CD28+	25,9	62,7	95,9	47	56,5	73,3
CD4+CD152+	0,031	0,25	0,58	0,21	0,31	0,37
CD8+	6,17	13,5	15,7	5,7	6,4	18,9
CD8+CD25+	0,03	0,85	5,45	0,38	2,26	2,43
CD8+CD28+	17,7	49,2	75,1	32,2	39	56,6
CD8+CD152+	0	0,15	0,34	0,12	0,4	0,88

Citocinas e quimiocinas: pg/mL; Índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID; Moléculas de superfície expressas em intensidade média de fluorescência (MFI) ou frequência. Mono: Monócitos; Neutr: Neutrófilos; Mín: Mínimo; Máx: Máximo. * p<0,05.

A tabela 12 compara os parâmetros imunológicos de casos índices em relação ao tempo de tratamento (em meses). Aqueles pacientes que haviam sido tratados por até 6 meses, até a data da coleta de sangue, apresentaram níveis menores de IFN- γ e menor frequência da molécula HLA-DR em monócitos.

Tabela 12 – Comparação dos parâmetros imunológicos de casos índice MB por tempo de tratamento (em meses)

	≤ 6 meses (n=5)			> 6 meses (n=8)		
	Mediana	Mín	Máx	Mediana	Mín	Máx
IL-17A	6,73	11,45	14,34	1,95	8,625	24,37
IFN- γ	3,33 *	7,06	7,71	6,687	13,85	20,98
TNF	2,18	6,292	7,961	5,54	8,625	12,13
IL-10	4,11	4,96	9,82	5,52	8,915	12,3
IL-6	2,31	3	7,64	1,07	2,59	12,79
IL-4	8,79	12,15	12,82	10,61	11,81	19,04
IL-2	8,59	10,19	11,46	0,87	8,795	12,53
CCL2	0,25	77,91	213,5	10,25	33,5	87,34
CXCL9	0	114,6	161,5	19,92	63,79	326,3
CXCL8	0	46,23	180,6	2,61	3,395	44,34
CXCL10	2,3	75	249,3	21,98	106,6	326,6
NDOHSA	0,691	3,964	4,486	0,5261	1,999	6,439
LID-1	1,012	13,92	19,6	0,6948	1,586	22,03
NDOLID	0,5781	2,669	7,087	0,7435	1,943	4,008
Neutr CD80+	0,085	0,16	0,24	0,032	0,07	0,57
Neutr CD86+	0,48	1,3	2,12	0,025	0,835	4,2
Neutr HLA-DR	0,015	0,35	0,64	0,26	0,38	1,12
Mono CD80+	0,098	0,19	0,71	0,054	0,22	1,16
Mono CD86+	74,3	95,2	96,6	82,5	94,45	97,7
Mono HLA-DR	0,26 *	0,275	1,72	1,08	2,23	5,18
CD4+	29,4	33,5	50,6	24,8	34,15	42,5
CD4+CD25+	5,66	9,4	15,2	0,21	7,43	34,1
CD4+CD28+	59,6	71,1	87,5	35,4	63,2	117
CD4+CD152+	0,028	0,26	0,44	0,074	0,29	0,46
CD8+	6,94	12,9	19,7	0,48	13,65	23,1
CD8+CD25+	2,43	6	9,86	0,17	3,025	15
CD8+CD28+	45,3	54,5	73,3	25	46,85	85,5
CD8+CD152+	0,059	0,155	0,75	0	0,26	0,86

Citocinas e quimiocinas: pg/mL; Índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID; Moléculas de superfície expressas em intensidade média de fluorescência (MFI) ou frequência. Mono: Monócitos; Neutr: Neutrófilos; Mín: Mínimo; Máx: Máximo. Teste de Man-Whitney. * $p < 0,05$.

A tabela 13 compara os parâmetros imunológicos de contatos por consanguinidade (consanguíneo e não consanguíneo). Aqueles contatos consanguíneos em relação ao caso índice apresentaram frequência mais elevada da molécula CD152 em linfócitos T CD4.

Tabela 13 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por grau de parentesco com o caso índice

	Consanguíneo (n=8)			Não consanguíneo (n=7)		
	Mediana	Mín	Máx	Mediana	Mín	Máx
IL-17A	4,38	8,52	15,68	2,84	7,583	8,66
IFN- γ	5,287	11,28	20,06	4,043	10,87	15,86
TNF	6,078	8,17	15,47	4,729	8,474	10,14
IL-10	5,99	7,265	8,7	5,43	6,38	9,87
IL-6	1,12	1,88	4,39	0	1,57	8,71
IL-4	10,89	12,93	23,21	10,89	17,09	18,04
IL-2	4,19	9,72	14,21	1,55	10	16,13
CCL2	3,73	29,31	120	9,74	35,11	48,67
CXCL9	5,76	71,91	250,8	71,91	145	218,5
CXCL8	2,25	7,115	95,2	4,7	8,52	251,8
CXCL10	21,21	60,5	249,3	42,3	91,04	249,3
NDOHSA	0,1887	0,4922	1,185	0,1686	0,8553	2,192
LID-1	0,511	0,712	1,214	0,5492	0,767	18,54
NDOLID	0,3818	0,6255	1,331	0,3377	0,8505	5,063
Neutr CD80+	0,02	0,16	0,39	0,013	0,075	0,18
Neutr CD86+	0,14	0,46	0,8	0,25	0,525	0,63
Neutr HLA-DR	0,029	0,28	0,54	0,013	0,29	0,52
Mono CD80+	0,062	0,235	0,64	0,092	0,18	0,44
Mono CD86+	19,1	58,6	89,5	63,9	77,3	91,5
Mono HLA-DR	0,39	0,69	1,82	0,15	0,86	1,88
CD4+	30,6	38,5	52,7	35,7	36,1	61,5
CD4+CD25+	0,34	4,82	11	2,22	7,04	14,8
CD4+CD28+	25,9	56,5	95,9	48,4	62,5	90,9
CD4+CD152+	0,25 *	0,31	0,58	0,031	0,17	0,31
CD8+	5,7	13,4	15,4	6,4	13,5	18,9
CD8+CD25+	0,03	0,98	5,45	0,58	1,695	2,8
CD8+CD28+	17,7	39	75,1	32,2	49,3	71
CD8+CD152+	0,086	0,32	0,88	0	0,12	0,4

Citocinas e quimiocinas: pg/mL; Índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID; Moléculas de superfície expressas em intensidade média de fluorescência (MFI) ou frequência. Mono: Monócitos; Neutr: Neutrófilos; Mín: Mínimo; Máx: Máximo. Teste de Man-Whitney. * $p < 0,05$.

A tabela 14 compara os parâmetros imunológicos de contatos por tipo de convívio com relação ao caso índice (dorme no mesmo cômodo ou no mesmo domicílio). Aqueles contatos que dormiam no mesmo cômodo com o caso índice apresentaram frequência mais elevada de moléculas de CD152 em linfócitos T CD4.

Tabela 14 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por tipo de convívio com relação ao caso índice

	Dorme mesmo cômodo (n=8)			Dorme mesmo domicílio (n=6)		
	Mediana	Mín	Máx	Mediana	Mín	Máx
IL-17A	2,84	7,043	8,66	6,01	10,14	15,68
IFN- γ	4,043	9,83	16,31	5,287	11,28	20,06
TNF	4,729	8,474	10,7	6,078	7,885	15,47
IL-10	5,43	6,32	9,87	5,99	7,265	8,7
IL-6	0	1,41	4,06	1,12	2,55	8,71
IL-4	10,89	17,09	23,21	10,89	12,07	20,83
IL-2	1,55	10	16,13	4,19	10,1	14,21
CCL2	9,74	34,37	48,67	3,73	33,28	120
CXCL9	71,91	137,9	218,5	5,76	82,64	250,8
CXCL8	4,7	7,25	85,58	2,25	13,6	251,8
CXCL10	27,59	83,22	249,3	21,21	80,9	249,3
NDOHSA	0,1686	0,8853	2,192	0,1887	0,5743	1,185
LID-1	0,5248	0,8634	18,54	0,511	0,7388	1,214
NDOLID	0,3377	0,7214	5,063	0,3818	0,7049	1,331
Neutr CD80+	0,013	0,135	0,2	0,02	0,13	0,39
Neutr CD86+	0,25	0,44	0,8	0,14	0,46	0,79
Neutr HLA-DR	0,013	0,205	0,52	0,029	0,29	0,54
Mono CD80+	0,092	0,18	0,44	0,062	0,29	0,64
Mono CD86+	19,1	70,6	91,5	19,1	64,1	89,5
Mono HLA-DR	0,15	0,86	1,88	0,39	0,86	1,82
CD4+	30,6	37,1	61,5	30,6	36,9	52,7
CD4+CD25+	2,22	6,095	14,8	0,34	4,82	11
CD4+CD28+	47	53,9	90,9	25,9	62,5	95,9
CD4+CD152+	0,031 *	0,19	0,31	0,25	0,31	0,58
CD8+	5,7	11,08	15,7	5,7	13,4	18,9
CD8+CD25+	0,38	1,11	2,8	0,03	0,98	5,45
CD8+CD28+	32,2	36,7	71	17,7	49,2	75,1
CD8+CD152+	0	0,275	0,88	0,086	0,31	0,88

Citocinas e quimiocinas: pg/mL; Índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID; Moléculas de superfície expressas em intensidade média de fluorescência (MFI) ou frequência. Mono: Monócitos; Neutr: Neutrófilos; Mín: Mínimo; Máx: Máximo. Teste de Man-Whitney. * p<0,05.

Por fim a tabela 15 compara os parâmetros imunológicos de contatos pelo tempo de convívio (em anos) com relação ao caso índice. Aqueles contatos que conviveram, até o momento da visita domiciliar, por até 15 anos com o caso índice apresentaram frequência mais elevada de linfócitos T CD4 com moléculas de CD28+.

Tabela 15 – Comparação dos parâmetros imunológicos de contatos domiciliares por tempo de convívio (em anos) com relação ao caso índice

	≤ 15 anos (n=5)			> 15 anos (n=8)		
	Mediana	Mín	Máx	Mediana	Mín	Máx
IL-17A	6,01	8,208	11,76	2,84	8,051	15,68
IFN- γ	4,043	11,79	15,86	5,287	10,48	20,06
TNF	4,729	9,415	15,47	6,078	8,24	10,7
IL-10	6,26	7,39	7,99	5,43	6,5	9,87
IL-6	1,33	1,625	8,71	0	1,765	4,39
IL-4	10,89	14,15	20,83	10,89	14,27	23,21
IL-2	1,55	10,38	14,21	4,57	9,72	16,13
CCL2	9,74	34,18	35,11	7,48	33,63	120
CXCL9	58,78	71,91	218,5	5,76	82,64	250,8
CXCL8	6,83	7,81	251,8	2,25	6,24	95,2
CXCL10	39,8	82,95	156,2	21,21	83,22	249,3
NDOHSA	0,1887	0,7754	2,192	0,1686	0,6111	1,185
LID-1	0,5226	0,8107	18,54	0,511	0,7131	1,214
NDOLID	0,3875	0,5134	5,063	0,3377	0,7147	1,331
Neutr CD80+	0,075	0,12	0,18	0,013	0,135	0,39
Neutr CD86+	0,61	0,63	0,79	0,14	0,36	0,8
Neutr HLA-DR	0,12	0,29	0,52	0,013	0,205	0,42
Mono CD80+	0,092	0,13	0,41	0,062	0,18	0,57
Mono CD86+	63,9	66	89,5	19,1	65,3	91,5
Mono HLA-DR	0,39	0,86	1,39	0,15	0,86	1,88
CD4+	36,1	38,2	47,7	30,6	36,45	61,5
CD4+CD25+	2,22	7,04	11	0,34	6,095	14,8
CD4+CD28+	51,3 *	62,5	95,9	25,9	59,6	90,9
CD4+CD152+	0,1	0,31	0,58	0,031	0,265	0,37
CD8+	6,17	13,5	18,9	5,7	11,03	15,7
CD8+CD25+	0,58	2,28	5,45	0,03	1,11	2,8
CD8+CD28+	34,4	49,3	75,1	17,7	44,1	71
CD8+CD152+	0,097	0,12	0,34	0	0,315	0,88

Citocinas e quimiocinas: pg/mL; Índice ELISA (IE) dos níveis séricos de IgM anti-NDOHSA, LID-1, NDOLID; Moléculas de superfície expressas em intensidade média de fluorescência (MFI) ou frequência. Mono: Monócitos; Neutr: Neutrófilos; Mín: Mínimo; Máx: Máximo. Teste de Man-Whitney. * p<0,05.

6.7 O Cenário imunológico geral de casos índice MB e seus contatos é semelhante

Para demonstrar o cenário global imunológico foi utilizada a técnica de escalonamento multidimensional. Este tipo de técnica é utilizado para verificar a similaridade ou dissimilaridade de grupos a fim de fornecer uma visão geral sobre o quão similar ou não é um grupo do outro. A análise de todos os dados em conjunto demonstrou que houve similaridade entre CI e CD, uma vez que houve um agrupamento dos pontos verdes (CI) e alaranjados (CI) (“espaço imunológico”), consequentemente não houve “distância imunológica” significativa ($p=0,18$) (Fig. 14A). Essa similaridade se manteve ao analisar todos os parâmetros imunológicos avaliados retirando da análise os antígenos NDOHSA, LID-1, e NDOLID contra IgM ($p=0,21$) (Fig. 14B). Ao analisarmos somente a reatividade dos antígenos NDOHSA, LID-1, e NDOLID contra IgM/IgG constata-se, claramente, que houve uma separação mais clara entre pontos verdes (CI) e alaranjados (CI) (“espaço imunológico”), com consequente “distância imunológica” significativa entre CI e CD ($p=0,014$) (Fig. 14C).

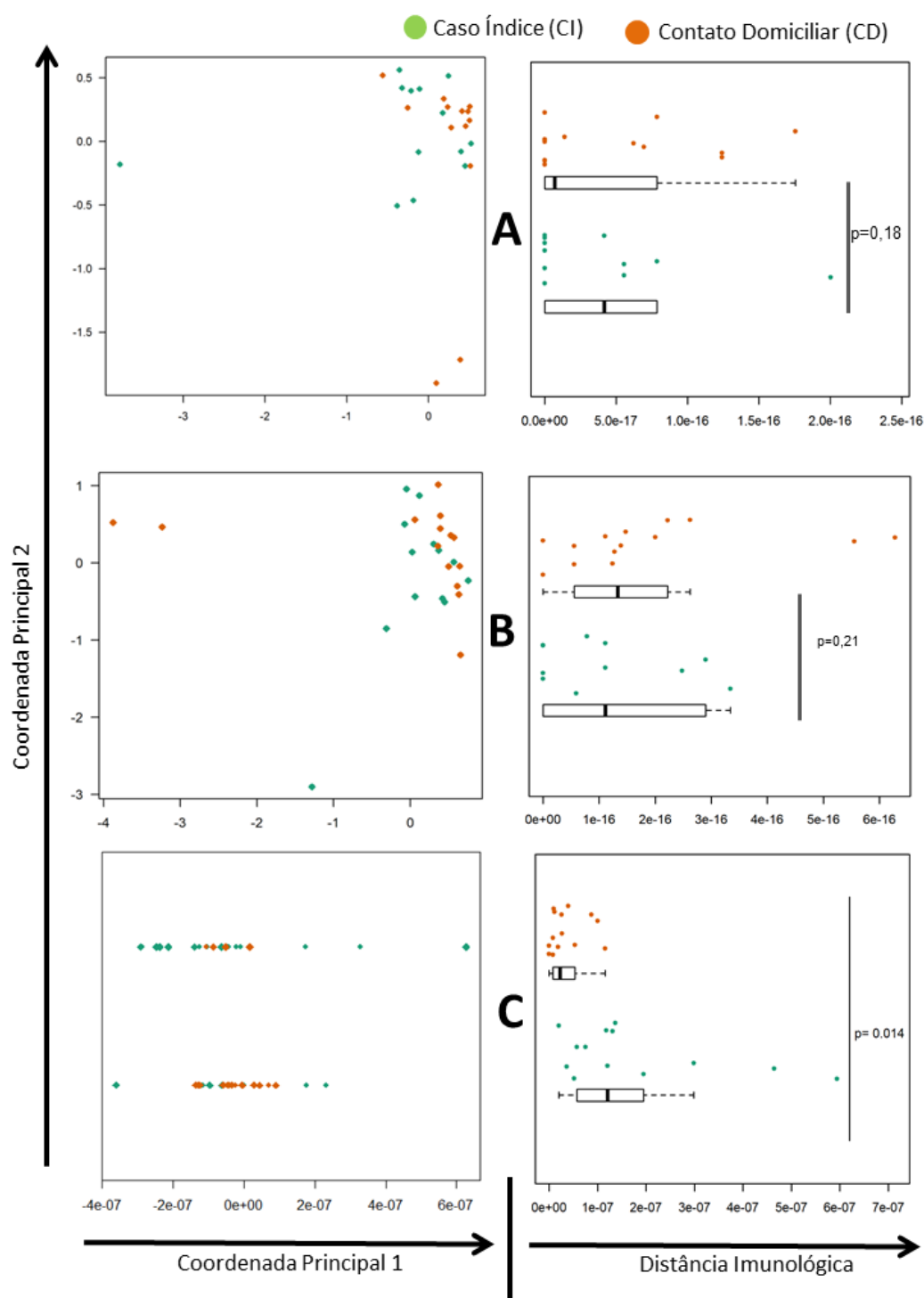


Figura 14 – Escalonamento multidimensional de casos MB e seus contatos domiciliares. As figuras da **esquerda** representam o “espaço imunológico” criado a partir das coordenadas principais 1 e 2. As figuras da **direita** representam a distância imunológica entre CI e CD. [A] Representação do “espaço imunológico” e quantificação da “distância imunológica” entre CI e CD com todos os parâmetros imunológicos avaliados. [B] Representação do “espaço imunológico” e quantificação da “distância imunológica” entre CI e CD com todos os parâmetros imunológicos avaliados menos antígenos NDOHSA, LID-1, e NDOLID contra IgM. [C] Representação do “espaço imunológico” e quantificação da “distância imunológica” entre CI e CD somente dos antígenos NDOHSA, LID-1, e NDOLID contra IgM/IgG. O teste de Mann-Whitney de duas caudas foi utilizado para comparar as distâncias imunológicas. Caixas e linhas centrais representam a faixa interquartil (IQR) e a mediana, respectivamente. Os pontos em verde representam os casos ($n=13$) e os pontos em vermelho representam os seus contatos domiciliares ($n=14$). Os scripts estão disponíveis no anexo C.

6.8 O perfil de correlações é diferente entre os parâmetros imunológicos analisados de casos índice MB e seus contatos domiciliares

A figura 15 mostra as correlações existentes entre todos os parâmetros imunológicos analisados, celulares e humorais além da idade. Nas figuras 15A (CI) e 15B (CD) foi utilizada a correlação de Spearman. Os coeficientes são descritos pela intensidade das cores dos círculos nos correlogramas (cor azul= correlação positiva; cor vermelha= correlação negativa). Quanto maior a intensidade da cor maior a correlação entre as variáveis.

Nas figuras 15C (CI) e 15D (CD) foram representadas as redes de correlações a partir das matrizes de correlação geradas dos diversos parâmetros imunológicos. Os conectores contínuos representam correlações positivas fortes ($r > 0,6$) e os conectores tracejados representam as negativas fortes ($r > 0,6$) (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Percebe-se claramente que o padrão de correlação das variáveis é bem diverso entre CI e CD. Comparando individualmente os parâmetros não se evidenciou nenhuma inversão de correlação dos parâmetros entre os grupos. O perfil de ativação entre CI e CD foi bem semelhante, pois as correlações positivas se mantiveram entre as moléculas CD25+ e CD28+ de linfócitos T CD4+ e CD8+. Outras correlações positivas são as mesmas entre os grupos: IFN- γ x IL-10, CXCL8 x CXCL10, além de correlações quase que perfeitas entre os antígenos NDOHSA, NDO-LID e LID-1.

Outro parâmetro que diferencia bem os grupos é o papel modulador negativo de TNF e IL-10 sobre os níveis de antígenos NDOHSA e NDO-LID, o que não acontece no grupo CI.

A quimiocina CCL2 desempenha papéis inversos nos grupos. Em CI ela modula ou é modulada negativamente por vários parâmetros, já em CD ela modula ou é modulada positivamente por CD4+CD25+.

A citocina IL-17A apresenta modulação negativa com a molécula CD80 presente nos monócitos nos CI ou o contrário. IL-6, que não apresenta papel modulador em casos, apresenta modulação positiva com a frequência de linfócitos T CD8+ e correlação negativa com os antígenos NDOHSA e LID-1 no grupo CD.

Interleucina 2 (IL-2), que aparentemente não apresenta papel modulador em casos, apresenta correlação positiva com a molécula CD152 em linfócitos CD8 e correlação negativa com INF- γ e com a frequência de linfócitos CD8. A quimiocina CCL2 em CI apresenta correlações negativas com os antígenos LID-1 e NDOLID e com a expressão da molécula CD152 em linfócitos CD4+; já no grupo CD ela apresenta uma correlação positiva com a expressão da molécula CD25 de linfócitos CD4+.

O perfil de citocinas anti-inflamatórias IL-6 e IL-10, do grupo CI, não apresenta nenhuma correlação com os antígenos anti-IgM, ao passo que no grupo CD essas citocinas apresentam correlação negativa com pelo menos um dos três antígenos avaliados.

Os parâmetros imunológicos dos CI não apresentam nenhuma correlação com variáveis clínico-epidemiológicas como idade, número de nervos afetados e número de lesões de pele.

Já os parâmetros imunológicos dos CD apresentam correlação positiva com a idade. A molécula CD86 em monócitos varia positivamente com a idade.

Figura 15

A – Correlograma – Casos índice (CI)

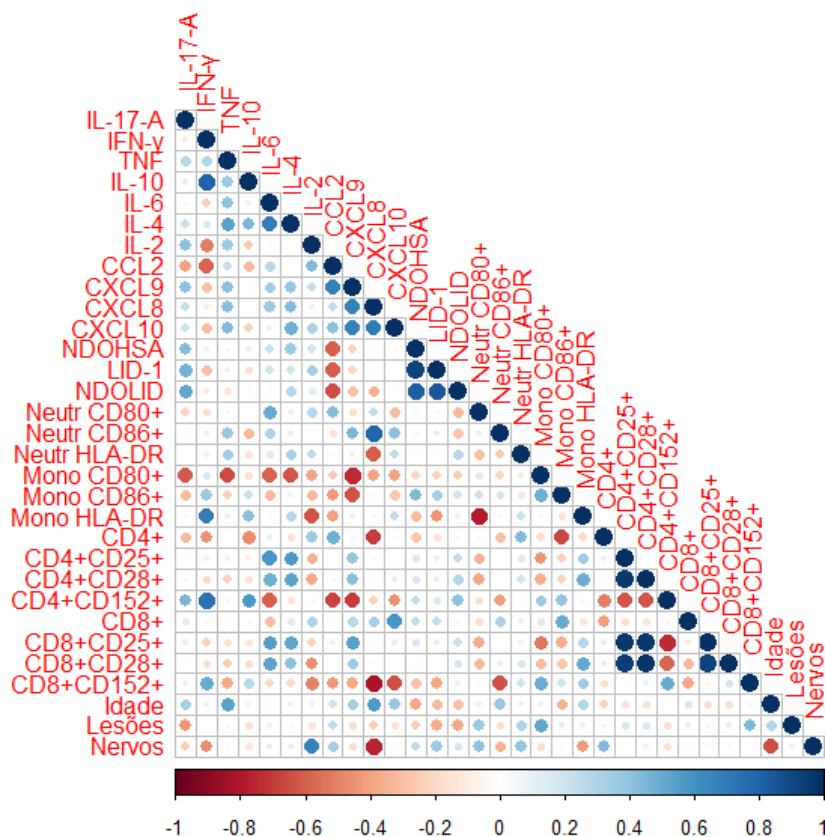


Figura 15 – A e B: Correlograma mostrando padrão de correlações entre moléculas de superfície, citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas séricas de casos MB de hanseníase e seus contatos domiciliares (os coeficientes são descritos pelas cores dos círculos (cor azul= correlação positiva; cor vermelha= correlação negativa - Teste de Spearman). Os scripts estão disponíveis no ANEXO C.

Figura 15B – Correlograma - Contatos domiciliares (CD)

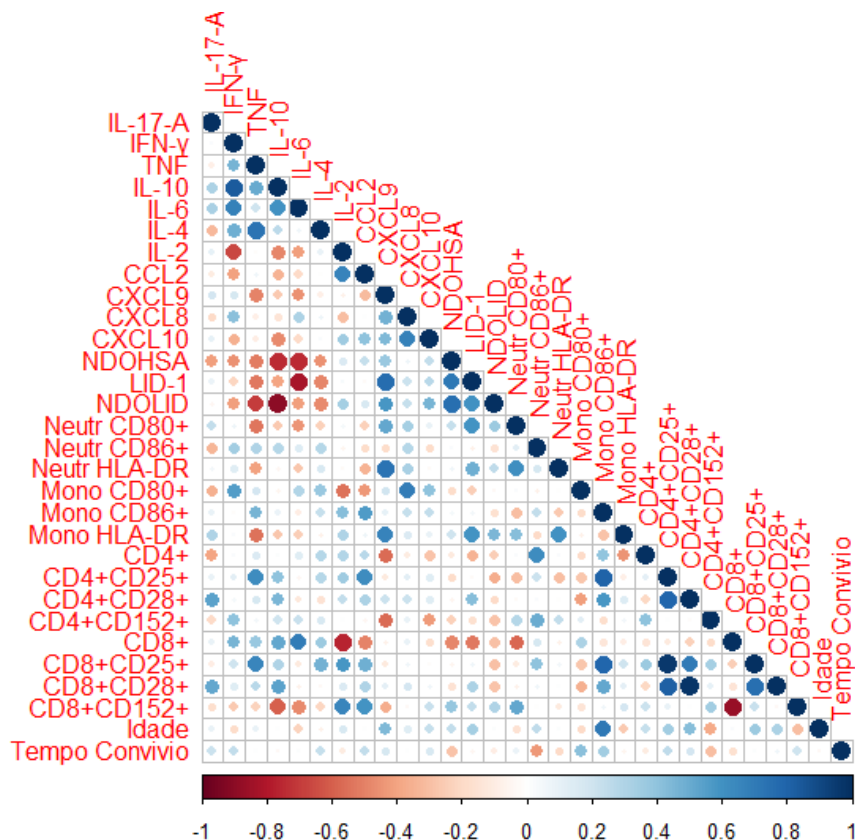


Figura 15C – Rede de correlações – Casos índice (CI)

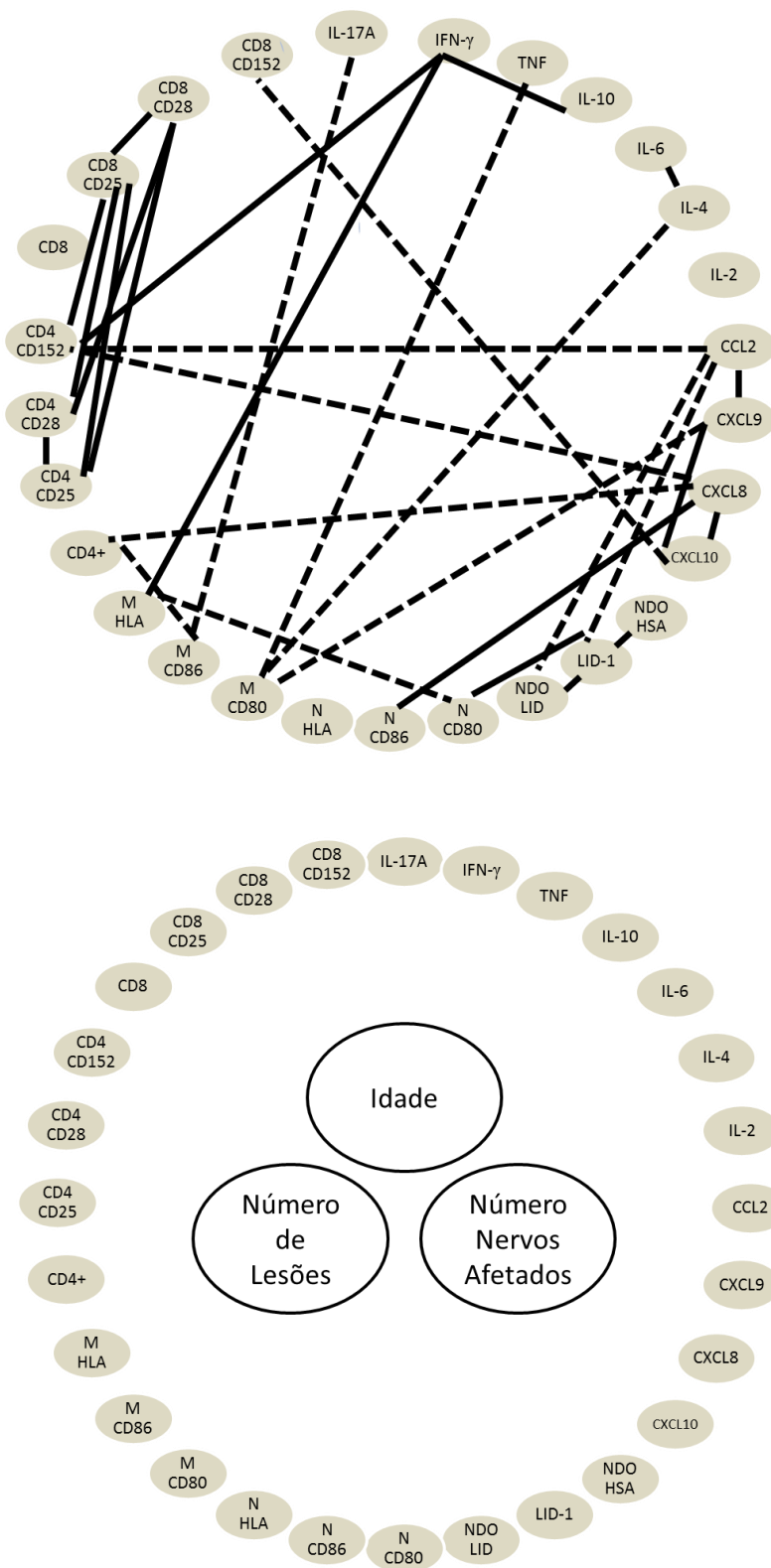


Figura 15 C – Rede de correlações dos parâmetros imunológicos de **casos índice MB (CI) (n=13).** Legenda: N: neutrófilo; M: monócitos. (Conectores contínuos representam correlações positivas fortes e os conectores tracejados representam as negativas fortes ($r > 0,6$)).

Figura 15D – Rede de correlações - Contatos domiciliares (CD)

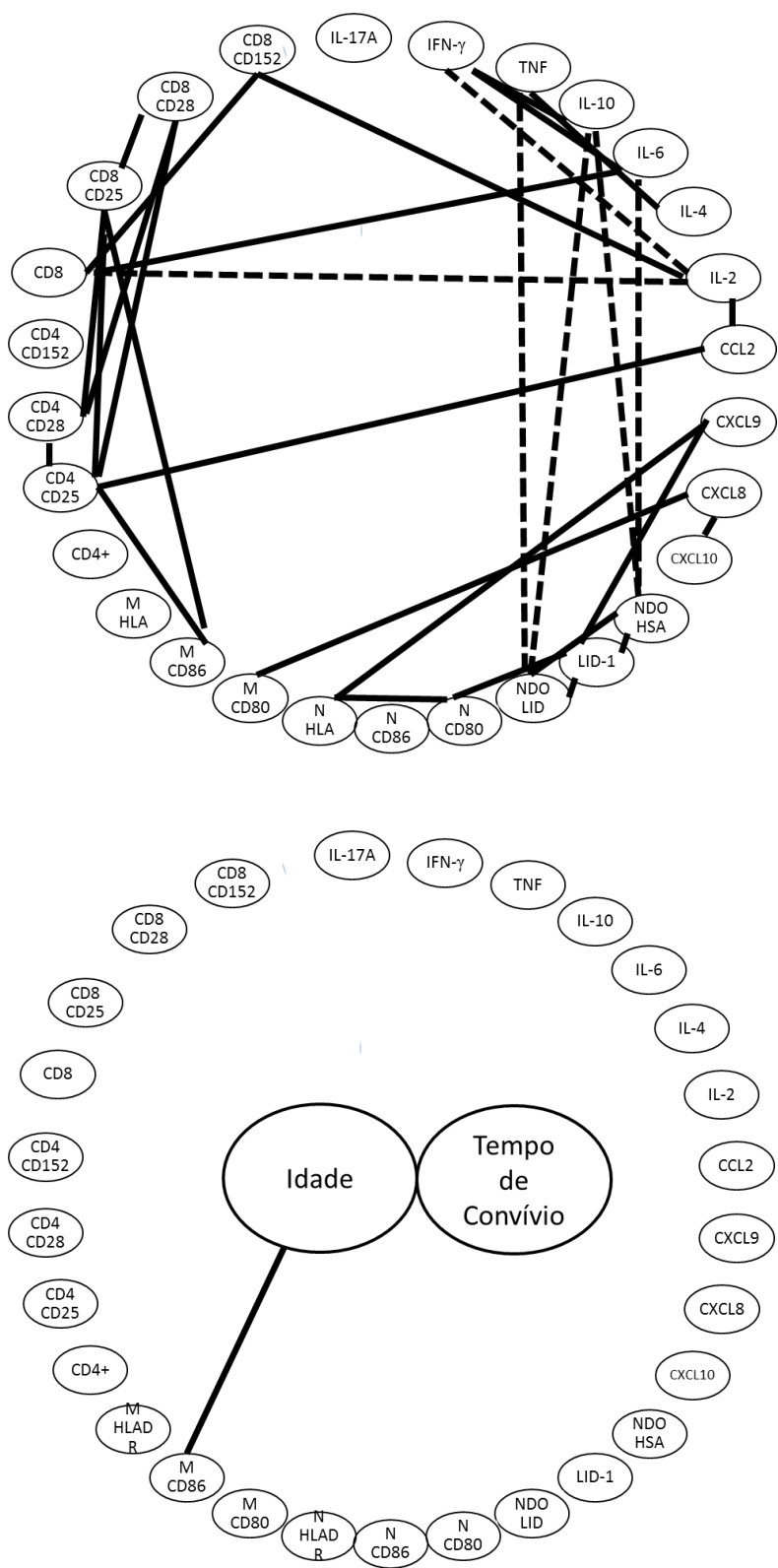


Figura 15 D – Rede de correlações dos parâmetros imunológicos de **contatos domiciliares (CD)** (n=14). Legenda: N: neutrófilo; M: monócitos. (Conectores contínuos representam correlações positivas fortes e os conectores tracejados representam as negativas fortes ($r > 0,6$)).

7 DISCUSSÃO

Apesar dos esforços para a redução das taxas de prevalência e detecção de casos novos, a hanseníase ainda persiste como um relevante problema de saúde pública em diversos países da Ásia, África e América Latina (WHO, 2017). Os principais obstáculos no diagnóstico precoce da hanseníase são o longo período de incubação e de manifestação dos sinais clínicos da doença, além da ausência de bons marcadores de infecção subclínica (NATH et al., 2015). Com o intuito de superar essa dificuldade diagnóstica, procurou-se nesta tese por biomarcadores imunológicos que indicassem infecção subclínica para a realização precoce do diagnóstico e consequente tratamento profilático com vistas à quebra da cadeia de transmissão do bacilo.

Os principais achados neste estudo, que melhor caracterizaram a diferença entre casos-índice de hanseníase e seus contatos domiciliares, foram os níveis elevados de IgM e o maior grau de ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em casos-índice. Os níveis de imunoglobulinas IgM/IgG, a partir de antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDOLID, foram significativamente maiores nos casos-índice do que em seus contatos domiciliares, corroborando com diversos trabalhos (CARVALHO et al., 2017; DUTHIE et al., 2007; FABRI et al., 2015). Para verificar como esse resultado se comportaria em uma abordagem estatística alternativa, diferente da comparação das medianas (Fig. 13), foi aplicada a técnica de escalonamento multidimensional (MDS) aos mesmos parâmetros de reatividade aos diversos antígenos, a qual demonstrou clara e significativa “distância imunológica” entre os grupos (Figura 14C). Assim, este parâmetro imunológico continua sendo um promissor biomarcador de infecção subclínica, ainda que com boa sensibilidade em casos multibacilares e baixa sensibilidade em casos paucibacilares (CHANTEAU et al., 1990a;1990b; CHANTEAU et al., 1993). Neste estudo os contatos domiciliares apresentaram praticamente negatividade para esses testes, o que pode ser devido a um contato insuficiente com o doente ou à resolução eficaz da infecção pelo sistema imunológico. Apesar do presente estudo não ter acompanhado longitudinalmente os envolvidos, a tendência dos níveis de IgM específicos é de queda gradativa após o início do tratamento em casos multibacilares e negatividade quase que permanente em casos paucibacilares (DE CARVALHO et al., 2017).

Outro achado diferencial foi o maior grau de ativação de linfócitos T em casos índice MB. O perfil fenotípico está mais ativado em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ nos casos índice MB que nos contatos domiciliares, constatado por uma maior intensidade de fluorescência nos

linfócitos CD4+CD25+ e CD8+CD25+. Outro estudo mostrou tendência de elevação da frequência dessa população celular, porém não significativa em comparação ao grupo controle e casos paucibacilares (BOBOSHA et al., 2014). Essa ativação aumentada provavelmente é uma resposta à estimulação antigênica pelo bacilo, com consequente maior expressão de CD86 pelos monócitos que ativam esses linfócitos gerando células T efectoras e/ou de memória. Dessa forma é possível que contatos domiciliares possam desenvolver infecção subclínica com a elevação de linfócitos ativados associado com níveis positivos de IgM, podendo ser ambos biomarcadores interessantes a serem avaliados em contatos domiciliares.

Outro parâmetro diferencial foi a menor frequência de linfócitos T CD4+ no sangue periférico em casos índice MB. Essa redução de linfócitos no sangue periférico de casos pode ser devido à migração dessas células para o sítio de infecção tecidual (TSAO et al., 2002) com consequente participação na formação do granuloma (GONZALEZ-JUARRERO et al., 2001; MODLIN et al., 1988).

Os monócitos sanguíneos desempenham papel importante na imunidade inata e adaptativa migrando para o tecido e se transformando em macrófagos, apresentando papel chave na eliminação do bacilo através do processo de fagocitose, participando tanto das respostas imune inata quanto na adaptativa (OHKAWA, 1985). O perfil fenotípico dos monócitos apresentou maior frequência nos casos índice MB que nos seus contatos domiciliares. Essa maior frequência de monócitos em casos índice MB pode ser devido às consequências residuais teciduais da hanseníase que ainda pode estar ativa, uma vez que 77% dos casos índice MB ainda não havia terminado o tratamento medicamentoso. Apesar de não termos avaliado as subpopulações de monócitos, talvez a frequência de monócitos não clássicos e intermediários esteja maior no grupo caso que nos casos, como encontrado por CASTAÑO et al. (2011) (CASTANO; GARCIA; ROJAS, 2011) em estudos com pacientes tuberculosos, explicando, pelo menos em parte, essa frequência mais elevada de monócitos. Outro aspecto que pode explicar a elevação de monócitos em casos-índice é a elevada frequência de macrófagos teciduais em lesões hansênicas de ambas as formas clínicas decorrentes da formação dos granulomas (KAPLAN et al., 1983; VAN VOORHIS et al., 1982) e isso pode refletir em aumento em trânsito de monócitos no sangue periférico, dada a necessidade de interação macrofágica com o bacilo em nível tecidual. Portanto, a elevação de monócitos no sangue periférico de contatos domiciliares poderia sugerir combate ao bacilo, consequentemente, infecção subclínica.

Nós avaliamos também os segundos sinais da resposta imune à hanseníase, importantes para a sobrevivência e expansão de células T, consequentemente da resposta

imune mediada por células contra o bacilo. Encontramos níveis semelhantes na expressão das moléculas CD80 e HLA-DR, tanto em monócitos quanto em neutrófilos, e CD28 e CTLA-4, em linfócitos, em casos-índice e seus contatos domiciliares, o que indica níveis similares de intensidade de resposta imune de segundo sinal, pelo menos no momento da análise fenotípica. Em casos-índice multibacilares, virgem de tratamento, alguns trabalhos mostram que esses casos apresentam redução das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em comparação com casos paucibacilares (AGREWALA et al., 1998; PALERMO MDE et al., 2012; SCHLIENGER et al., 1998) e de CD28 em relação a indivíduos saudáveis (FAFUTIS-MORRIS et al., 1999), indicando anergia, com consequente prejuízo na apresentação de antígenos. A similaridade observada, entre casos índice e contatos domiciliares, pode ser devido aos efeitos do tratamento. De maneira surpreendente os níveis de outra molécula coestimulatória, CD86 em monócitos, estão mais elevados nos casos-índice do que nos seus contatos domiciliares, contrariando os estudos citados acima. Porém, a molécula CD80 parece ser mais importante na manutenção de uma resposta imune mais forte ao bacilo (SCHLIENGER et al., 1998). Devido aos escassos trabalhos envolvendo moléculas de superfície, além de metodologias diferentes da aplicada no presente estudo envolvendo casos índice em tratamento e seus contatos domiciliares, é difícil estabelecer uma explicação clara para a elevada expressão de CD86 em monócitos. Levanta-se a hipótese de que a destruição de bacilos pela MDT (multidroga terapia) poderia resultar em uma maior apresentação de antígenos proveniente da exposição a “novas partículas antigênicas”, com diferentes epítomos, o que poderia levar a uma onda tardia de estimulação de células apresentadoras de antígenos, dentre elas monócitos, com consequente ativação de células T efectoras ou de memória, o que poderia refletir em aumento da frequência de células CD4+CD25+ e CD8+CD25+ nos casos índice deste estudo, explicando este último achado. O aumento de CD86 em macrófagos também pode ser decorrente à idade, significativamente mais elevada dos casos índice, que poderia refletir em aumento da reatividade de células dendríticas, e no presente caso monócitos circulantes, para auto-antígenos como um dos potenciais mecanismos que contribuem para a inflamação associada à idade (AGRAWAL et al., 2009).

O recrutamento de neutrófilos é fundamental para uma interação inicial de sucesso entre defesa do hospedeiro contra a infecção microbiana. O perfil de frequência e das moléculas de expressão dos neutrófilos foi o mesmo em ambos os grupos, tanto moléculas coestimulatórias quanto de moléculas de apresentação. Isso pode ser devido ao tempo decorrido após o início da doença, no qual a imunidade adquirida passa a efetuar as ações de combate ao bacilo, e no caso dos contatos domiciliares a células da imunidade inata, como os

neutrófilos, por exemplo, podem ter conseguido extirpar o agente bacteriano em questão. Outro aspecto que pode indicar ausência de infecção ativa, ou pelo menos a ausência de reações hansênicas do tipo 2 (ENL - *Erythema Nodosum Leprosum*) (LEE et al., 2010) é a similaridade do nível da quimiocina recrutadora de neutrófilos, CXCL8 entre casos-índice e seus contatos domiciliares, haja vista que esta quimiocina está em níveis similares aos dos contatos domiciliares, os quais não apresentaram quaisquer sinais clínicos sugestivos da doença por ocasião da visita domiciliar.

Os níveis de citocinas e quimiocinas têm sido candidatos a biomarcadores de infecção subclínica (GELUK et al., 2012; MARTINS et al., 2012), além de servir de parâmetro para a classificação, o acompanhamento da efetividade do tratamento e indicativo de reações hansênicas (BELGAUMKAR et al., 2007; CASSIRER-COSTA et al., 2017). Porém, no presente estudo o nível de citocinas e quimiocinas não apresentou expressão diferencial, o que limita a busca por biomarcadores presentes no soro. Isso pode ser devido ao fato da maioria dos casos índice estarem com o tratamento em curso, o que é capaz de reduzir os níveis séricos de citocinas e quimiocinas, como mostrado em outros estudos (CASSIRER-COSTA et al., 2017; MOUBASHER et al., 1998b), tanto em pacientes multibacilares quanto paucibacilares. Não podemos afirmar que os níveis de citocinas e quimiocinas estão baixos ou normais, somente que apresenta perfil, tanto inflamatório quanto anti-inflamatório similar. A ausência de estimulação das células com antígenos do *M. leprae* pode ser outro fator que influenciou na similaridade do perfil sérico de citocinas e quimiocinas. Estudos que utilizaram estimulação *in vitro* indicam a potencialidade de algumas quimiocinas e citocinas, tais como CCL2 (MCP-1), e de IFN- γ na avaliação de infecção subclínica (GELUK et al., 2012). Contudo em estudo de Saini et al., avaliando algumas citocinas em níveis basais e com estimulação específica, encontrou resultados bem semelhantes entre esses dois métodos, ao passo que os ensaios em níveis basais (sem estimulação) apresentaram níveis mais baixos de citocinas quando comparados aos ensaios com estimulação específica com frações do bacilo (SAINI; RAMESH; NATH, 2014). Apesar da não realização de experimentos com pacientes paucibacilares, para verificação da expressão diferencial de citocinas e quimiocinas, estudo de Sampaio et al. não evidenciou diferenças em biomarcadores de contatos domiciliares e casos paucibacilares (SAMPAIO, et al. 2012), o que endossa razoavelmente o desenho experimental adotado nesta tese.

A única variável epidemiológica que se correlacionou significativamente, e de maneira positiva, foi a idade com a molécula CD86 de monócitos de contatos domiciliares. Não foi encontrado nenhum resultado sugestivo dessa molécula em específico. Essa molécula de

segundo sinal mais expressa com o avanço da idade significa que os macrófagos estão mais aptos a apresentar antígenos. Um resultado de todo não muito coerente daquilo que sabe do sistema imune em relação à idade, uma vez que a diminuição das funções imunológicas e inflamação crônica são marcas do envelhecimento, pela redução da produção de células T provenientes da medula (KUMAR; CONNORS; FARBER, 2018; SRIDHARAN et al., 2011). O aumento de CD86 em macrófagos pode ser similar ao encontrado por AGRAWAL et al., (2009), em que mostram um aumento da reatividade de células dendríticas de indivíduos idosos para auto-antígenos como um dos potenciais mecanismos que contribuem para a inflamação associada à idade (AGRAWAL et al., 2009).

A partir dos vários parâmetros imunológicos analisados constata-se que a maioria deles apresenta similaridade nos grupos, refletindo em uma ausente distância imunológica entre casos índice e contatos domiciliares. O escalonamento multidimensional trouxe uma visão geral sobre os resultados, avaliando vários parâmetros imunológicos e, ao mesmo tempo, evidenciando similaridade do perfil imunológico de casos índice de hanseníase e seus contatos domiciliares, com consequente “distância imunológica” não significativa. Outros arranjos dos dados nessa abordagem de escalonamento foi a retirada da análise dos parâmetros de IgM, o que não modificou o “espaço” nem a quantificação da “distância imunológica”. Porém, ao se aplicar a análise somente com os níveis de IgM a partir dos três anticorpos utilizados (NDOLID, NDOHSA e LID-1) obteve-se a replicação dos resultados da análise estatística do teste de medianas, mostrando o alinhamento do escalonamento multidimensional com as demais abordagens estatísticas.

A infecção subclínica está presente quando o *M. leprae* está replicando e invadindo o hospedeiro sem ainda causar sintomas clínicos, assim biomarcadores para infecção precoce seriam detectados (GELUK, 2013). Apesar de alguns parâmetros imunológicos se destacarem como preditores de infecção subclínica em contatos domiciliares (níveis de IgM, níveis de ativação de linfócitos, frequência de linfócitos TCD4+ e de monócitos) destaca-se a similaridade geral observada entre casos-índice e contatos domiciliares e isso nos traz algumas indagações. Os conceitos de “distância e espaço imunológicos” introduzidos nesta tese trazem consigo certa ideia de aproximação e distanciamento, sendo assim, será que o contato domiciliar se aproximou do caso-índice ou o contrário aconteceu? Por princípio, o contato domiciliar ainda não está doente, uma vez que ainda não apresentou sinais clínicos da doença no momento da visita domiciliar, além de não possuir incremento de alguns parâmetros diferenciais encontrados neste estudo nos casos índice (níveis elevados de IgM/IgG e de linfócitos ativados, etc.).

Considerando os efeitos do tratamento medicamentoso do caso-índice e da consequente e provável resolução do quadro infeccioso pelo sistema imune, o caso-índice pode ter se aproximado do contato domiciliar devido aos efeitos daquele. Isso é possível. É possível também que a intensidade, frequência e duração da exposição do contato domiciliar com o caso índice MB não foram suficientemente fortes? Também é possível.

Então a similaridade imunológica geral observada entre casos-índice e seus contatos domiciliares pode ser, em razoável medida, resultado da coabitação, pois muito provavelmente casos índice e seus contatos domiciliares compartilharam, em alguma medida, dieta, condições de vida, infecções crônicas, microbioma, condições de bem-estar, poluentes ambientais, etc. (CARR et al., 2016; LISTON; CARR; LINTERMAN, 2016), uma vez que a coabitação entre casos índice e seus contatos domiciliares foi de, no mínimo 4 e de no máximo 36 anos, com média de 19 anos. A distância física de contato é outro fator que contribui para o desfecho da hanseníase em contatos domiciliares (MOET et al., 2006). Outro fator, além do tempo e da distância de convívio, foi o tipo de convívio, onde 6 (seis) dos 14 contatos domiciliares compartilhavam o mesmo cômodo e o restante, 8 (oito) dos 14, o mesmo domicílio. O fator genético também deve ter contribuído para explicar a similaridade imunológica, pois 8 dos 14 contatos possuíam grau de parentesco com caso índice (neto, filho, irmão) (MISCH et al., 2010; MORAES et al., 2006). Todos esses fatores, ambientais e genéticos, compartilhados, modularam e instruíram o sistema imunológico contribuindo para uma convergência dos parâmetros aqui analisados e muito provavelmente de outros não analisados.

Portanto não há como saber ao certo qual a direção da “movimentação imunológica” entre casos e contatos domiciliares, certamente não foi unidirecional, muito provavelmente ambos se movimentaram um em direção ao outro.

As condições ideais para melhorar o entendimento desta “movimentação imunológica” não estão presentes em sua plenitude (o que seria impossível), uma vez que não foi possível o acompanhamento de casos e contatos em momentos subsequentes, além dos pacientes não serem virgens de tratamento. O tratamento dos casos índice reduziu os níveis inflamatórios nos contatos domiciliares, o que pode indicar resolução do processo infeccioso, pois os mesmos não apresentaram nenhum sinal sugestivo no momento do exame físico (DE CARVALHO et al., 2017).

8 CONCLUSÃO

Nós concluímos que a partir dos parâmetros diferencialmente expressos em casos índice MB, infere-se que a da resposta humoral específica em elevação, maior nível de ativação de linfócitos (com provável proliferação e diferenciação em células T efectoras e/ou de memória), maior frequência de monócitos em trânsito no sangue periférico, avaliados em conjunto, podem ser opções de biomarcadores preditores de infecção subclínica em contatos domiciliares.

A similaridade imunológica observada em vários parâmetros imunológicos de casos índice MB e seus contatos domiciliares pode ser devida aos efeitos do tratamento medicamentoso do caso índice, além da coabitação e do compartilhamento de condições gerais de vida.

Em relação à hipótese inicialmente formulada de que o perfil da resposta imune é diferente entre casos índice multibacilares de hanseníase e seus contatos domiciliares, em uma análise transversal, e está relacionado com variáveis clínicas e epidemiológicas, ela se mostra parcialmente confirmada. Os parâmetros imunológicos diferencialmente expressos entre os grupos são de certa forma coerentes e alguns até esperados, tais como a resposta humoral específica e frequência de linfócitos ativados.

Sugerimos estudos longitudinais em casos índice MB e contatos domiciliares que viriam preencher algumas lacunas deixadas no presente estudo transversal como, por exemplo, a direção da “movimentação imunológica” entre os grupos aqui estudados.

9 REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. **International Journal of Leprosy**, v. 48, n. 2, p. 109-119, 1980.
- AGRAWAL, A. et al. Increased reactivity of dendritic cells from aged subjects to self-antigen, the human DNA. **J Immunol**, v. 182, n. 2, p. 1138-45, Jan 15 2009.
- AGREWALA, J. N.; KUMAR, B.; VOHRA, H. Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy. **Clin Exp Immunol**, v. 111, n. 1, p. 56-63, Jan 1998.
- ARAUJO, M. G. [Leprosy in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 3, p. 373-82, May-Jun 2003.
- ARAUJO, 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 Suppl 1, p. 55-9, Dec 2012.
- BAGSHAW, A. et al. BCG vaccination in leprosy: final results of the trial in Karimui, Papua New Guinea, 1963-79. **Bull World Health Organ**, v. 67, n. 4, p. 389-99, 1989.
- BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; FERREIRA, A. A. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 3 Suppl, p. S45-54, Jul 2006.
- BELGAUMKAR, V. A. et al. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. **Lepr Rev**, v. 78, n. 3, p. 223-30, Sep 2007.
- BOBOSHA, K. et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 4, p. e2773, Apr 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Saúde Brasil 2009: Uma Análise da Situação de Saúde e da Agenda Nacional e Internacional de Prioridades em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 370 p.
- 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] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação em Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação / Boletim Epidemiológico. Volume 44, n.º 11 – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 12 p., 2008.

BRASIL. Saúde Brasil 2009: Uma Análise da Situação de Saúde e da Agenda Nacional e Internacional de Prioridades em Saúde. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2010.

BRATSCHI, M. W. et al. Current knowledge on Mycobacterium leprae transmission: a systematic literature review. **Lepr Rev**, v. 86, n. 2, p. 142-55, Jun 2015.

BRITO DE SOUZA, V. N. Imunologia da Hanseníase. In: Elíoenai Dornelles Alves; Telma Leonel Ferreira; Isaias Nery Ferreira (Org.). **HANSENÍASE AVANÇOS E DESAFIOS**. 1ed. Brasília: Universidade de Brasília - UnB, 2014, p.105-130.

BUHRER-SEKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 1991-5, May 2003.

BÜHRER-SEKULA, S. et al. Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera. *Journal Immunology Methods* .21;238(1-2):55-8.

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. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 703-7, Nov 2005.

CARDONA-CASTRO, N., 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**, 100: 703-707, 2005.

CARR, E. J. et al. The cellular composition of the human immune system is shaped by age and cohabitation. **Nat Immunol**, v. 17, n. 4, p. 461-468, Apr 2016.

CARVALHO, A. P. M. et al. Specific antigen serologic tests in leprosy: implications for epidemiological surveillance of leprosy cases and household contacts. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 9, p. 609-616, Sep 2017.

CASSIRER-COSTA, F. et al. Cytokines as biomarkers to monitoring the impact of multidrug therapy in immune response of leprosy patients. **Cytokine**, v. 97, p. 42-48, Sep 2017.

CASTANO, D.; GARCIA, L. F.; ROJAS, M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 91, n. 5, p. 348-60, Sep 2011.

CHANTEAU, S. et al. Low Predictive Value of Pgl-I Serology for the Early Diagnosis of Leprosy in Family Contacts - Results of a 10-Year Prospective Field-Study in French-Polynesia. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 61, n. 4, p. 533-541, Dec 1993.

CHANTEAU, S. et al. The Detection of IgM Anti-PgI for the Serodiagnosis of Leprosy and for the Follow-up of Contact Population in Polynesia - a 5 Years Situation. **Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique**, v. 83, n. 5, p. 649-657, 1990a.

_____. The detection of IgM antibodies to phenolglycolipid I for serodiagnosis of Hansen's disease and monitoring the contact population in Polynesia. Five year evaluation. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 83, n. 5, p. 649-657, 1990b.

CONGRESS MADRID. CLASSIFICATION. Technical Resolutions, VIth International Congress Madrid, International Journal of Leprosy, 1953.

CONVIT, J. Studies of leprosy in the German Ethnic Group of Colonia Tovar, Venezuela. The morbidity rates in BCG-vaccinated and unvaccinated groups during five years. **International Journal of Leprosy**. Vol. 3: 269-275, 1956.

CREE, I. A. et al. Effects of treatment on the histopathology of leprosy. **J Clin Pathol**, v. 48, n. 4, p. 304-7, Apr 1995.

DAVEY, T. F.; REES, R. J. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. **Lepr Rev**, v. 45, n. 2, p. 121-34, Jun 1974.

DE ALMEIDA-NETO, F. B. et al. TH17 cells, interleukin-17 and interferon-gamma in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 29, n. 7, p. 1354-61, Jul 2015.

DE CARVALHO, F. M. et al. Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to Mycobacterium leprae specific antigens. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 5, p. e0005560, May 2017.

DOUGLAS, J. T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, p. 897-900, sep. 2004.

DUPAGE, M.; BLUESTONE, J. A. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 3, p. 149-63, Mar 2016.

DUPPRE, N. C. et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 7, p. 631-638, jul. 2008.

DUTHIE, M. S. et al. Rapid quantitative serological test for detection of infection with Mycobacterium leprae, the causative agent of leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 2, p. 613-9, Feb 2014.

DUTHIE, M. S. et al. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 10, p. 1590-7, Oct 2008.

DUTHIE, M. S. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 11, p. 1400-8, Nov 2007.

FABRI, A. C. O. C. Análise comparativa da reatividade anti-LID-1, NDO-LID, NDO-HSA e PGL-1 em hanseníase. 127 f. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

FABRI, A. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **Bmc Infectious Diseases**, v. 15, May 2015.

FAFUTIS-MORRIS, M. et al. **J Interferon Cytokine Res**, v. 19, n. 11, p. 1237-43, Nov 1999.

FINE, P. E. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. **Epidemiol Rev**, v. 4, p. 161-88, 1982.

FONSECA, A. B. et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infect Dis Poverty**, v. 6, n. 1, p. 5, Feb 06 2017.

FREITAS, A. A. et al. Alterations to antigen-specific immune responses before and after multidrug therapy of leprosy. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 83, n. 2, p. 154-61, Oct 2015.

FREITAS, Aline de Araújo. Resposta imune celular e humoral a proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* em pacientes com hanseníase após a multidrogaterapia e em pacientes com outras dermatoses. 2015. 163 f. Tese (Medicina Tropical e Saúde Pública) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GELUK, A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. **Expert Opin. Med. Diagn.** May; 7(3):265-74 2013.

GELUK, A., et al. New Biomarkers with Relevance to Leprosy Diagnosis Applicable in Areas Hyperendemic for Leprosy. **The Journal of Immunology**, 188:4782-4791, 2012.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 6, p. 392-404, Jun 2014.

GODAL, T.; NEGASSI, K. Subclinical Infection in Leprosy. **British Medical Journal**, v. 3, n. 5880, p. 557-559, 1973.

GONZALEZ-JUARRERO, M. et al. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, v. 69, n. 3, p. 1722-8, Mar 2001.

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

- GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 4, p. 365-75, Jul-Aug 2002.
- GRANGE, J. M. et al. What is BCG? **Tubercle**, v. 64, n. 2, p. 129-39, Jun 1983.
- HASTINGS, R. C. et al. Leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, n. 3, p. 330-48, Jul 1988.
- HAWN, T. R. et al. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 8, p. 2280-9, Aug 2007.
- JOHNSON C. M. *et al.* Cutting edge: a common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **The Journal of Immunology**, v.178, p.7520-7524, 2007.
- KAPLAN, G. et al. The cutaneous infiltrates of leprosy. A transmission electron microscopy study. **J Exp Med**, v. 158, n. 4, p. 1145-59, Oct 01 1983.
- KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 39, n. 3, p. 693-702, Jul-Sep 1971.
- KUMAR, B. V.; CONNORS, T. J.; FARBER, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. **Immunity**, v. 48, n. 2, p. 202-213, Feb 20 2018.
- LANZA FM, LANA FC. Decentralization of leprosy control actions in the micro-region of Almenara, State of Minas Gerais. **Revista Latino Americana de Enfermagem**. Vol. 19(1):187-94, 2011.
- LEANDRO, A. C. C. S. *et al.* Genetic polymorphisms in vitamin D receptor, vitamin D binding protein, Toll-like receptor 2, nitric oxide synthase 2, and interferon- γ genes and its association with susceptibility to tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.42, n.4, p.312-322, 2009.
- LEE, D. J. et al. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. **J Infect Dis**, v. 201, n. 4, p. 558-69, Feb 15 2010.
- LIEW, F. Y. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 1, p. 55-60, Jan 2002.
- LISTON, A.; CARR, E. J.; LINTERMAN, M. A. Shaping Variation in the Human Immune System. **Trends Immunol**, v. 37, n. 10, p. 637-646, Oct 2016.
- LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 389-401, Dec 2011.

- LUCKHEERAM, R. V. et al. CD4(+)T cells: differentiation and functions. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 925135, 2012.
- LWIN, K. et al. BCG vaccination of children against leprosy: fourteen-year findings of the trial in Burma. **Bull World Health Organ**, v. 63, n. 6, p. 1069-78, 1985.
- MADIGAN, C. A. et al. A Macrophage Response to Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. **Cell**, v. 170, n. 5, p. 973-985 e10, Aug 24 2017.
- Madrid Congress. Technical Resolutions. Classification of leprosy. *Internat. J. Leprosy*, **21**:504-516, 1953. Mem. VI Cong. Internat. Leprol., Madrid, 1953. Madrid, 1954, pp. 75-86.
- MARTINEZ AN, LAHIRI R, PITTMAN TL, SCOLLARD D, TRUMAN R, MORAES MO, WILLIAMS D. Molecular Determination of Mycobacterium leprae viability by use of real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, july, p. 2124-2130, 2009.
- MARTINS, M. V. 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.
- MENDONCA, V. A. et al. Analysis of chemokine receptors on the surface of circulating leukocytes of individuals infected with Mycobacterium leprae: preliminary results. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 95-8, 2008.
- MENDONCA, V. A. et al. Differentiation of patients with leprosy from non-infected individuals by the chemokine eotaxin/CCL11. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 3, p. 547-50, Sep 2007.
- MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.83, n.4, p.343-350, 2008.
- MENDONÇA, V. A., et al. Short Report: Differentiation of Patients with Leprosy from Non-Infected Individuals by the Chemokine Eotaxin/CCL11. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 77(3), pp. 547–550, 2007.
- MISCH, E. A. et al. Leprosy and the human genome. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 4, p. 589-620, Dec 2010.
- MODLIN, R. L. et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 4, p. 1213-7, Feb 1988.
- MODLIN, R. L. et al. Suppressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin lesions. **J Immunol**, v. 137, n. 9, p. 2831-4, Nov 01 1986.
- MOET, F. J. et al. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. **J Infect Dis**, v. 193, n. 3, p. 346-53, Feb 1 2006.

- MORAES, M. O. et al. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev**, v. 77, n. 3, p. 189-202, Sep 2006.
- MOUBASHER, A. D. et al. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. **Int J Dermatol**, v. 37, n. 10, p. 733-40, Oct 1998a.
- _____. Cytokines in leprosy, II. Effect of treatment on serum cytokines in leprosy. **Int J Dermatol**, v. 37, n. 10, p. 741-6, Oct 1998b.
- NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 90-8, Jan-Feb 2015.
- NG, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511-24, Oct 27 2000.
- OHKAWA, S. Activation of human monocytes in leprosy. **Microbiol Immunol**, v. 29, n. 3, p. 265-74, 1985.
- PALERMO MDE, L. et al. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 167-73, Dec 2012.
- PALERMO, M. L. et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 878-83, May 2012.
- PERUHYPE-MAGALHAES, V. et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clin Exp Immunol**, v. 146, n. 1, p. 124-32, Oct 2006.
- REES, R. J.; PEARSON, J. M.; WATERS, M. F. Experimental and clinical studies on rifampicin in treatment of leprosy. **Br Med J**, v. 1, n. 5688, p. 89-92, Jan 10 1970.
- RIDLEY, D.S., JOPLING, W.H. Classification of Leprosy According to Immunity: A Five-group System. **International Journal of Leprosy**. Vol. 34, n° 3, 1966.
- SADHU, S.; MITRA, D. K. Emerging Concepts of Adaptive Immunity in Leprosy. **Front Immunol**, v. 9, p. 604, 2018.
- SAINI, C. et al. T helper cells in leprosy: An update. **Immunol Lett**, v. 184, p. 61-66, Apr 2017.
- 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 Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2338, 2013.

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

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia – Hanseníase**. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas. p. 625-651, 2007.

SCHLIENGER, K. et al. B7-1, but not CD28, is crucial for the maintenance of the CD4+ T cell responses in human leprosy. **J Immunol**, v. 161, n. 5, p. 2407-13, Sep 01 1998.

SCHNEIDER, P. B.; FREITAS, B. [Leprosy trends in children under 15 years of age in Brazil, 2001-2016]. **Cad Saude Publica**, v. 34, n. 3, p. e00101817, Mar 12 2018.

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

SHEPARD, C. C. The Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli into Foot-Pads of Mice. **J Exp Med**, v. 112, n. 3, p. 445-54, Sep 1 1960.

SRIDHARAN, A. et al. Age-associated impaired plasmacytoid dendritic cell functions lead to decreased CD4 and CD8 T cell immunity. **Age (Dordr)**, v. 33, n. 3, p. 363-76, Sep 2011.

STANLEY, S. J. et al. BCG vaccination of children against leprosy in Uganda: final results. **J Hyg (Lond)**, v. 87, n. 2, p. 233-48, Oct 1981.

TRAO, V. T. et al. Changes in cellular response to mycobacterial antigens and cytokine production patterns in leprosy patients during multiple drug therapy. **Immunology**, v. 94, n. 2, p. 197-206, Jun 1998.

TSAO, T. C. et al. Shifts of T4/T8 T lymphocytes from BAL fluid and peripheral blood by clinical grade in patients with pulmonary tuberculosis. **Chest**, v. 122, n. 4, p. 1285-91, Oct 2002.

VAN BEERS, S. M.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. The epidemiology of Mycobacterium leprae: recent insight. **FEMS Microbiol Lett**, v. 136, n. 3, p. 221-30, Mar 1 1996.

VAN BEERS, S. M.; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases**, Bloomfield, v. 54, p. 480-490, jun. 1999.

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

VAN VOORHIS, W. C. et al. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. **N Engl J Med**, v. 307, n. 26, p. 1593-7, Dec 23 1982.

VU, T. T. et al. Long-term evaluation of immune status in leprosy patients undergoing multiple drug therapy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 62, n. 3, p. 365-73, Sep 1994.

WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 675, p. 1-33, 1982.

WHO, Global leprosy update, 2017: accelerating reduction of disease burden. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 93, n. 35, p. 445-456, Aug 30 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/WHO. **Weekly epidemiological** record, v. 86, n. 6, p. 389-400, sep. 2011.

WU, Q. X. et al. Determination of antibodies in dried blood from earlobes of leprosy patients by enzyme-linked immunosorbent assay--a preliminary report. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 53, n. 4, p. 565-70, Dec 1985.

WU, Q. X. [A preliminary study on the serological activity of deacetylated phenolic glycolipid from *M. leprae*]. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v. 9, n. 2, p. 108-12, Apr 1987.

WU, Q. X.; YE, G. Y.; LI, X. Y. Serological activity of natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in sera from patients with leprosy, tuberculosis, and normal controls. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 56, n. 1, p. 50-5, Mar 1988.

YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277-9, Oct 11 1991.

YOUNG, D. B.; BUCHANAN, T. M. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. **Science**, v. 221, n. 4615, p. 1057-9, Sep 9 1983.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Formulário para coleta de dados clínicos e epidemiológicos do caso-índice

Colar etiqueta com o
número do domicílio

Colar etiqueta com o
número do caso índice

Nº Notificação

FORMULÁRIO DE CASO ÍNDICE				
IDENTIFICAÇÃO				
Data da entrevista: __/__/__		Entrevistador:		Município:
Unidade de saúde/PSF:				
Nome completo:			Apelido:	
Endereço atual (logradouro, número e bairro):				
CEP:	Latitude:		Longitude:	
Setor Censitário:	Fone: ()		Celular: ()	
E-mail:				
Idade:	Data de nascimento: ____/____/____		Sexo: ☐ M ☐ F	Peso:
Cor da pele:	Escolaridade:	Naturalidade:		Estado:
DADOS DO DOMICÍLIO				
Número de pessoas que residem neste endereço:			Número de cômodos do domicílio:	
Número de dormitórios:		Número de pessoas que compartilham o dormitório com o caso índice:		
Alguém que residia com o Sr.(a) até 05 anos antes de você ter hanseníase se mudou? ☐ Não ☐ Sim. Quantas pessoas? _____ Contatos (caso resida no mesmo município): Nome: _____ Endereço: _____ Telefone: _____ Nome: _____ Endereço: _____ Telefone: _____ Nome: _____ Endereço: _____ Telefone: _____ Nome: _____ Endereço: _____ Telefone: _____ Nome: _____ Endereço: _____ Telefone: _____				
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS				
Mais algum morador tem/teve hanseníase? ☐ Não ☐ Sim. Quantos? _____				
Além da hanseníase, o(a) Sr.(a) tem/teve outra(s) doença(s)? ☐ Não				

☐ Sim. Especificar: ☐ DM. Há quanto tempo? _____ ☐ HAS. Há quanto tempo? _____ ☐ Dislipidemia (colesterol e/ou triglicérides alto). Há quanto tempo? _____ ☐ Tuberculose. Há quanto tempo? _____ ☐ Doenças Reumatóides (artrite, osteoartrite, artrose, gota). Há quanto tempo? _____	
☐ Faleceu ☐ Recusa ☐ Não localizado ☐ Mudo de município	
☐ Lúpus. Há quanto tempo? _____ ☐ HIV. Há quanto tempo? _____ ☐ Esquistossomose. Há quanto tempo? _____ ☐ Leishmaniose visceral. Há quanto tempo? _____ ☐ Ascaridíase. Há quanto tempo? _____ ☐ Outras helmintoses. Há quanto tempo? _____ ☐ Outras. Especificar: _____ Há quanto tempo? _____	
A Sra. Está grávida? ☐ Não ☐ Sim ☐ Não se aplica Quanto tempo de gestação: _____ Ou com suspeita de gravidez? ☐ Não ☐ Sim	
Faz uso de algum medicamento regularmente? (Perguntar sobre medicamentos listados) ☐ Não ☐ Sim. Especificar: 1. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 2. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 3. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 4. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 5. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 6. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 7. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 8. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____	
Cicatriz vacinal de BCG: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2	Data do diagnóstico: ____/____/____
Data início tratamento: ____/____/____	Esquema terapêutico: ☐ PB/6 ☐ MB/12 ☐ MB/24 ☐ ROM ☐ Outros esquemas alternativos ☐ Ignorado
Data da alta: ____/____/____	Tipo de alta: ☐ Cura ☐ Abandono ☐ Transferência ☐ Não se aplica
INFORMAÇÕES CLÍNICAS	
Presença de lesões na pele: ☐ Não ☐ Sim. Quantas? _____	
Presença de nervos acometidos: ☐ Não ☐ Sim. Quantos? _____	
Classificação operacional: ☐ Paucibacilar ☐ Multibacilar	
Forma clínica (Madri): ☐ I ☐ T ☐ D ☐ V ☐ Ignorada	
Grau de incapacidade física – diagnóstico: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ Ignorado	Grau de incapacidade física – alta: ☐ 0 ☐ 1 ☐ 2 ☐ Ignorado ☐ Não se aplica
Localização da(s) incapacidade(s): Olhos: ☐ D ☐ E Mãos: ☐ D ☐ E Pés: ☐ D ☐ E	

Baciloscopia:		☐ Não realizada ☐ Ignorada ☐ Realizada.	
Resultado:		IB: ☐ 0 ☐ 1+ ☐ 2+ ☐ 3+ ☐ 4+ ☐ 5+ ☐ 6+	
História	de	☐ Não	☐ Ignorada ☐ Sim.
reação:	Qual?	☐ Tipo 1 –RR ☐ Tipo 2 – ENH ☐ Não especificada	
Coleta de Material Biológico: ☐ Sangue ___ Tubos - ☐ Genético ☐ Sorológico ☐ Celular -			
☐ Recusa			
SWAB ☐ Nasal ☐ Oral - ☐ Recusa			

Elaborado pelo Núcleo de Pesquisas em Hanseníase (NEPHANS).

APÊNDICE B – Formulário para coleta de dados dos contatos do caso-índice			
FORMULÁRIO DE CONTATO DOMICILIAR			
IDENTIFICAÇÃO			
Data da entrevista ____/____/____	Entrevistador:	Município:	
Unidade de saúde/PSF:			
Nome completo:		Apelido:	
Endereço atual (logradouro, número e bairro):			
CEP:	Latitude:	Longitude:	
Setor Censitário:	Fone: ()	Celular: ()	
E-mail:			
Há quanto tempo reside neste endereço?			
Endereço anterior (rua, número e bairro):			
Município:		Estado:	
Quanto tempo morou no endereço anterior?		☐ Não se aplica	
Idade:	Data de nascimento: ____/____/____	Sexo: ☐ M ☐ F	Peso:
Escolaridade:	Naturalidade:	Estado:	
DADOS DO DOMICÍLIO			
Número de pessoas que residem neste endereço:		Número de cômodos do domicílio:	
Número de dormitórios:	Número de pessoas que compartilham o dormitório com o caso índice:		
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS			
O (A) Sr.(a) já teve hanseníase? ☐ Não ☐ Sim		Quando (ano): _____	
O (A) Sr.(a) tem/teve outra(s) doença(s)?		☐ Não	
☐ Sim. Especificar: ☐ DM. Há quanto tempo? _____ ☐ HAS. Há quanto tempo? _____ ☐ Dislipidemia (colesterol e/ou triglicérides alto). Há quanto tempo? _____ ☐ Doenças reumatóides (artrite, osteoartrite, artrose, gota). Há quanto tempo? _____ ☐ Lúpus. Há quanto tempo? _____ ☐ HIV. Há quanto tempo? _____ ☐ Esquistossomose. Há quanto tempo? _____ ☐ Leishmaniose visceral. Há quanto tempo? _____ ☐ Ascaridíase. Há quanto tempo? _____ ☐ Outras helmintoses. Há quanto tempo? _____ ☐ Outras. Especificar: _____ Há quanto tempo? _____			
A Sra. Está grávida? ☐ Não ☐ Sim ☐ Não se aplica Quanto tempo de gestação: _____			
Ou com suspeita de gravidez? ☐ Não ☐ Sim			
Faz uso de algum medicamento regularmente? (Perguntar sobre medicamentos listados)			

Elaborado pelo Núcleo de Pesquisas em Hanseníase (NEPHANS).

APÊNDICE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*” por morar em uma região que tem muitos casos de hanseníase.

A hanseníase é uma doença, causada por uma bactéria, que causa lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem deixar sequelas. Essa doença é transmitida pelo contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa, por meio da respiração. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio frequente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso aceite participar do estudo, será solicitado que você responda a um questionário aplicado por pesquisadores treinados da Escola de Enfermagem da UFMG, com perguntas relacionadas a você e à doença.

Em seguida, será realizado um exame da sua pele e dos nervos para identificar possíveis sinais ou sintomas sugestivos de hanseníase.

Por fim, serão coletados 12 mililitros de sangue em 03 tubos a vácuo, por uma punção venosa no braço, utilizando material estéril e descartável para evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos destes procedimentos são mínimos e podem estar associados à coleta do material (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido). Com os resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.

Os materiais e os dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores apenas para os objetivos da pesquisa. Uma das preocupações está na garantia de que o nome dos participantes não seja revelado e, para tanto, todo o material coletado será identificado por etiquetas contendo apenas siglas e números, estabelecendo proteção ao sigilo das informações.

A participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar a autorização. A recusa não trará nenhum prejuízo à sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Este estudo não trará nenhum custo para você e todos os procedimentos serão realizados gratuitamente. Não haverá pagamento pela participação nesta pesquisa.

Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética da UFMG, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

Você assinará este Termo declarando que entendeu os objetivos, riscos e benefícios de sua participação na pesquisa, concordando em participar.

Nome do Participante: _____

Assinatura do participante: _____

Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana

Coordenador da Pesquisa

Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia

Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG

CEP: 30130-100

Tel: (31) 3409-9862

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
(COEP/UFMG)

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 -
Unidade Administrativa II - Sala 2005 -

APÊNDICE D

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(13 a 17 anos – cópia responsável)

____ está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*” por morar em uma região que tem muitos casos de hanseníase.

A hanseníase é uma doença, causada por uma bactéria, que causa lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem deixar sequelas. Essa doença é transmitida pelo contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa, por meio da respiração. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio frequente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso concorde com a participação do estudo, será aplicado um questionário por pesquisadores treinados da Escola de Enfermagem da UFMG, com perguntas relacionadas a participante e à doença.

Em seguida, será realizado um exame da pele e dos nervos para identificar possíveis sinais ou sintomas sugestivos de hanseníase.

Por fim, serão coletados 12 mililitros de sangue em 03 tubos a vácuo, por uma punção venosa no braço, utilizando material estéril e descartável para evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos destes procedimentos são mínimos e podem estar associados à coleta do material (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido). Com os resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.

Os materiais e os dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores apenas para os objetivos da pesquisa. Uma das preocupações está na garantia de que o nome dos participantes não seja revelado e, para tanto, todo o material coletado será identificado por etiquetas contendo apenas siglas e números, estabelecendo proteção ao sigilo das informações.

A participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir e retirar a autorização. A recusa não trará nenhum prejuízo à sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Este estudo não trará nenhum custo para você e todos os procedimentos serão realizados gratuitamente. Não haverá pagamento pela participação nesta pesquisa.

Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética da UFMG, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

Você assinará este Termo declarando que entendeu os objetivos, riscos e benefícios da participação na pesquisa e que autoriza, como responsável, a participação de

Nome do responsável: _____

Assinatura do responsável: _____



Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana

Coordenador da Pesquisa

Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia

Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG

CEP: 30130-100

Tel: (31) 3409-9862

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
(COEP/UFMG)

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade
Administrativa II - Sala 2005 - Belo Horizonte -
MG

APÊNDICE E

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(13 a 17 anos)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*” por morar em uma região que tem muitos casos de hanseníase.

A hanseníase é uma doença, causada por uma bactéria, que causa lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem deixar sequelas. Essa doença é transmitida através do contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa, por meio da respiração. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio frequente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso aceite participar do estudo, será solicitado que você responda a um questionário aplicado por pesquisadores treinados da Escola de Enfermagem da UFMG, com perguntas relacionadas a você e à doença.

Em seguida, será realizado um exame da sua pele e dos nervos para identificar possíveis sinais ou sintomas sugestivos de hanseníase.

Por fim, serão coletados 12 mililitros de sangue em 03 tubos a vácuo, por uma punção venosa no braço, utilizando material estéril e descartável para evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos destes procedimentos são mínimos e podem estar associados à coleta do material (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido). Com os resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.

Os materiais e os dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores apenas para os objetivos da pesquisa. Uma das preocupações está na garantia de que o nome dos participantes não seja revelado e, para tanto, todo o material coletado será identificado por etiquetas contendo apenas siglas e números, estabelecendo proteção ao sigilo das informações.

A participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar a autorização. A recusa não trará nenhum prejuízo à sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Este estudo não trará nenhum custo para você e todos os procedimentos serão realizados gratuitamente. Não haverá pagamento pela participação nesta pesquisa.

Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética da UFMG, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

Você assinará este Termo declarando que entendeu os objetivos, riscos e benefícios de sua participação na pesquisa, concordando em participar.

Nome do Participante: _____

Assinatura do participante: _____

Nome do responsável: _____

Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana

Coordenador da Pesquisa

Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia

Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG

CEP: 30130-100

Tel: (31) 3409-9862

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
(COEP/UFMG)

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade

Administrativa II - Sala 2005 - Belo Horizonte -

MG

APÊNDICE F

Roteiro para realização de exame dermatoneurológico

1 - Avaliar e registrar queixas relacionadas à hanseníase, identificando alterações na pele - manchas, placas, infiltrações, tubérculos, nódulos, e há quanto tempo eles apareceram; possíveis alterações de sensibilidade em alguma área do seu corpo; presença de dores nos nervos, ou fraqueza nas mãos e nos pés e se usou algum medicamento para tais problemas e qual o resultado.

2 - Avaliação Dermatológica

- Observar a superfície corporal, no sentido crânio-caudal, seguimento por seguimento, procurando identificar as áreas acometidas por lesões de pele. As áreas onde as lesões ocorrem com maior frequência são: face, orelhas, nádegas, braços, pernas e costas.

- Realizar avaliação de sensibilidade tátil nas lesões identificadas, utilizando os estesiômetros conforme descrito no item 4.1.

- Registrar em formulário de encaminhamento (anexo no final do roteiro) a descrição das lesões e as alterações de sensibilidade encontradas.

3 – Avaliação Neurológica

3.1 Inspeção

- Inspecionar os olhos, verificando a existência de nódulos, infiltrações, secreção, vermelhidão (hiperemia), ausência de sobrancelhas (madarose), cílios invertidos (triquíase), eversão (ectrópio) e desabamento da pálpebra inferior (lagofalmo), ou opacidade da córnea. Registrar no formulário as alterações identificadas.

- Inspecionar o nariz, verificando as condições da pele, da mucosa e do septo nasal, bem como se há desabamento do nariz ou outros sinais característicos da doença. A mucosa deve ser examinada, verificando se há alteração na cor, na umidade, e se há crostas, atrofia, infiltração ou úlceras. Registrar no formulário as alterações identificadas.

- Inspecionar os membros superiores, verificando a existência de ressecamento, calosidades, fissuras, ferimentos, cicatrizes, atrofia muscular e reabsorções ósseas (perda de uma ou mais falanges dos dedos, ou parte de uma delas). Registrar no formulário as alterações identificadas.

- Inspecionar os membros inferiores, verificando a existência de ressecamento, calosidades, fissuras, ferimentos, úlceras, cicatrizes, reabsorções ósseas, atrofia muscular, ou outros sintomas. Registrar no formulário as alterações identificadas.

3.2 – Palpação de nervos

- Os nervos devem ser palpados, nos dois membros, com as polpas digitais do segundo e terceiro dedos, deslizando-os sobre a superfície óssea, acompanhando o trajeto do nervo, no sentido de cima para baixo.

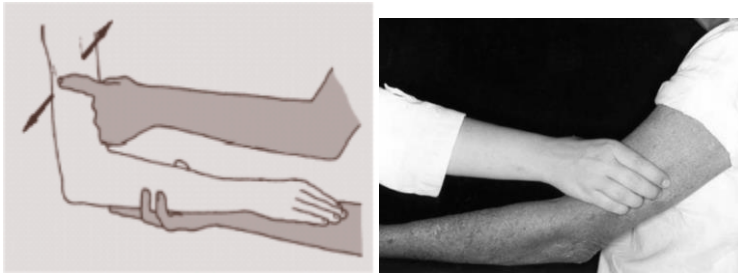
Deve-se verificar em cada nervo palpado:

- se há queixa de dor espontânea no trajeto do nervo;
- se há queixa de choque ou de dor nos nervos durante a palpação;
- se há espessamento do nervo palpado com o nervo correspondente, no lado oposto;
- se há alteração na consistência do nervo: se há endurecimento, amolecimento;
- se há alteração na forma do nervo: se existem abscessos e nódulos;
- se o nervo apresenta aderências

Registrar no formulário as alterações identificadas.

- Realizar palpação dos nervos nos membros superiores:

* *Nervo radial* - realizar palpação ao nível do canal de torção do úmero, no terço médio do braço com o cotovelo em flexão e a mão do paciente apoiada na do examinador.



* *Nervo ulnar* – realizar a palpação ao nível do cotovelo na goteira epitrocleana (entre os dois ossinhos) ou acima dela, com o cotovelo fletido (dobrado) e a mão do paciente apoiada no braço do avaliador.



* *Nervo mediano* – realizar a palpação entre os tendões dos músculos palmar longo e flexor radial do carpo com o punho em ligeira flexão, apoiado pelo examinador. Normalmente este nervo não é palpável. Neste caso pode-se fazer percussão com as polpas dos dedos na face anterior do antebraço, ao longo do trajeto do nervo mediano.

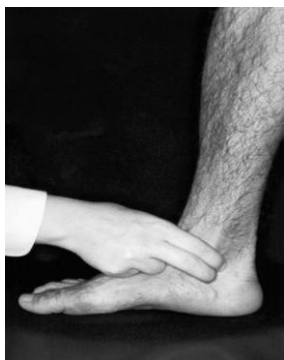


- Realizar palpação dos nervos nos membros inferiores:

* *Nervo fibular* – realizar a palpação com o paciente sentado com os pés apoiados no chão e as pernas estendidas em ângulo ligeiramente superior a 90°; palpar o nervo na face posterior da fíbula na junção entre sua cabeça e o corpo.



* *Nervo tibular posterior* – realizar a palpação com o paciente sentado com os pés apoiados no chão e as pernas estendidas em ângulo ligeiramente superior a 90°; fazer inversão e flexão plantar, passivamente; palpar o nervo atrás e logo abaixo do maléolo medial.



3.3 – Avaliação de força muscular

- Realizar avaliação da força muscular nos **membros superiores**, registrar alterações encontradas no formulário segundo escala de graduação de força abaixo:

GRAU DE FORÇA MUSCULAR	OBSERVAÇÃO CLÍNICA	CONDIÇÃO FUNCIONAL
5	Amplitude de movimento completo contra a gravidade e resistência máxima	Normal
4	Amplitude de movimento completa contra a gravidade e resistência manual moderada	Paresia
3	Amplitude de movimento completa contra gravidade	Paresia
2	Amplitude de movimento incompleta	Paresia
1	Evidência de contração muscular, sem movimento articular	Paresia
0	Sem evidência de contração muscular	Paralisia

* *Músculo abdutor do quinto dedo* – Solicitar que o examinado vire a palma da mão para baixo, fazendo força para manter os dedos abertos, aplicar força em sentido contrário, de fora para dentro, na altura da falange proximal.



* *Abdução do polegar*: com o dorso da mão do paciente apoiada sobre a mão do avaliador, solicitar ao paciente que levante o polegar mantendo-o elevado na direção do 3º dedo; o avaliador aplica resistência na falange do proximal do polegar, no sentido para frente e para baixo, sendo que a resistência só deve ser aplicada quando o paciente realiza o movimento solicitado de forma completa.



* *Extensores do punho:* apoiar o antebraço, do paciente, deixando o punho relaxado, estender o punho, deixando os dedos relaxados, enquanto a força contrária, para baixo, é aplicada no dorso da mão.



- Realizar avaliação da força muscular nos **membros inferiores**, registrar alterações encontradas no formulário segundo escala de graduação de força – anexo e avaliar pernas e pés na suas faces dorsal e plantar.

* *Músculo tibial anterior:* com o paciente sentado com os pés apoiados no chão e o joelho em ligeira flexão ou extensão, o examinador estabiliza a perna da pessoa, segurando acima da articulação do tornozelo, solicitar o paciente para dorsiflexionar o pé com força máxima e aplicar força contrária no dorso do pé.



* *Músculo Extensor do Halux:* colocar o paciente sentado com os pés apoiados no chão e o joelho em extensão, o examinador estabiliza o pé e o tornozelo em posição neutra e solicita ao paciente que faça extensão máxima do halux, aplicando força contrária no dorso da falange proximal deste dedo.



* *Músculo Extensor Longo dos dedos:* com o paciente sentado com os pés apoiados no chão e o joelho em extensão, o examinador estabiliza o pé e o tornozelo em posição neutra e solicita ao paciente para fazer flexão máxima dos dedos. O examinador aplica força contrária no dorso das falanges proximais do segundo e quinto dedos.



* *Músculo Fibulares longos e curtos*: com o paciente sentado co os pés apoiados no chão e os' joelhos estendidos com o extensor longo dos dedos relaxados, o examinador estabiliza a articulação do tornozelo em posição neutra e solicita ao paciente para everter o pé aplicando força contrária na borda lateral do quinto matatarsiano, no sentido de empurrá-lo para dentro.



4 - Pesquisa da Sensibilidade

A presença da sensibilidade cutânea normal depende da integridade do sistema nervoso central e periféricos (truncos nervosos e finas terminações nervosas na pele). Para realização da pesquisa de sensibilidade são necessários alguns cuidados:

- explicar ao paciente o exame a ser realizado;
- manter a concentração do examinador e do paciente;
- ocluir campo de visão do paciente;
- selecionar aleatoriamente a seqüência de pontos a serem testados. Tocar a pele deixando tempo suficiente (contar de um a dois) para os pacientes responder, repetir o teste para confirmar resultados em cada ponto, se necessário.
- realizar o teste em área próxima, dentro do mesmo território específico, quando na presença de calosidades, cicatrizes ou úlceras;

4.1 - Técnica de avaliação da sensibilidade com estesiômetro.

Antes de iniciar o teste, retire os monofilamentos do tubo e encaixe-os cuidadosamente no furo lateral do cabo, dispondo-os em ordem crescente, do mais fino para o mais grosso.

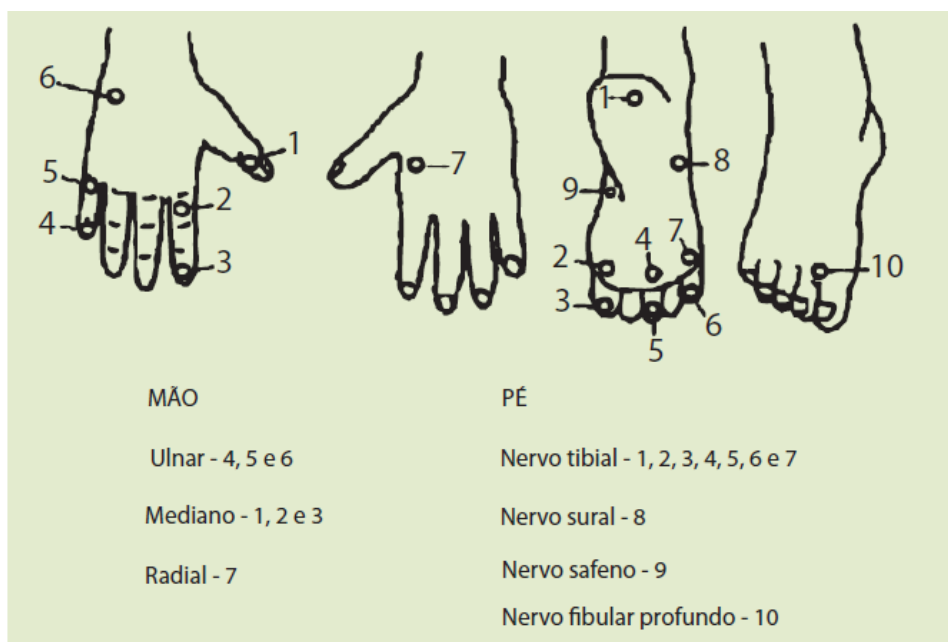
Segurar o cabo do instrumento de modo que o filamento de nylon fique perpendicular à superfície da pele, a uma distância de 2 cm. A pressão deve ser feita por 1 a 2 segundos, até obter a curva do filamento, sem permitir que este deslize sobre a pele.

Realização do teste de sensibilidade com estesiômetro:

- o teste deve ser iniciado com o monofilamento mais fino 0,05g (verde). Na ausência de resposta, utilizar o monofilamento 0,2g (azul) e assim sucessivamente.
- aplicar os monofilamentos de 0,05g (verde) e 0,2 (azul) em cada ponto específico por três vezes, e para os demais filamentos aplicar apenas uma vez.
- repetir o teste em caso de dúvida;
- aplicar o teste nos pontos específicos dos nervos;

- registrar o teste, colorindo os pontos específicos com a cor correspondente ao primeiro monofilamento que o paciente sente.

Pontos que devem ser testados:



Legenda dos monofilamentos:

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

Elaborado pelo Núcleo de Pesquisas em Hanseníase (NEPHANS).

APÊNDICE G

FORMULÁRIO DE ENCAMINHAMENTO DE CASO SUSPEITO DE HANSENÍASE

FORMULÁRIO DE ENCAMINHAMENTO DE CASO SUSPEITO DE HANSENÍASE

Dados do usuário

Nome: _____

Endereço completo: _____

Dados Clínicos

Queixa:

Avaliação dermatoneurológica (alterações):

Palpação de nervos (alterações):

Avaliação de força muscular (alterações):

Avaliação de sensibilidade



DIREITA



ESQUERDA



DIREITO



ESQUERDO

Data: ____/____/____

Nome de quem realizou a avaliação: _____

APÊNDICE H

COLETA DE SANGUE

I - Materiais necessários

- 02 tubos tipo I para coleta de sangue (Vacutainer/Vacurette, com gel separador para obtenção de soro - tampa amarela, 13x75 mm, volume 4 ml);
- 01 tubo tipo II para coleta de sangue (Vacutainer/Vacurette, com EDTA, RNase free - tampa roxa, 13x100 mm, volume 4 ml);
- Adaptador para coleta de sangue a vácuo de uso único;
- Agulha para coleta de sangue a vácuo com dispositivo de segurança, 25x8;
- Escalpe n.º 19 G (para coleta em idosos);
- Escalpe n.º 21 G (para coleta em crianças);
- Algodão seco;
- Algodão embebido em álcool 70%;
- Garrote;
- Embalagem do tipo Descartak para descarte dos materiais pérfuro-cortantes;
- Saco de lixo branco, identificado como material biológico;
- Avental de manga comprida e punho fechado;
- Luvas descartáveis;
- Curativo do tipo *blood stop*;
- Etiqueta adesiva para identificação dos frascos;
- Caixa de isopor para armazenar tubos.

II – Procedimento

- 1) Colocar o participante assentado confortavelmente numa cadeira com o braço apoiado em suporte apropriado.
- 2) Separar os materiais necessários (04 tubos para coleta de sangue a vácuo, identificados previamente com a etiqueta própria). Separar também o garrote, o algodão seco, o algodão embebido em álcool, o adaptador, a agulha, o *blood stop* e o Descartak.
- 3) Escolher o local onde será feita a punção venosa.
- 4) Encaixar a agulha para coleta de sangue a vácuo no adaptador.
- 5) Colocar o garrote no braço paciente.
- 6) Fazer antisepsia com álcool 70%.
- 7) Puncionar a veia do paciente em ângulo de 45° e com bisele para cima.
- 8) Encaixar o primeiro tubo de coleta de sangue (tubo tipo I – tampa amarela) no adaptador, observar o início do fluxo do sangue para o seu interior, aguardar o preenchimento do tubo (4 ml de sangue) e retirar o tubo com cuidado segurando o adaptador para que a agulha não se movimente homogeneizar por 10 segundos, acondicionar na caixa de isopor.
- 9) Encaixar o segundo tubo de coleta de sangue (tubo tipo I – tampa amarela) no adaptador, observar o início do fluxo do sangue para o seu interior, aguardar o preenchimento do tubo (4 ml de sangue) e retirar o tubo com cuidado segurando o adaptador para que a agulha não se movimente homogeneizar por 10 segundos, acondicionar na caixa de isopor.
- 10) Encaixar o terceiro tubo de coleta de sangue (tubo tipo II – tampa roxa) no adaptador, observar o início do fluxo do sangue para o seu interior, **remover o garrote**, aguardar o preenchimento do tubo (4 ml de sangue) e retirar o tubo com cuidado segurando o adaptador para que a agulha não se movimente homogeneizar por 10 segundos, acondicionar na caixa de isopor.
- 11) Retirar a agulha do paciente.
- 12) Comprimir o local da punção venosa com algodão seco.
- 13) Colocar o curativo *blood stop* no local da punção.
- 14) Desconectar a agulha do adaptador utilizando o dispositivo próprio presente no Descartak.

- 15) Descartar a agulha no Descartak.
- 16) Descartar o restante do material utilizado em saco de lixo branco, identificado como material biológico.
- 17) Auxiliar o paciente a levantar-se, se necessário.

III - Precauções

- Usar SEMPRE os equipamentos de proteção individual durante a coleta.
- Checar se os dados impressos na etiqueta de identificação conferem com o participante e com a identificação do questionário.

Elaborado pelo Núcleo de Pesquisas em Hanseníase (NEPHANS).

APÊNDICE I

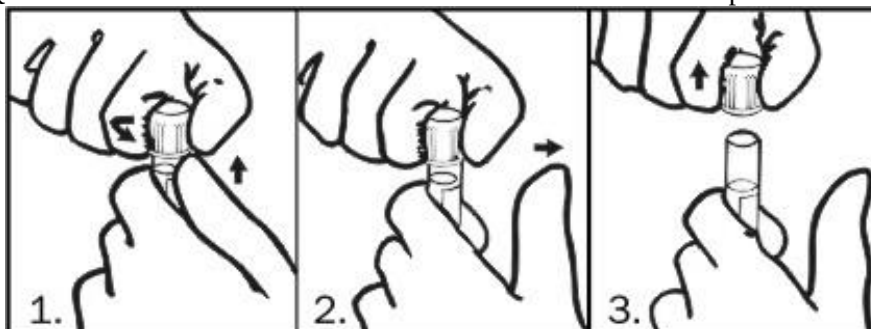
PROTOCOLO DE CONGELAMENTO PARA MARCADORES CELULARES - PREPARO DA AMOSTRA

I - Materiais necessários

- 01 tubo tipo III, tampa verde, com amostra de sangue, por participante
- Tubos Falcon de 15mL, 07 por participante
- Tubos tipo Eppendorf de 2,0mL, $\pm$ 24 por participante
- Suporte para tubos de sangue
- Estante para tubo Falcon
- Estante para tubo tipo Eppendorf
- Caixa para armazenar tubos tipo Eppendorf
- Gaze estéril
- Vórtex
- Centrífuga
- Provetas (capacidade de 100mL e 1 litro)
- Pipetas Pasteur
- Pipeta Monocanal com capacidade para 1.000 μ l
- Ponteiras descartáveis estéreis com filtro, com capacidade para 1.000 μ l
- Balde para descarte de material biológico com hipoclorito 1x.
- Saco de lixo branco, identificado como material biológico
- Avental de manga comprida e punho fechado
- Luvas descartáveis
- Máscaras descartáveis
- Caneta Sharpie® ponta fina
- Soluções (Solução de Lise 1x, PBS 1x, Solução de Congelamento -1% de albumina e 10% de DMSO, com pH entre 7,2 e 7,4)

II – Procedimento

- 1) Separar os materiais necessários, vestir jaleco, calçar as luvas e colocar máscara.
- 2) Identificar 07 tubos Falcon (código do participante – mesmo código da etiqueta do tudo de sangue) e 24 tubos tipo Eppendorf 2,0mL (código do participante – mesmo código da etiqueta do tudo de sangue, tipo de material: célula e data de congelamento) com caneta Sharpie®. OBS: colocar a identificação dos participantes no topo do tubo e as demais informações na lateral do tubo.
- 3) Homogeneizar o tubo de sangue e abrir e com cuidado, utilizando gaze estéril para segurar a tampa. Segurar o tubo com uma mão e colocar o polegar sob a tampa - para obter maior estabilidade, apoiar o braço em uma superfície firme. Com a outra mão, girar a tampa, ao mesmo tempo em que a empurra para cima com o polegar da outra mão SOMENTE ATÉ QUE A ROLHA DE BORRACHA SE SOLTE. Levantar a tampa do tubo.



- 4) Distribuir **1mL** de sangue em cada **tubo Falcon**, sendo **07 tubos por participante**. OBS: Homogeneizar o sangue com a pipeta antes de fazer as alíquotas e ter **CUIDADO** para não encostar a ponteira nas paredes do tubo. O sangue deve ser depositado no fundo do tubo.
- 5) Adicionar **10 mL** da **Solução de Lise 1x** em cada tubo Falcon. OBS: utilizar a pipeta Pasteur para pipetar as soluções.
- 6) Homogeneizar no vórtex (aproximadamente 1 minuto). OBS: tampar o tubo Falcon antes de colocar no vórtex.
- 7) Incubar em **temperatura ambiente** por 15 minutos.
- 8) Centrifugar, 1300 rpm por 7 minutos, temperatura ambiente.
- 9) Verter o tubo (virar de uma vez o conteúdo) em um balde com hipoclorito 1x.
- 10) Acrescentar **10mL de PBS1x** em cada tubo Falcon. OBS: utilizar a pipeta Pasteur para pipetar as soluções.
- 11) Homogeneizar no vórtex (aproximadamente 1 minuto). OBS: tampar o tubo Falcon antes de colocar no vórtex.
- 12) Centrifugar, 1300 rpm, por 7 minutos, temperatura ambiente.
- 13) Verter o tubo (virar de uma vez o conteúdo) em um balde com hipoclorito 1x.
- 14) Acrescentar **5mL** da **Solução de Congelamento** em cada tubo Falcon. OBS: utilizar a pipeta Pasteur para pipetar as soluções.
- 15) Homogeneizar no vórtex (aproximadamente 1 minuto).
- 16) Fazer alíquotas de **1,5mL** e armazenar nos tubos tipo Eppendorf (total de 24 alíquotas por amostra de sangue). OBS: Tampar o tubo Falcon e homogeneizar no vórtex entre as alíquotas, aproximadamente 15 segundos.
- 17) Descartar o tubo de sangue e os demais materiais utilizados em saco de lixo branco, identificado como material biológico.
- 18) Acondicionar os frascos na caixa para tubos tipo Eppendorf e conservar as amostras na posição vertical à -20°C .

Elaborado pelo Núcleo de Pesquisas em Hanseníase (NEPHANS).

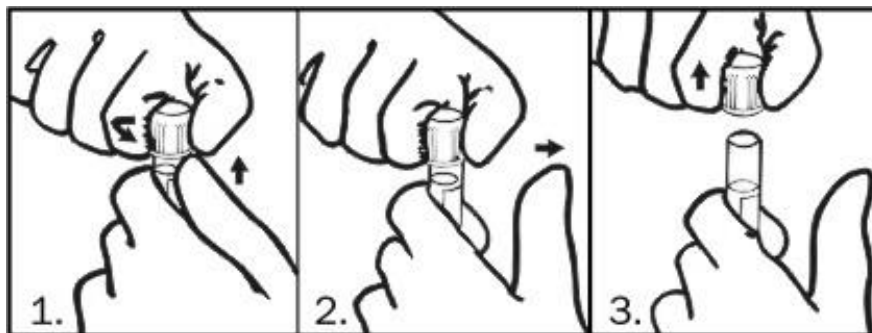
PROTOCOLO PARA PREPARO DE SORO PARA ANÁLISE DE MARCADORES SOROLÓGICOS

I - Materiais necessários

- 02 tubos tipo I, tampa amarela, com amostra de sangue, por participante
- Tubos tipo Eppendorf de 0,5mL (14 por participante)
- Suporte para tubos de sangue
- Estante para tubo tipo Eppendorf
- Caixa para armazenar tubos tipo Eppendorf
- Gaze estéril
- Centrífuga
- Pipeta Monocanal com capacidade para 1.000 µl
- Ponteiras descartáveis estéreis com filtro, com capacidade para 1.000 µl
- Balde para descarte de material biológico com hipoclorito 1x.
- Saco de lixo branco, identificado como material biológico
- Avental de manga comprida e punho fechado
- Luvas descartáveis
- Máscaras descartáveis
- Caneta Sharpie® ponta fina

II – Procedimento

- 1) Separar os materiais necessários, vestir jaleco, calçar as luvas e colocar máscara.
- 2) Identificar 07 tubos tipo Eppendorf 0,5mL (código do participante – mesmo código da etiqueta do tudo de sangue, tipo de material: soro e data de congelamento) com caneta Sharpie®. OBS: colocar a identificação dos participantes no topo do tubo e as demais informações na lateral do tubo.
- 3) Centrifugar o tudo de sangue a 3.000 rpm por 10 minutos. Confirmar se houve a separação do soro.
- 4) Abrir o tubo de sangue com cuidado, utilizando gaze estéril para segurar a tampa. Segurar o tubo com uma mão e colocar o polegar sob a tampa - para obter maior estabilidade, apoiar o braço em uma superfície firme. Com a outra mão, girar a tampa, ao mesmo tempo em que a empurra para cima com o polegar da outra mão SOMENTE ATÉ QUE A ROLHA DE BORRACHA SE SOLTE. Levantar a tampa do tubo.



- 5) Fazer 14 alíquotas de 500µL nos tubos tipo Eppendorf de 0,5mL sem reagente.
- 6) Acondicionar os frascos na caixa para tubos tipo Eppendorf e conservar as amostras na posição vertical à -20°C

- 7) Descartar o tubo de sangue e os demais materiais utilizados em saco de lixo branco, identificado como material biológico.

APÊNDICE L (Kit Manual de instruções da BD)

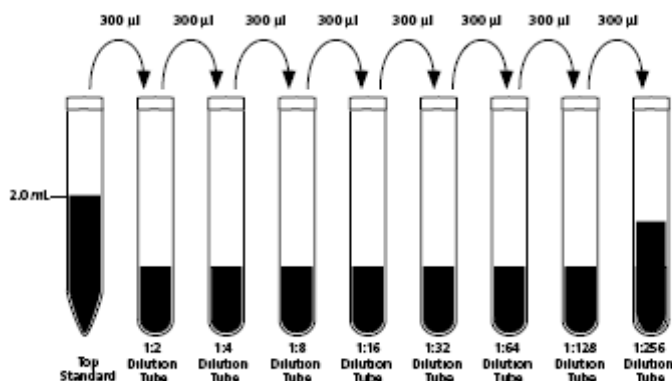
Protocolo do Ensaio com Microesferas Fluorescentes utilizando Citometria de Fluxo - CBA (Cytometric Bead Array)

1) Preparo das amostras

- Descongelar as amostras em banho-maria a 37°C. Centrifugá-las na microcentrífuga por 10 min a 14.000 rpm. Recolher o sobrenadante. Esse procedimento deverá ser repetido ao diluir as amostras (Reagente G), caso seja necessário. Nesse caso, usar o sobrenadante.

2) Preparo dos padrões

- Reconstituir o padrão 15 min antes com 2,0 ml do Reagente G. O tubo contendo o padrão reconstituído deve permanecer em repouso por pelo menos 15 min. Durante esse período homogeneizá-lo suavemente em intervalos de 3 min; não usar vórtex. Transferir o conteúdo reconstituído para um tubo de poliestireno de 12x75 mm, que será denominado TS (“Top Standard”).
- Enumerar 8 tubos de FACS para realização das seguintes diluições: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256.
- Adicionar 300 µL de G em todos os 8 tubos.
- Fazer diluições sucessivas usando o volume de 300 µL, partindo do tubo TS, conforme ilustração abaixo.



OBS: o Reagente G será utilizado como Controle Negativo (CN), sendo necessário um tubo adicional para a reação, totalizando 10 tubos, com a concentração de proteínas correspondente em pg/ml, a saber: TS=5000, 1/2=2500, 1/4=1250, 1/8=625, 1/16=312.5, 1/32=156, 1/64=80, 1/128=40, 1/256=20 e CN=0.

3) Preparo da mistura de beads

- Fazer um pool dos reagentes (A1 até A6: A1=IL-6, A2=IL-10, A3=MCP-1, A4=IFN- γ , A5=TNF, A6=IL-12p70) imediatamente antes do uso. Determinar o número de tubos a testar. Serão necessários cerca de 3 µL de cada suspensão de beads para cada ensaio. Encontrar o volume total de beads a ser pipetado.
- O volume de cada suspensão de beads deverá ser adicionado em tubo único para preparação do pool.
- Utilizar 15 µL da mistura de beads para cada amostra.

OBS: não estocar a mistura de beads. Deve-se agitar bem os frascos contendo as beads antes de pipetá-las (usar vórtex), tanto durante o preparo, quanto na distribuição dos 15 µL/tubo.

4) Execução das reações

- Adicionar 15 μ L das misturas de beads, 25 μ L dos padrões, nas respectivas diluições, e 25 μ L das amostras nos respectivos tubos.
- Adicionar em todos os tubos 18 μ L do Reagente B (Reagente de detecção marcado com PE).
- Incubar 2h, a temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz.
- Adicionar 500 μ L do Reagente F em cada tubo.
- Centrifugar a 1300rpm, 7 min, 18°C.
- Aspirar o sobrenadante com bomba de vácuo, deixando aproximadamente 100 μ L do sobrenadante em cada tubo.
- Adicionar 100 μ L do Reagente F em cada tubo e proceder a leitura.

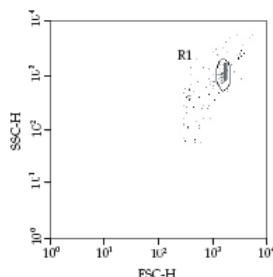
5) Calibração do citômetro

a) Preparação das beads para calibração:

- Identificar tubos de poliestireno com as letras A, B e C.
- Adicionar 50 μ L de “Cytometer setup beads” nos tubos A, B e C.
- Adicionar 50 μ L do controle positivo FITC no tubo B.
- Adicionar 50 μ L do controle positivo PE no tubo C.
- Incubar 30 min, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.
- Adicionar 400 μ L do Reagente F nos tubos B e C.
- Adicionar 450 μ L do Reagente F no tubo A.
- Realizar a calibração do citômetro, segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

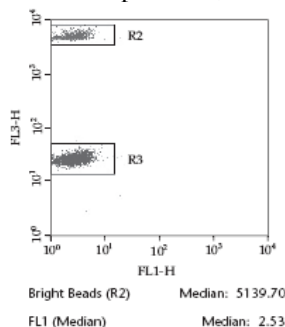
b) Instrument Setup

- Abrir a página de leitura da calibração com as beads, acionando set up na janela de aquisição.
- Selecionar a escala no modo Log para FSC e SSC.
- Ajustar o Threshold para 650.
- Realizar a leitura do tubo A, de acordo com as seguintes instruções:
 - Em gráficos de FSC x SSC, ajustar o gate R1 na população de beads.

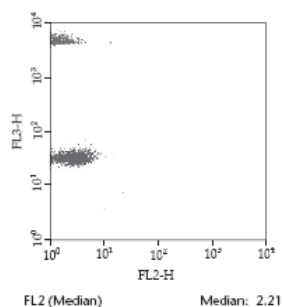


- Ajustar parâmetros de FL3, de forma que a mediana da intensidade de fluorescência da população das beads no topo de FL3 fique em torno de 5000 (R2). A população com a menor fluorescência é determinada como R3.

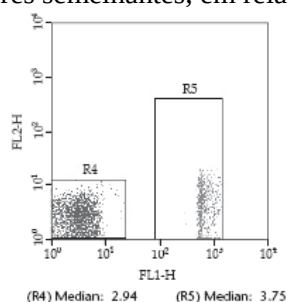
- Ajustar a mediana de fluorescência de FL1 para 2-2,5.



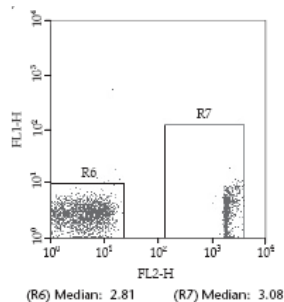
- Ajustar a mediana de fluorescência do FL2 para 2-2,5.



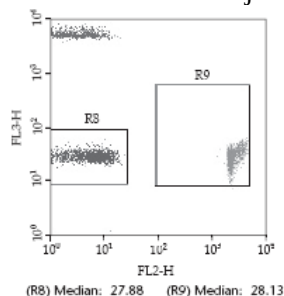
- Realizar a leitura do tubo B e ajustar a compensação de FL2- %FL1. A população com menor fluorescência no FL1 é determinada como R4 e a de maior intensidade no R5. Usar o FL2- %FL1 para ajustar a mediana das duas janelas a valores semelhantes, em relação à FL2.



- Realizar a leitura do tubo C para compensar os parâmetros de FL1- %FL2 e FL3- %FL2. Ajustar o gate R6 na população com menor intensidade em FL2 e R7 na população com maior intensidade. Usando FL1- %FL2, ajustar a mediana de R7 a valores semelhantes aos de R6.



- Ajustar R9 para a população com maior fluorescência em FL2. Usar o controle FL3- %FL2 para ajustar a mediana de R9 a valores semelhantes aos de R8. Ajustar FL2- %FL3 a 0,1 se necessário.



6) Aquisição das amostras e padrões no citômetro

OBS: colocar os 10 primeiros tubos na pasta “Standard”, demais arquivos deverão ficar na pasta “Samples”.

- Abrir o arquivo modelo (BD CBA application).

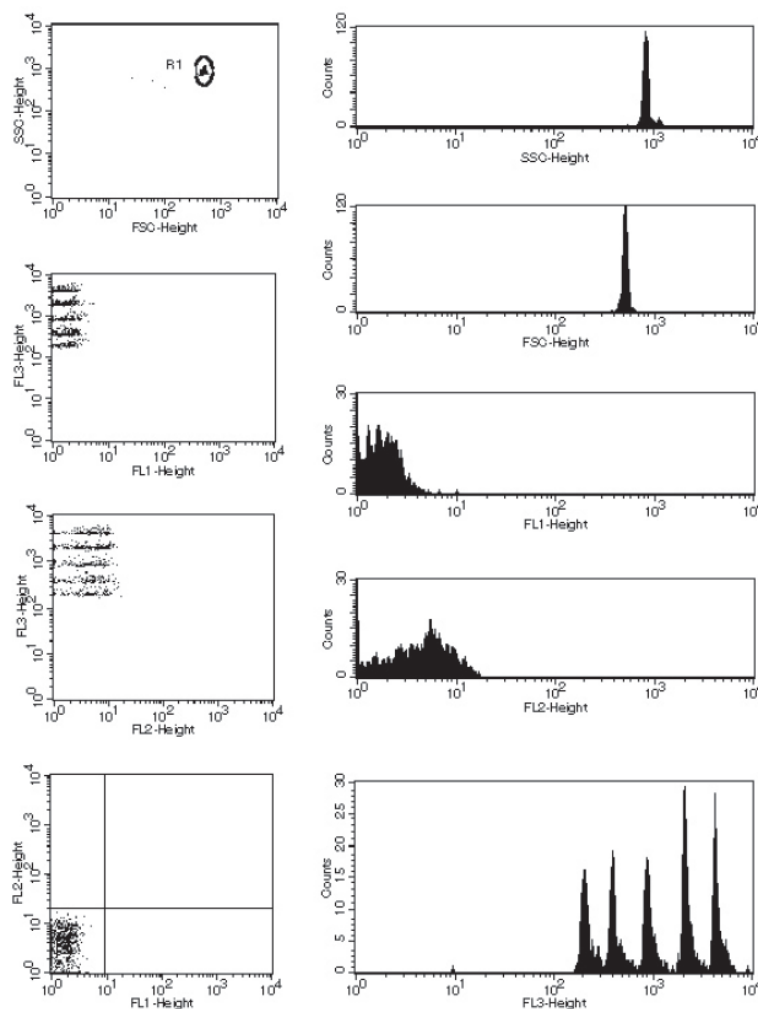
- Conectar o citômetro e acionar os parâmetros do instrumento determinado após calibração do aparelho. Certificar que no item “Acquisition and Storage” a resolução do canal está em 1024.

- Ajustar o número de eventos a serem contados para 1.800 em R1 (300 beads de cada analito).
- Assegurar que o “gate” R1 está delimitado para conter todas as beads. Acionar a velocidade “High”.
- Proceder a leitura dos tubos na seguinte ordem: CN, ordem crescente de concentração dos padrões, ou seja, ler da maior diluição para a menor até o tubo TS.

OBS: nome do arquivo (alfa-numérico) - sugestão: duas iniciais do nome de quem fez o experimento, a data sem barras e a extensão 00X. Ex: AT090905.001.

- É importante salientar a necessidade de identificação dos padrões e amostras no item “Sample ID”.

Modelo de aquisição



7) Análise dos resultados

A análise dos dados deverá ser feita utilizando-se o software específico denominado “BD CBA Analysis Software” ou “FCAP Software”, por meio da obtenção de curvas de calibração obtidas dos padrões de citocinas do kit. Após a construção das curvas, a concentração dos analitos na amostra será determinada em pg/mL, a partir dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI) obtidos na leitura da Fluorescência 2.

APÊNDICE M

PROTOCOLO DE PROCEDIMENTO DE *ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY* (ELISA)

1. TÍTULO

Procedimento de análise da reatividade de anticorpo ANTI-NDO-HSA (0.5mg/mL - 9 May 2012 LB 516-52), LID-1 (0.5mg/mL - #110509 9EU/mg pH8) e NDO-LID (0.5mg/mL - 9 May 2012 LB 516-052).

2. PROPÓSITO

Analisar a reatividade de anticorpos da classe IgM anti-PGL-1, utilizando seu análogo sintético NDO conjugado a HSA, da classe IgG anti-LID-1 e das classes IgG e IgM anti-NDO-LID.

3. PRECAUÇÕES

Equipamento de Proteção Individual (EPI) deve ser utilizado durante todo o processo; Observe as instruções de uso e precauções no rótulo e manuais dos reagentes e equipamentos utilizados.

4. CONDIÇÕES DO AMBIENTE / EXIGÊNCIAS

O preparo das soluções e os procedimentos devem ser realizados em laboratório e toda vidraria utilizada deve estar devidamente limpa.

5. MATERIAIS

Itens

- PBS
- Solução de Lavagem (PBS-T)
- Solução bloqueadora (PBS1% BSA)
- Soro padrão
- Soro controle positivo
- Soro controle negativo
- Conjugado
- Substrato (OPD = O-phenylenediamine)
- Stop solution (ácido sulfurico)

Equipamento

- Placas de ELISA
- Pipetas
- Ponteiras
- Leitora de ELISA

6. SOLUÇÕES UTILIZADAS

- PBS 0,05% Tween 20

Tween -20 → 1ml

PBS → 2 l

- PBS 1% BSA (Bovine Serum Albumin)

PBS → 1000 ml

BSA → 10 g

Fazer alíquotas de 50mL e congelar

- Tampão Carbonato

Na₂CO₃ → 1,59g

NaHCO₃ → 2,39g

H₂O destilada → q.s.p. 1000ml

Ajustar pH 9,6

- Tampão Citrato de Fosfato

Ácido cítrico monohidratado → 10,3g

Fosfato de sódio (Na₂HPO₄) → 8,16g

H₂O Milli Q → 900 ml

Ajustar pH para 5,0 com ácido ou base

Acrescentar Póximo de hidrogênio a 30% → 1 ml

H₂O Milli Q → q.s.p. 1000ml

- OPD

Tampão citrato de fosfato → 12 ml

Pastilhas de OPD → 01 unidade

H₂O₂ → 3,6μl

- Ácido Sulfúrico 2,5 N

H₂SO₄ (P.A.) → 70 ml

H₂O → 930 ml

7. PROCEDIMENTO

7.1 Preparo do antígeno:

- Ressuspender o vial contendo NDO-HSA, LID-1 ou LID-NDO (0.5mg) com 0.5ml de água ultra pura para se obter a concentração final de 1μg/μl.

- Fazer alíquotas de 50μl.

- Armazenar a -20°C.

7.2 Sensibilização:

- Concentração dos antígenos por poço:

- NDO-HSA: 0,2μg/ml;

- LID-1: 1μg/ml;

- LID-NDO: 0,2μg/ml;

- Para cada placa deve-se diluir 1μl do antígeno NDO-HSA, 5μl do antígeno LID-1 e 1μl do antígeno LID-NDO em 5ml de tampão de sensibilização (carbonato de sódio Na₂CO₃ + bicarbonato de sódio NaHCO₃);

- Transferir 50μl do antígeno diluído para toda a placa;

- Cobrir a placa com fita adesiva;

- Incubar overnight a 4°C.

7.3 Bloqueio

- Descartar toda a solução da placa (por inversão) e bater;

- Adicionar 300μl da solução de bloqueio (PBS 1X + BSA 1%) em toda placa;

- Incubar por 1 hora a 37°C;

7.4 Diluição do Soro

- Adicionar 16,66 μl de soro teste em 5ml de PBS 1X + BSA 1%, que corresponde a uma diluição de 1:300.

7.5 Adição das amostras

- Descartar toda a solução da placa com a solução de bloqueio (por inversão) e bater.

- Adicionar 50μl de sangue total em papel filtro 1:100 ou soro 1:300, conforme diagrama de teste no item 8.

- Cobrir a placa e incubar por 1h a 37°C.

Obs: Ter sempre em cada placa soros controle positivo e negativo diluídos 1:300 em PBS 1X + BSA 1%. Distribuir conforme diagrama de teste.

7.6 Anticorpo secundário

- Lavar a placa 4X com 300μl de solução de lavagem, deixando a solução da última lavagem na placa por 5min;

- Diluir 2μl do anticorpo secundário IgM em 20ml de PBS1% BSA (concentração final: 1:10.000);

- Transferir 50μl para as placas contendo NDO-HSA;

- Diluir 1μl do anticorpo secundário IgG em 20ml de PBS1% BSA (concentração final: 1:20.000);

- Transferir 50µl para as placas contendo LID-1;
- Diluir 2µl dos anticorpos secundários IgG e 1 µl de IgM em 20ml de PBS1% BSA (concentração final: 1:10.000 e 1:20.000);
- Transferir 50µl para as placas contendo NDO-LID;
- Cobrir a placa e incubar por 1h a 37°C.

7.7 Adição de OPD

- Lavar a placa 4X com 300µl de solução de lavagem, deixando a solução da última lavagem na placa por 5min;
- Transferir 50µl do OPD para toda a placa
- Incubar por 5 min a temperatura ambiente (no escuro).

7.8 Leitura das placas

- Adicionar 50µl de H2SO4 2,5N;
- Ler a placa em espectrofotômetro a 492nm;

8. DIAGRAMA DE TESTE

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
							Ct+	Ct-	Ct-	Ct-	Br
							Ct+	Ct-	Ct-	Ct-	Br

Ct+ = Amostra de casos novos de hanseníase sabidamente positivo

Ct- = Amostra de indivíduo com sorologia negativa

Br = Branco

Antígenos: NDO-HSA; LID-1 ou; NDO-LID

9. CÁLCULOS

O título de anticorpo deverá ser expresso em índice ELISA (EI) de acordo com a fórmula $EI = OD \text{ (amostra)} / OD \text{ (cut-off)}$. O valor do cut-off deverá ser determinado pela média da OD dos três controles negativos mais três vezes o desvio padrão. O valor do EI igual ou superior a 1.1 será considerado positivo (LOBATO et al., 2006).

(Elaborado pelo Núcleo de Pesquisas em Hanseníase (NEPHANS))

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*

Pesquisador: FRANCISCO CARLOS FÉLIX LANA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01910312.5.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 624.116

Data da Relatoria: 28/04/2014

Apresentação do Projeto:

Adequado

Objetivo da Pesquisa:

Adequado

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado

Justificativa da Emenda:

Considerando a importância da incorporação de marcadores celulares e de novos marcadores sorológicos descritos na literatura, que podem contribuir para a diferenciação de perfis de resposta imunológica entre pacientes com hanseníase e indivíduos infectados, pretende-se modificar a coleta de sangue prevista no projeto de pesquisa "Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase". Inicialmente, estava

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

prevista a coleta de 05 ml (cinco mililitros) de sangue total por punção venosa para genotipagem (análise da suscetibilidade genética à hanseníase). A partir desta coleta, seria coletada uma gota de sangue no local da punção venosa em tubo capilar para hematócrito heparinizado para realização do teste rápido de fluxo lateral para o *Mycobacterium leprae* (ML Flow), que identifica anticorpos contra o Glicolípido Fenólico I (PGL-I). No entanto, para incorporar outros marcadores sorológicos será necessário alterar a técnica de análise, utilizando-se o Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Cytometric Beads Array (CBA) para analisar a presença de marcadores de resposta imune humoral como anticorpos e citocinas e, conseqüentemente a coleta de sangue sendo necessária a coleta de mais 04 ml (quatro mililitros) de sangue total por punção venosa. Além disso, para a incorporação de marcadores celulares como receptores de quimiocinas, moléculas co-estimulatórias e moléculas acessórias – analisados por citometria de fluxo- será necessário realizar a coleta de 20 ml (vinte mililitros) de sangue. Desta forma, a coleta de sangue total por participante será de 29 ml (vinte e nove mililitros) de sangue. Destaca-se que estas alterações não ampliam os riscos, inicialmente previstos, considerando que a coleta de sangue será realizada por uma única punção venosa conforme descrito originalmente. Além disso, pretende-se modificar a forma de coleta de material biológico para detecção de *Mycobacterium leprae* por reação em cadeia da polimerase (PCR). Inicialmente estava prevista a coleta de amostras de tecido intradérmico a partir de pequena incisão nos lóbulos auriculares. No entanto, considerando a possibilidade desta análise em material obtido pela coleta de swabs nas mucosas nasal e bucal, procedimento menos invasivo e doloroso, pretende-se retirar do estudo a coleta de raspado intradérmico, que será substituída pela coleta de swabs, sendo coletados dois swabs na mucosa nasal e dois na mucosa bucal (01 para análise de DNA e 01 para análise de RNA em cada sítio de coleta). Em relação à amostra, devido a incorporação de novos marcadores e da utilização de diferentes técnicas de análise, o grupo de pesquisa avaliou a necessidade de alterações relacionadas aos sujeitos de estudo. Primeiro, pretende-se para ampliar a amostra final, incluir sujeitos (contatos domiciliares de pacientes com hanseníase) residentes em outros dois municípios da microrregião de Almenara (Felisburgo e Palmópolis - vide cartas de autorização anexo). Além disso, com a finalidade de comparação dos marcadores imunológicos eleitos para análise entre pacientes com hanseníase, contatos domiciliares e indivíduos não expostos (controles), retende-se incluir casos de hanseníase recentemente diagnosticados, preferencialmente que estejam no início do tratamento e controles não expostos

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005	
Bairro: Unidade Administrativa II	CEP: 31.270-901
UF: MG	Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592	E-mail: coep@prpq.ufmg.br

(indivíduos da população) de áreas não endêmicas em hanseníase, aproximadamente 30 indivíduos de cada grupo.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos pela aprovação da emenda ao projeto de pesquisa "Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*" do pesquisador: FRANCISCO CARLOS FÉLIX LANA

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovada a emenda conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 24 de Abril de 2014

Assinador por:
Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

ANEXO B - Anuência da Secretaria Municipal de Saúde de Almenara



PREFEITURA MUNICIPAL DE ALMENARA
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE

Av. Olindo de Miranda, nº 1713 – CEP: 39.900-000
Fone: (33) 3721-2929 – CNPJ: 18.349.894/0001-95
Email: saudealmenara@hotmail.com



ADM: 2009/2012

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a realização da pesquisa "Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*", coordenada pelo Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana, da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, no município de Almenara, Minas Gerais.

Almenara, 12 de Maio de 2012.

Ana Mathilde Mares Guimarães
Secretária Municipal de Saúde de Almenara

A GERÊNCIA REGIONAL DE SAÚDE
DEJANIRA BORGES ARAÚJO
DIRETORA REGIONAL

A/c do Núcleo de Atenção a Saúde

Av. Antero Lucena Ruas, 260 Centro
39.970-000 Pedra Azul

