

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Ana Laura Grossi de Oliveira

**RELAÇÕES CAUSAIS ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES DO
RECEPTOR DE VITAMINA D E DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
CATELICIDINA SOBRE MARCADORES SOROLÓGICOS DE PESSOAS
COM HANSENÍASE ANTES E APÓS SEIS MESES DE TRATAMENTO
POLIQUIMIOTERÁPICO**

Belo Horizonte, Minas Gerais

2020

ANA LAURA GROSSI DE OLIVEIRA

**RELAÇÕES CAUSAIS ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES DO
RECEPTOR DE VITAMINA D E DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO
CATELICIDINA SOBRE MARCADORES SOROLÓGICOS DE PESSOAS
COM HANSENÍASE ANTES E APÓS SEIS MESES DE TRATAMENTO
POLIQUIMIOTERÁPICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de concentração: Imunologia das doenças infecciosas e tropicais

Orientadores:

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara (Orientador)

Profa. Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes (Co-orientadora)

Profa. Dra. Ana Thereza Chaves (Co-orientadora)

Belo Horizonte, Minas Gerais

2020

OL48r Oliveira, Ana Laura Grossi de.
Relações causais entre a expressão dos Genes do Receptor de Vitamina D e do Peptídeo Antimicrobiano Catelicidina sobre marcadores sorológicos de pessoas com Hanseníase antes e após seis meses de tratamento Poliquimioterápico [manuscrito]. / Ana Laura Grossi de Oliveira. - - Belo Horizonte: 2020.
156f.: il.
Orientador (a): Ricardo Toshio Fujiwara.
Coorientador (a): Cristiane Alves da Silva Menezes.
Coorientador (a): Ana Thereza Chaves.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hanseníase. 2. Vitamina D. 3. Catelicidinas. 4. Expressão Gênica. 5. Dissertação Acadêmica. I. Fujiwara, Ricardo Toshio. II. Menezes, Cristiane Alves da Silva. III. Chaves, Ana Thereza. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WC 335

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



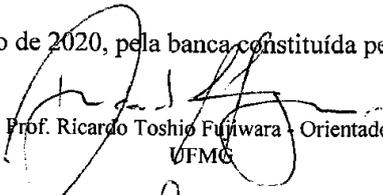
FOLHA DE APROVAÇÃO

"RELAÇÕES CAUSAIS ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES DO RECEPTOR DE VITAMINA D E DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO CATELICIDINA SOBRE MARCADORES SOROLÓGICOS DE PESSOAS COM HANSENÍASE ANTES E APÓS SEIS MESES DE TRATAMENTO POLIQUIMIOTERÁPICO"

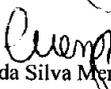
ANA LAURA GROSSI DE OLIVEIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

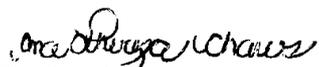
Aprovada em 20 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Ricardo Toshio Fujiwara - Orientador

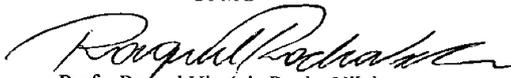
UFMG


Profa. Cristiane Alves da Silva Menezes - Coorientadora

UFMG


Dra. Ana Thérza Chaves - Coorientadora

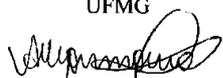
UFMG


Profa. Raquel Virgínia Rocha Vilela

UFMG


Profa. Luísa Mourão Dias Magalhães

UFMG


Dra. Ana Claudia Lyon de Moura

FHEMIG


Dra. Andrea Teixeira de Carvalho

Fiocruz

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Fábio Alves da Silva Júnior

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Dr. Mário Fernando Montenegro Campos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Humberto José Alves

VICE-DIRETORA: Profa. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

SUBCOORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Eli Iola Gurgel
Andrade

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

SUBCOORDENADOR: Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Dr. Daniel Vitor Vasconcelos Santos

Profa. Dra. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Dr. Unai Tupinambás

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

Representantes discentes:

Titular: João Augusto Oliveira da Silva - Doutorado

Suplente: Fernanda Fonseca Ramos - Doutorado

Ana Laura Grossi de Oliveira

Essa tese foi desenvolvida nas dependências da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). No Instituto de Ciências Biológicas fora utilizado o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia e, na Faculdade de Farmácia, os laboratórios de Imunologia Clínica e, Toxicologia Clínica. A pesquisa esteve sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e a co-orientação das professoras Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes e Dra. Ana Thereza Chaves.

Colaboradores:

Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno

Profa. Daniella Castanheira Bartholomeu

Profa. Dra. Mariana Santos Cardoso

Dra. Vanêssa Gomes Fraga

MSc. Guilherme Rafael Gomide Pinheiro

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FAFAR, UFMG

Profa. Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes

Profa. Dra. Ieda de Fátima Oliveira Silva

Profa. Dra. Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães

Prof. Dr. Adriano de Paulo Sabino

Profa. Dra. Edna Afonso Reis

Acadêmica Maira Cândida Rodrigues de Sousa

Acadêmica Pâmela Santos Azevedo

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, UFMG

Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

Profa. Dra. Ana Thereza Chaves

Profa. Dra. Nathalia Sernizon-Guimarães

Mestrando Augusto César Parreiras de Jesus

Hospital Eduardo de Menezes, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, FHEMIG

Dra. Sandra Lyon

Dra. Ana Cláudia Lyon de Moura

MSc. Edilamar Silva Alecrim

Enf. Renata Vieira de Souza

Enf. Mari Souza dos Santos

Apoio Financeiro:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. ALGO (Bolsa de doutorado #140203/2016-8); Bolsa de Produtividade em Pesquisa: RTF (#303345/2018-7) e MOCR (#485891/2013-1).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (RTF: #APQ-04035-17; CASM: #APQ-02871-15; MOCR: #APQ-02332-13)

Dedico esse trabalho aos meus pais José Antonio e Ana Maria, que desde a infância plantaram em minha mente e coração o desejo pela leitura e me instigaram a trilhar o caminho da descoberta do novo a fim de que eu tivesse uma vida diferente daquela que conhecíamos.

Aos meus irmãos Hilário, Ana Cláudia e Gustavo pelo apoio incondicional aos meus sonhos e aspirações.

A tia Aparecida que contribuiu diretamente para que este projeto fosse concebido.

Ao Gilvander, meu marido, companheiro e apoiador, dando suporte emocional e físico para que eu pudesse concluir as etapas desta jornada.

Aos meus filhos Vinícius e Guilherme, que esta minha trajetória possa inspirar e despertar em vocês a paixão pela ciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que me proporciona a cada novo amanhecer.

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

As pessoas que espalham o amor, não têm tempo nem disposição para jogar pedras.

Santa Dulce dos Pobres

São elas:

A Aparecida Grossi (madrinha e mentora), por ter me ouvido quando disse que estava pronta para um recomeço em Belo Horizonte. Entendido que a chama da pesquisa era algo pulsante em mim. Direcionado à pesquisa em hanseníase, mas respeitando meu desejo de não abandonar a nutrição. Gratidão por estar em todas as etapas e conquistas da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, por me aceitar sem mesmo me conhecer e pelo incentivo na orientação, disponibilidade pessoal, bom humor e amizade. Suas palavras sempre me dão conforto, mesmo durante o caos que pode ser um dia no laboratório.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes, por ter aberto “as portas” da Faculdade de Farmácia para que os primeiros resultados da minha tese fossem possíveis. Por estar disponível todas as vezes que precisei e com palavras sábias que me acalmavam. Minha eterna gratidão por ter tido paciência e carinho durante os momentos de orientação e direcionamento. Obrigada pelas oportunidades que foram proporcionadas de conhecer professores, laboratórios e por me fazer sentir parte de seu grupo de pesquisa.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Thereza Chaves, por ter sido a primeira cientista com quem tive contato no doutorado. Minha tutora: me recebeu pelas mãos, me ensinou a escrever um projeto de pesquisa e um artigo científico, compreendeu minhas ausências, apresentou o mundo lindo e intrigante da imunologia e foi minha parceira para chorar os dissabores e para vibrar com as vitórias que tivemos durante esses anos. Gratidão eterna!

Ao Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, por suas sábias palavras e por me fazer enxergar os desafios intelectuais de uma verdadeira pesquisa científica.

Às Professoras Lilian Lacerda Bueno e Daniella Castanheira Bartholomeu pelo prazer da convivência, a grande contribuição neste trabalho e a parceria em outros projetos desenvolvidos no doutorado.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) do Departamento de Parasitologia do ICB, por sempre me receberem com carinho, aceitem que o meu tempo é diferente do tempo de vocês e, mesmo assim, desejarem o meu bem. Sucesso na jornada de cada um de vocês!

Ao Guilherme Rafael Gomide Pinheiro, pelo acolhimento no LIGP e por ter sido tutor nos primeiros passos da minha caminhada na Biologia Molecular. Minha eterna gratidão. Sucesso em sua carreira!

A Mariana Santos Cardoso, presente de Deus durante o meu doutorado. Pesquisadora competente, sensata, dinâmica e humilde, como devem ser os verdadeiros cientistas. Agradecimentos não serão suficientes durante toda uma vida.

A Vanêssa Gomes Fraga, luz em meus dias mais ofuscados, e nos demais também. Gratidão por seu amor, carinho, abraços e orientações. Você é muito especial pra mim.

A Michele Silva de Matos, por me orientar nas questões administrativas pertinentes à minha pesquisa. Vou lembrar para sempre das nossas conversas durante os almoços na cantina do departamento de Parasitologia.

A Nathalia Sernizon Guimarães, minha condutora nas revisões sistemáticas. Como sua jovialidade e vontade de vencer me contagiaram! Poderia ser minha filha, mas foi muito mais que isso, é minha parceira para o que der e vier. Só posso querer seu bem, minha amiga. Desejo sorte na vida!

Ao Augusto César Parreiras de Jesus, por me ensinar e auxiliar nas técnicas de imunologia e, por sempre ter um sorriso no rosto ao me receber. Admiro sua determinação e seu carisma. Te admiro para além “de onde o vento faz a curva”. Danke!

Aos meus companheiros de bancada Lorena Caixeta, Maira Cândida Sousa, Pâmela Santos, Mariana Xavier, Laura Elias, Isabela Magalhães e Ygor Gabriel Fonseca, pela disposição em ajudar nos experimentos, pois sem vocês não teria conseguido.

Aos professores Adriano Sabino, Karina Braga, Ieda Oliveira Silva, Tania Dabes Guimarães e os demais professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, que gentilmente cederam seus laboratórios para os meus primeiros treinamentos e experimentos do doutorado.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Hanseníase, Edilamar Silva de Alecrim, Karina de Sousa Paula, Atvaldo Fernandes Ribeiro Junior, Fábio Cassirer Costa e Maria Júlia Lara Lamac Vieira Cunha, por contribuírem de diversas maneiras para a realização deste trabalho.

A equipe do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG e ao núcleo de Ensino e Pesquisa, Dra. Sandra Lyon, Dra. Ana Cláudia Lyon de Moura, MSc. Edilamar Silva Alecrim, Enfermeira

Renata Vieira de Souza, Enfermeira Mariara Souza dos Santos, Enfermeira Izabel Cristina Sad das Chagas, gratidão por sempre me receberem de braços abertos ao longo das intermináveis visitas a prontuários e nas coletas de amostras biológicas dos pacientes com hanseníase.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, que gentilmente cederam seu tempo para a separação dos prontuários para os momentos de coletas de informações adicionais à pesquisa.

A Coordenadoria Estadual de Dermatologia Sanitária do Estado de Minas Gerais, em nome da Enfermeira Maria do Carmo Rodrigues de Miranda, e da Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Carvalho Leite, por sempre me receber com disposição e me fortalecerem na pesquisa em hanseníase.

A Profa. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga, por ter me acolhido, *extraoficialmente*, como orientanda por diversas vezes e, por ser minha companheira junto com a tia Aparecida Grossi nas jornadas do *International Leprosy Congress*, em Pequim e Manila. Rumo a Índia em 2022!

As pessoas com hanseníase que contribuíram para essa pesquisa e me concederam o termo de consentimento para que fosse possível obter meus resultados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, e ao CNPq pela oportunidade de realizar esta pesquisa recebendo bolsa de doutorado. Viva o ensino público de qualidade!

“Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don't just give up.”

Stephen Hawking

Seja curioso. E por mais difícil que a vida possa parecer, sempre há algo que você pode fazer e ter sucesso. Importa apenas que você não desista.

(tradução livre)

RESUMO

Introdução: A hanseníase é determinada pela modulação da resposta imune do hospedeiro frente à infecção pelo *Mycobacterium leprae* e alterações na expressão gênica podem ser determinantes do prognóstico da doença. **Objetivos:** Estabelecer e quantificar as relações causais entre a expressão dos genes do receptor de vitamina D (VDR) e do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) e seus efeitos sobre os níveis séricos de vitamina D, catelicidina e citocinas, em pacientes com hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia (PQT) e de contatos. **Métodos:** Analisaram-se amostras biológicas de 34 pacientes com hanseníase, constituídos por paucibacilares (PB; n = 14) e multibacilares (MB; n = 20), antes e após de seis meses de tratamento, além de 18 controles e 25 contatos. Os níveis séricos de vitamina D, citocinas e catelicidina foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), citometria de fluxo e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), respectivamente. As análises de expressão gênica foram realizadas utilizando reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Para avaliar o grau de associação entre as principais variáveis utilizou-se a correlação de *Pearson*. Ao final, as relações causais diretas e indiretas foram estabelecidas por regressão linear em análise de trilha. **Resultados:** Os efeitos diretos e indiretos dessas expressões gênicas, para o grupo hanseníase antes do tratamento correlacionaram-se à citocina IL-2 para PB e MB. Após o tratamento, as possíveis vias imunológicas indicam indução da citocina IL-17F para o grupo PB, e para MB, IFN- γ , além das interações de IL-2, IL-6, IL-17A, IL-17F e IL-21. Para o grupo controle, destaca-se a correlação direta entre a expressão gênica de CAMP sobre IFN- γ , enquanto para os contatos nenhuma relação direta ou indireta da expressão de ambos genes foi observada. **Conclusão:** Os resultados da análise de trilha sugerem que, tanto pacientes PB quanto MB utilizam-se de via imunológica dependente da associação da expressão gênica de VDR e CAMP para regular os níveis séricos de IL-2; e que, após os seis meses de PQT, essas vias tornam-se mais complexas com a presença de várias outras citocinas inflamatórias dos perfis Th1 e Th17, para eliminar o bacilo e controlar a hanseníase.

Palavras-chave: hanseníase; receptor de vitamina D; catelicidina; expressões gênicas; deficiência de vitamina D; análise de trilha

ABSTRACT

Background: Leprosy is determined by the modulation of the host's immune response to infection by *Mycobacterium leprae* and gene expression changes may be determinant of the disease's prognosis. **Objectives:** To establish and quantify the causal relationships between the expression of the genes of the vitamin D receptor (VDR) and the cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) and their effects on the vitamin D, cathelicidin and cytokines serum levels in untreated leprosy patients before and after six months of multidrug therapy (MDT) and household contacts. **Methods:** Biological samples from 34 leprosy patients, consisting of paucibacillary (PB; n = 14) and multibacillary (MB; n = 20), before and after six months of MDT, were analyzed, as well as 18 healthy controls and 25 household contacts. Vitamin D, cytokines and cathelicidin serum levels were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC), flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. Gene expression analyzes were performed using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). A Pearson correlation matrix was calculated to assess the association between the main variables. Finally, a path analysis was elaborated to verify causal relationships involving VDR and CAMP gene expressions, having as direct and indirect effects the vitamin D, cathelicidin and cytokines serum levels. **Results:** The direct and indirect effects of both gene expressions for the untreated leprosy group correlated with the IL-2 to PB and MB. After six-month of treatment, the probable immunological pathways suggest induction of IL-17F for the PB, and, for MB, IFN- γ , supported by other interactions between IL-2, IL-6, IL-17A, IL-17F and IL-21. For the control group, there was a direct correlation between CAMP gene expression over IFN- γ , while for household contacts, no correlations were observed. **Conclusion:** Path analysis showed that both PB and MB patients use an immunological pathway dependent on the association of VDR and CAMP gene expression to regulate IL-2 serum levels; and that after six months of MDT, these pathways became more complex, involving Th1 and Th17 cytokines to eliminate the bacillus and control leprosy.

Keywords: leprosy; vitamin D receptor; cathelicidin; gene expressions; vitamin D deficiency; path analysis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição geográfica de casos novos de hanseníase no mundo em 2018.	31
Figura 2	Taxa de detecção de casos novos de hanseníase por estados brasileiros em 2018.	32
Quadro 1	Situação operacional e epidemiológica da hanseníase em Minas Gerais, entre 2009 a 2018.	34
Figura 3	Taxa de detecção de hanseníase por município de Minas Gerais, 2018.	34
Figura 4	Representação esquemática do espectro da resposta imunológica da hanseníase.	43
Quadro 2	Apresentação das cartelas de medicação na poliquimioterapia para pacientes paucibacilares e multibacilares.	50
Figura 5	Organização genômica e mapa de restrição do gene do receptor de vitamina D (VDR).	53
Quadro 3	Estudos de associação do gene VDR com proteção ou gravidade na hanseníase.	54
Figura 6	Visão geral do metabolismo da vitamina D e sua ligação ao receptor nuclear (VDR).	58
Figura 7	Mecanismos de imunomodulação da vitamina D através da ligação de sua forma bioativa.	59
Figura 8	Localização cromossomal do gene do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP).	61
Gráfico 1	Correlação entre os níveis séricos de 25(OH)Vitamina D ₃ (VD ₃) e de catelicidina dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.	87
Gráfico 2	Expressão gênica do receptor da vitamina D (VDR) e do peptídeo antimicrobiano da catelicidina (CAMP) dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.	89
Gráfico 3	Mapa de calor (<i>heatmap</i>) ilustra a análise por correlação de <i>Pearson</i> entre os biomarcadores dos indivíduos dos grupos controle, pessoas com hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.	94

- Figura 9** Diagrama causal da análise de trilha explorando como variável dependente os níveis séricos de IL-2 sob influência direta da expressão gênica de VDR e indireta de CAMP e catelicidina sérica para o grupo hanseníase paucibacilar antes do tratamento PQT. 96
- Figura 10** Diagrama causal da análise de trilha explorando como variáveis dependentes os níveis séricos de IL-2 e IL-17F, sob influência direta da expressão gênica de VDR e CAMP, e níveis séricos de catelicidina, IL-6 e IL-21 para o grupo hanseníase paucibacilar após seis meses do tratamento PQT. 98
- Figura 11** Diagrama causal da análise de trilha explorando como a variável dependente o nível sérico de IL-2, sob influência direta da expressão gênica de VDR e CAMP para o grupo hanseníase multibacilar antes da PQT. 99
- Figura 12** Diagrama causal da análise de trilha explorando como a variável dependente o nível sérico de IFN- γ , sob influência direta da expressão gênica de VDR e CAMP e das citocinas IL-17F e IL-21, assim como, para IL-2 sob a influência direta de IL-17A e IL-17F, para o grupo hanseníase multibacilar após seis meses da PQT. 103
- Figura 13** Diagrama causal da análise de trilha explorando como a variável dependente o nível sérico de IFN- γ , sob influência direta da expressão gênica de CAMP e, indireta da citocina IL-17F para o grupo controle saudável. 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características gerais de indivíduos controles, pessoas com hanseníase e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.	83
Tabela 2	Características clínicas das pessoas com hanseníase atendidas no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.	84
Tabela 3	Níveis séricos de 25(OH)Vitamina D ₃ de indivíduos controles, pessoas com hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.	85
Tabela 4	Aspectos nutricionais relacionados à suplementação nutricional, fórmula de suplementação e a exposição solar no trabalho de pessoas com hanseníase atendidas no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.	86
Tabela 5	Análise comparativa dos níveis séricos de citocinas de pessoas com hanseníase, antes e após seis meses de poliquimioterapia, em comparação aos grupos controles e contatos, atendidos entre 2014 a 2016.	91
Tabela 6	Análise comparativa dos níveis séricos de citocinas para os grupos paucibacilar e multibacilar, antes e após seis meses de tratamento, atendidos entre 2014 e 2016.	92
Tabela 7	Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes sobre a variável básica IL-2 no grupo paucibacilar antes da PQT, com correção da multicolinearidade (k=0,849).	96
Tabela 8	Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes VDR, CAMP e IL-21 sobre a variável dependente IL-17F no grupo paucibacilar após seis meses da PQT, com correção da multicolinearidade (k=0,1002).	97
Tabela 9	Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes IL-6 e catelicidina sobre a variável dependente IL-2 no grupo paucibacilar após seis meses da PQT, com correção da multicolinearidade (k=0,084).	98
Tabela 10	Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes VDR e CAMP sobre a variável dependente IL-2, no grupo multibacilar sem tratamento PQT, após correção da multicolinearidade	99

($k=0,0849$).

- Tabela 11** Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes VDR, CAMP e IL-2 sobre a variável dependente IFN- γ , no grupo multibacilar após seis meses de tratamento PQT. 100
- Tabela 12** Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-6 sobre a variável dependente IL-2 no grupo multibacilar após seis meses de tratamento PQT. 101
- Tabela 13** Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-6 sobre a variável dependente IFN- γ no grupo multibacilar após seis meses de tratamento PQT. 102
- Tabela 14** Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes IL-17F e expressão gênica de CAMP sobre a variável dependente IFN- γ no grupo controle saudável. 104
- Tabela 15** Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes expressão gênica de VDR, TNF- α e IL-21 sobre a variável dependente IFN- γ no grupo contatos. 105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	antes de Cristo
APCs	Células apresentadoras de antígenos
<i>Apud</i>	Expressão em latim para “citado por”, “conforme”, “segundo”
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacillus Calmette-Guérin (Bacilo de Calmette-Guérin)
CAMP	<i>Cathelicidin Antimicrobial Peptide</i> /Peptídeo antimicrobiano catelicidina
CD	Cluster de diferenciação
CDs	Células Dendríticas
CFZ	Clofazimina
CI	Caso-índice
Coep	Comitê de Ética em Pesquisa
DD	Dimorfo-dimorfo
DDS	Dapsona (diamino-difenil-sulfona)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DT	Dimorfo-tuberculoide
DV	Dimorfo-virchowiana
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (teste de imunoabsorção enzimático)
ENH	Eritema nodoso hansênico
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> , expressão em latim para “e outros/as”
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FOXP3	Fator de Transcrição para diferenciação de células T reguladoras
GENES	Aplicativo computacional em Genética e Estatística Experimental
GID	Grau de incapacidade no diagnóstico
HEM	Hospital Eduardo de Menezes
HI	Hanseníase Indeterminada
IB	Índice baciloscópico
IC	Intervalo de confiança
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-9	Interleucina 9
IL-13	Interleucina 13
Il-17A/F	Interleucina 17A /F

IMC	Índice de Massa Corporal
INF- γ	Interferon gama
LAM	Lipoarabinomannan (lipoarabinomanano)
LM	Lipomannan (lipomanano)
LPS	Lipopolissacarídeos
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	Multibacilar/multibacilares
MH	Mal de Hansen
MHC	Major histocompatibility complex (Complexo maior de histocompatibilidade I, II e III)
MNC	Minociclina
mL/ μ L	Mililitro/microlitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ML Flow	<i>Mycobacterium leprae</i> Flow (teste ML Flow, teste do Fluxo Lateral)
MS	Ministério da Saúde
OMS/ WHO	Organização Mundial da Saúde/ World Health Organization
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PB	Paucibacilar /paucibacilares
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PGL-1	Phenolic glycolipid 1 (Glicolípido fenólico-1)
PQT/MDT	Poliqumioterapia/Multidrug therapy
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFM	Rifampicina
RRP	Receptores de reconhecimento padrão
RT-qPCR	Reação da Transcriptase Reversa quantitativa, seguida de PCR
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNP	“ <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ” Polimorfismos de base única
TCD4 ⁺	Linfócitos T - grupamento de diferenciação 4
TCD8 ⁺	Linfócitos T – Grupamento de diferenciação 8
TCLE	Termo de Consentimento Livre e esclarecido
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
Th1	Célula T auxiliar/ <i>helper</i> tipo 1
Th2	Célula T auxiliar/ <i>helper</i> tipo 2
Th17	Célula T auxiliar/ <i>helper</i> tipo 17
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor α</i> (Fator de necrose tumoral)
TT	Tuberculoide-tuberculoide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> / receptor da vitamina D
VV	Virchowiana-virchowiana
VIF	Fatores de inflação da variância
WER	<i>Weekly Epidemiological Record</i>

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS: CONTEXTUALIZAÇÃO	24
1. INTRODUÇÃO	27
2. REVISÃO DA LITERATURA	30
2.1. Hanseníase: aspectos gerais	30
2.2. Epidemiologia da hanseníase	31
2.3. O <i>Mycobacterium leprae</i>	35
2.4. Transmissão da Hanseníase	36
2.5. Aspectos do diagnóstico da Hanseníase	38
2.6. Classificação da Hanseníase e formas clínicas	41
2.7. Aspectos imunológicos na Hanseníase	43
2.8. Manifestações clínicas da Hanseníase	47
2.9. Tratamento e poliquimioterapia na Hanseníase	49
2.10. Genética da Hanseníase	52
2.10.1 Aspectos gerais	52
2.10.2 Vitamina D e VDR na Hanseníase	55
2.10.2.1. Aspectos gerais	55
2.10.2.2 Moduladores do sistema imune	56
2.10.3 – Peptídeo antimicrobiano catelicidina na Hanseníase	60
3 – JUSTIFICATIVA	64
4. OBJETIVOS	66
4.1 Objetivo geral	66
4.2 Objetivos específicos	66
5 – POPULAÇÃO E MÉTODOS	67
5.1 Tipo de estudo, local de coleta e processamento das amostras	67
5.2 Delineamento do estudo	67
5.2.1 Sujeitos da pesquisa e questões éticas	67
5.2.2 Cálculo do tamanho da amostra	68
5.2.3 Critérios de inclusão e exclusão	69
5.2.4 Variáveis sociodemográficas e clínicas analisadas nos grupos hanseníase, controle e contatos	69
5.2.5 Coleta de material biológico	70
5.3 Métodos	70
5.3.1 Dosagem sérica de 25(OH)Vitamina D (Colecalciferol)	71
5.3.2 Determinação dos níveis séricos do peptídeo antimicrobiano catelicidina	72
5.3.3 Avaliação do padrão de citocinas plasmáticas por citometria de fluxo - técnica de Cytometric Bead Array (CBA)	73
5.3.4 Extração de RNA de sangue total	74

5.3.5 Síntese de DNA complementar utilizando a transcriptase reversa.....	75
5.3.6 Verificação da síntese de cDNA – PCR convencional.....	76
5.3.7 Eletroforese de cDNA em gel de agarose a 2%.....	76
5.3.8 Padronização da técnica de RT-qPCR para análise da expressão dos genes de VDR e CAMP em sangue total humano.....	77
5.3.8.1 Otimização de primers.....	77
5.4 Análises estatísticas.....	79
6. RESULTADOS.....	83
PARTE I. Caracterização geral e clínica dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.....	83
PARTE II – Correlação entre níveis séricos de 25(OH)Vitamina D₃ (VD₃) e de catelicidina dos indivíduos dos grupos controles hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.....	85
PARTE III – Expressão dos genes do receptor de vitamina D (VDR) e do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.....	88
PARTE IV –Perfil sérico de citocinas dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.....	91
PARTE V – Mapa de interações entre a expressão dos genes de VDR e CAMP e demais marcadores sorológicos dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.....	92
PARTE VI - Análise de trilha enfatiza relação causa-efeito entre os genes VDR e CAMP e demais marcadores sorológicos durante a evolução da hanseníase.....	95
7. DISCUSSÃO.....	106
8. CONCLUSÕES.....	111
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
10. REFERÊNCIAS.....	113
11. ANEXOS.....	126
ANEXO A - Aprovação do estudo com pacientes de hanseníase pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	126
ANEXO B – Aprovação do estudo com contatos de casos-índice pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFMG.....	127
ANEXO C - Parecer Consubstanciado do CEP – Plataforma Brasil.....	128

ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pessoas com hanseníase	133
ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para contatos de casos-índice de hanseníase.....	136
ANEXO F - Manuscrito: Vitamin D receptor expression and hepcidin levels in the protection or severity of leprosy: a systematic review.....	139
12. APÊNDICES	140
APÊNDICE 1. Resultados de Ct (<i>cicle treshold</i>), ΔCt, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e Log_{10} obtidos pela expressão gênica de VDR e CAMP em RT-qPCR.....	140
APÊNDICE 2. Consolidado da análise estatística dos resultados de leitura dos marcadores sorológicos dos grupos de indivíduos controles, hanseníase antes e após seis meses de tratamento poliquimioterápico e contatos atendidos no Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos 2014 e 2016.....	143
APÊNDICE 3. Matrizes das correlações de <i>Pearson</i> para os grupos hanseníase paucibacilar e multibacilar antes e após seis meses de tratamento, grupos controles e contatos.	146
APÊNDICE 4. Gráficos do traço da crista, representando a variação nos valores dos coeficientes de regressão com diversos valores de k.	150

CONSIDERAÇÕES INICIAIS: CONTEXTUALIZAÇÃO

O projeto intitulado: **Relações causais entre a expressão dos genes do receptor de vitamina D e do peptídeo antimicrobiano catelicidina sobre marcadores sorológicos de pessoas com hanseníase antes e após seis meses de tratamento poliquimioterápico**, foi desenvolvido dentro da linha de pesquisa “Imunologia das doenças infecciosas e tropicais”, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical (PPGCS:IMT), sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e co-orientações da Profa. Dra. Cristiane Alves da Silva Menezes e da Profa. Dra. Ana Thereza Chaves.

A escolha do tema desta tese deve-se ao fato de que a hanseníase ainda é uma doença com elevada prevalência no Brasil, e, portanto, do ponto de vista clínico e científico, acredita-se que o uso de biomarcadores bioquímicos, imunológicos e de genômica comparativa sejam estratégias de pesquisa que podem ser utilizadas para diagnóstico precoce de novos casos da doença, prevenção da infecção em contatos domiciliares e sociais, e para monitoramento da eficácia do tratamento poliquimioterápico, diante da complexa interação que se dá entre o agente etiológico *Mycobacterium leprae* e o hospedeiro humano.

Como forma de melhoramento da pergunta que se desejou responder no doutorado e, para a estruturação dessa pesquisa, foi realizada uma revisão sistemática da literatura sobre o tema de expressão gênica do receptor da vitamina D (VDR) e sua relação com a proteção e a gravidade na hanseníase. Essa revisão seguiu a metodologia do Protocolo PRISMA-P 2015 (*Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis*), cuja pergunta central cadastrada na Plataforma PROSPERO (*International prospective register of systematic reviews*) foi “*Is there a relationship between hepcidin levels or vitamin D receptors (VDR) and the severity of leprosy?*”

Os resultados dessa revisão sistemática foram publicados no periódico *Microbes and Infection*, disponível no endereço: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2017.03.001>, e nos alertaram para a dificuldade em se estabelecer conexão de proteção ou gravidade da hanseníase e a expressão gênica diferenciada em células mononucleares do sangue periférico e em lesões de pele, bem como os polimorfismos presentes no gene do VDR (**Anexo F**). Os autores consideraram que a complexidade de reprodutibilidade das técnicas genômicas, diferenças genéticas das populações estudadas, a interação do VDR com as demais proteínas (citocinas e peptídeos antimicrobianos) envolvidas na resposta imune do hospedeiro, e a efetiva relação causa/efeito entre eles levam a questionamentos que ainda precisavam ser esclarecidos.

Para tanto, observada essa lacuna do conhecimento, demos seguimento ao objetivo geral da tese que foi avaliar a expressão gênica do receptor da vitamina D (VDR) e do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) em pessoas com hanseníase, antes e após seis meses de

poliquimioterapia (PQT), atendidos em um Centro de Referência em Dermatologia Sanitária de Minas Gerais. Os resultados desta pesquisa possibilitaram a produção de artigo científico intitulado: *Inflammatory immune response in leprosy patients is influenced by Vitamin D receptor and Cathelicidin Antimicrobial Peptide gene expressions: a path analysis model.*, submetido em revista de relevante impacto internacional.

Como forma de cumprimento dos créditos solicitados pelo PPPGCS-IMT, foram cursadas disciplinas obrigatórias e eletivas disponíveis para os cursos de Mestrado e Doutorado da UFMG, a saber: Seminários em Doenças Infecciosas e Parasitárias (Análise crítica e apresentação de resultados da pesquisa), Doenças Infecciosas e Parasitárias, Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Conceitos em Imunologia, Estudo da Inflamação em Doenças Infecciosas, Tópicos Avançados em Bioquímica e Imunologia I (Nutrição Baseada em Evidências: estudos Experimentais, Revisões Sistemáticas e Diretrizes), Ferramentas online para a Parasitologia, Redação de Projetos e Trabalhos Científicos e Tópicos Avançados em Bioquímica e Imunologia II: da molécula ao organismo; além da dispensa de 11 créditos referentes ao Mestrado, cumprindo no total 37 créditos e, mantendo o conceito A em todas elas.

No Hospital Eduardo de Menezes, local da seleção dos pacientes, pude participar do acompanhamento nos atendimentos médicos em hanseníase, revisão de prontuários, coleta de material biológico pela equipe de enfermagem e armazenamento para posterior realização de experimentos relacionados à pesquisa, bem como a análise dos dados e interpretação dos resultados referentes à pesquisa. Os pacientes incluídos no estudo foram atendidos entre os anos de 2014 e 2016, e foram classificados, após avaliação clínica, baciloscópica e histopatológica, de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (1966) e segundo a classificação operacional para tratamento PQT da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Ao final deste documento, estão consolidadas todas as colaborações internas e externas a UFMG, bem como as participações com apresentação prévia dos resultados da pesquisa em seminários, simpósios, congressos nacionais e internacionais, e as publicações realizadas ao longo dos quatro anos de dedicação ao doutorado.

Finalmente, a apresentação desta tese de doutorado foi realizada de acordo com a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013; que regulamenta o formato dos trabalhos finais e de qualificação, estabelecendo condições para a marcação das defesas de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

Espero que a leitura deste volume seja agradável como foi para mim a execução da pesquisa e o relato da mesma de maneira dissertativa, didática e explicativa.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de saúde adotou a Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020: acelerando em direção a um mundo livre da hanseníase e os programas junto aos países endêmicos têm sido exitosos desde então, pois acredita-se que mais de 14 milhões de pessoas foram curadas da doença nos últimos 20 anos pelo uso da poliquimioterapia (PQT). Essa estratégia foi estruturada para fortalecer a parceria com os governos dos países com maior incidência de casos novos, interromper a doença e suas complicações, cessar a discriminação e promover a inclusão de pessoas com hanseníase (OMS, 2017; WHO, 2019).

Embora esteja relacionada a redução de mais de 90% na taxa de prevalência, a cadeia de transmissão ainda não foi quebrada, pois aproximadamente 200.000 casos novos de hanseníase ainda são registrados anualmente em todo mundo. No ano de 2018, foi registrada prevalência de 2,74 casos novos por 100.000 habitantes, que foram reportados por 159 países. Desses, 96% estavam em apenas 23 países, incluindo Índia, Brasil, Indonésia, Bangladesh, República Democrática do Congo, Etiópia, Nepal e Nigéria. Isso se traduz na necessidade de compromisso contínuo com o controle, monitoramento e a pesquisa constante em hanseníase (WHO, 2019).

A hanseníase é determinada por interações complexas entre o patógeno invasor, a resposta imune do hospedeiro, fatores genéticos e ambientais. Alterações na expressão ou polimorfismo em marcadores genéticos, como genes do receptor de vitamina D (VDR) e peptídeo antimicrobiano da catelicidina (CAMP), foram associados à resistência ou suscetibilidade ao *M. leprae*.

O VDR é membro da família de receptores nucleares e fator de transcrição, que age como imunomodulador através de seu ligante, a vitamina D (Adorini e Penna, 2009; Carlberg e Campbell, 2013). Esse receptor tornou-se cada vez mais reconhecido como regulador pluripotente das funções biológicas por ter sido encontrado nos macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, principalmente após sua ativação (White, 2008; Yehuda e Eli, 2010). Na hanseníase, preconiza-se a suplementação de vitamina D e do cálcio como medida profilática durante o tratamento das reações hansênicas tipo 1 (BRASIL, 2016), no entanto, a análise do perfil sérico de vitamina D não é prática no monitoramento das pessoas com hanseníase, mesmo sendo consenso de que a boa nutrição seja importante para prognóstico favorável na cura da hanseníase.

Por sua vez, o gene CAMP é um alvo direto do VDR e é fortemente regulado em várias células, como neutrófilos e macrófagos, por $1\alpha,25\text{dihidroxivitamina D}_3$ ($1\alpha\text{-}25(\text{OH})_2\text{D}_3$) (Gombart, Borregaard e Koefler, 2005; Wang *et al.*, 2004), evidenciando um desempenho ativo

na proteção contra patógenos intracelulares (Pinheiro *et al.*, 2018). Altas concentrações de catelicidina são normalmente encontradas em locais de inflamação, atuando como uma defesa primária contra bactérias (Teclé, Tripathi e Hartshorn, 2010). Na infecção por *M. leprae*, existem evidências que serão apresentadas posteriormente, destacando o papel ativo das catelicidinas na progressão da doença e como esse peptídeo pode ajudar a monitorar o processo da resposta imune em pacientes com hanseníase.

Nesse sentido, alguns compostos biológicos, como as proteínas, têm sido utilizados para diagnosticar precocemente a infecção por *M. leprae*, impedir a gravidade da doença e o desenvolvimento de estados reacionais, aferir a eficácia da quimioterapia ou direcionar o prognóstico da cura da doença (Cassirer-Costa *et al.*, 2017; Chaves *et al.*, 2018). Assim, embora estudos anteriores tenham demonstrado baixa expressão ou polimorfismos em certos genes como fator de risco para o desenvolvimento da doença, é necessário entender seus efeitos diretos na resposta imune do hospedeiro na hanseníase.

Nesta perspectiva, foi proposta a quantificação das relações causais e seus efeitos nas vias de interação entre a expressão do gene VDR e CAMP e a presença de vitamina D sérica, catelicidina e citocinas pró e anti-inflamatórias, em pacientes com hanseníase antes e após seis meses de PQT, em população atendida no Centro de Referência Dermatológica em Minas Gerais, Brasil. Esses achados podem permitir o direcionamento em pesquisas futuras sobre a vitamina D nos mecanismos de resposta imune na hanseníase.

Assim, esta tese soma-se a diversas pesquisas, que nas últimas décadas se beneficiaram da disponibilidade de ferramentas da genômica comparativa, da imunobiologia e da estatística para o estudo das correlações entre o agente etiológico da hanseníase e de seu principal hospedeiro, o homem.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Hanseníase: aspectos gerais

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, e de evolução lenta, que se manifesta principalmente por sinais e sintomas dermatoneurológicos em decorrência do padrão de resposta imunológica frente à infecção causada por seu agente etiológico, o *Mycobacterium leprae* (Araújo, 2003; Foss, 1999; Scollard *et al.*, 2006). A evolução da doença está diretamente relacionada ao início tardio do tratamento podendo assim, evoluir para lesões de nervos periféricos, o que gera incapacidades físicas e deformidades irreversíveis. O estigma relacionado às incapacidades decorrentes da doença coexiste com os prejuízos psicológicos e econômicos percebidos pelas pessoas com hanseníase (BRASIL, 2016).

Em termos históricos, a hanseníase é uma das mais antigas doenças que se tem descrição a acometer o ser humano. Evidências arqueológicas na África e na Ásia, de textos pré-históricos em papiros Egípcios e outros documentos sagrados como os hinos sânscritos do *Atharva Veda* e a Bíblia Sagrada sugerem a ocorrência da doença nesses continentes, fazendo referências por vezes controversas, a uma doença conhecida como "lepra", com descrições de sintomas clínicos semelhantes como perda de sensibilidade, aparecimento de manchas vermelhas, ulceração e deslocamento das articulações (Eidt, 2004; Robbins *et al.*, 2009).

A hipótese mais recentemente aceita sugere que a doença tenha se originado no subcontinente indiano, e se espalhou acompanhando as rotas migratórias humanas e de comércio para a Europa após o século IV d.C, ainda não sendo um sério problema de saúde pública até a idade média. A pesquisa genômica comparativa de achados pré-históricos identificou variantes muito raras no genoma do *M. leprae* comprovando as raízes muito antigas na Ásia e na África (Robbins *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2009). Atribui-se a disseminação da doença a partir de 300 a.C., às tropas de Alexandre, o Grande, que trouxeram soldados contaminados de suas campanhas na Índia e posteriormente, os romanos e as Cruzadas espalharam a doença por toda a Europa. As colonizações espanhola e portuguesa, especialmente com o tráfico de escravos africanos, para as Américas, retratam um período importante para a classificação do nosso continente como a nova área endêmica mundial (Eidt, 2004). Ultimamente, todos os países sul-americanos diagnosticam hanseníase, sendo o Brasil o que apresentou as mais altas taxas de incidência de casos novos em 2018 (WHO, 2019).

2.2. Epidemiologia da hanseníase

A hanseníase persiste como uma doença de grande desafio diagnóstico e um sério problema para os programas de saúde pública nos países em desenvolvimento como o Brasil. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência da hanseníase registrada no final de 2018 foi de 184.212 casos (0,24 casos por 10.000 habitantes), com 208.619 casos novos (2,74 casos novos por 100.000 habitantes) reportados por 159 países, dos quais 96% foram notificados em 23 países, incluindo o Brasil (**Figura 1**). Do total de casos novos, 16.013 (7,7%) eram crianças e adolescentes menores de 15 anos e 11.323 (5,4%) foram diagnosticados tardiamente, com Grau 2 de incapacidades (WHO, 2019).

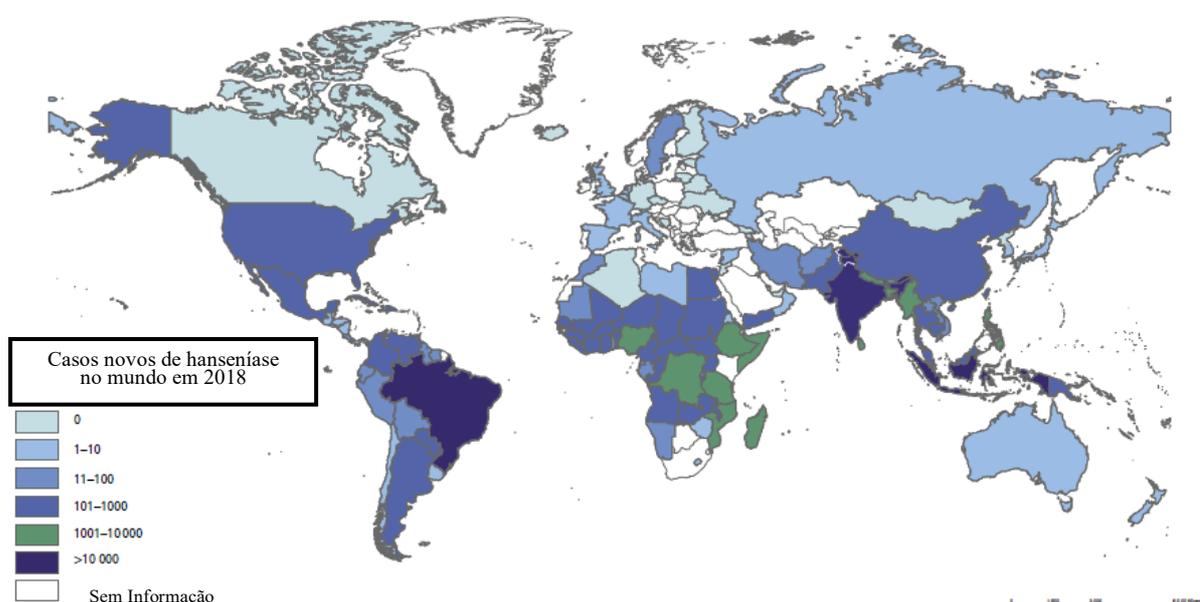


Figura 1. Distribuição geográfica de casos novos de hanseníase no mundo em 2018.

Fonte: Adaptado do Relatório Epidemiológico da Organização Mundial da Saúde sobre hanseníase (WHO, 2019).

Nesse mesmo ano, foram registrados 28.660 casos novos no Brasil, representando uma taxa de detecção de 13,70 casos novos para cada 100.000 habitantes. A distribuição é heterogênea no Brasil, com maior concentração em estados da Região Norte e Centro-Oeste e em algumas regiões metropolitanas do Nordeste (**Figura 2**). Do total de casos novos, 1.705 (5,9%) foram diagnosticados em menores de 15 anos e 2.109 (7,4%) tardiamente, com grau 2 de incapacidade, alcançando um coeficiente de detecção de casos diagnosticados com grau 2 de incapacidade de 10,08 casos por 1 milhão habitantes em 2018 (BRASIL, 2019a).

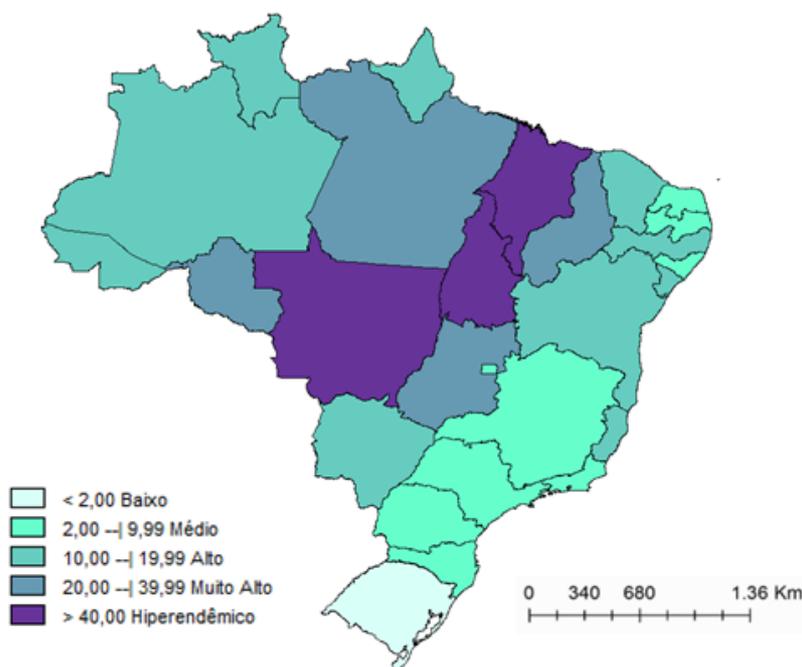


Figura 2. Taxa de detecção de casos novos de hanseníase por estados brasileiros em 2018.

Gráfico gerado pelo software TABWIN (DATASUS, 2018). Padrões de endemicidade: baixa (menor que 2,00), média (2,00 a 9,99), alta (10,00 a 19,99), muito alta (20,00 a 39,99) e situação hiperendêmica (maior ou igual a 40,00).

Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, Ministério da Saúde.

A Organização Mundial da Saúde elaborou em 2016, a estratégia global para a hanseníase: Aceleração rumo a um mundo sem hanseníase (2016-2020), em que destaca três grandes pilares a serem trabalhados para fortalecer o controle, a coordenação e a parceria com o governo; combater a hanseníase e suas complicações e ainda, eliminar a discriminação promovendo concomitantemente, a inclusão (OMS, 2017).

Em concordância com o plano mundial, o Brasil elabora a Estratégia Nacional para o Enfrentamento da Hanseníase (2019-2022) que objetiva essencialmente assegurar compromisso político e recursos para os programas de hanseníase nas três esferas de governo fortalecendo as interfaces e parcerias governamentais e não governamentais para promover a detecção precoce de casos de hanseníase (BRASIL, 2019b).

Tal estratégia visa ainda fomentar pesquisas básicas e operacionais sobre todos os aspectos da hanseníase maximizando a base de evidências para orientar políticas, estratégias e atividades e fortalecer o sistema de vigilância e informação em saúde para monitoramento e avaliação do programa, inclusive sistemas de informações geográficas. No âmbito do enfrentamento da hanseníase e suas complicações, pretende assegurar o início imediato, adesão e conclusão ao tratamento além de qualificar as ações de prevenção e manejo das incapacidades,

promovendo e fortalecendo as equipes de estratégia da família na formação e educação permanente para reforçar a conscientização dos pacientes e da comunidade sobre a hanseníase. Em relação ao combate à discriminação e promoção da inclusão, planeja apoiar modelos de desenvolvimento inclusivo fortalecendo a capacidade de participação ativa das pessoas acometidas pela hanseníase além de promover o acesso a serviços e programas de apoio social e financeiro (BRASIL, 2019b).

Para tanto, os municípios brasileiros foram divididos em três grupos prioritários para a implementação das estratégias, a saber: 1. os municípios sem detecção de casos novos de hanseníase, 2. municípios cuja taxa de detecção permanece menor de 10 casos por 100.000 habitantes, e 3. municípios que apresentaram taxa de detecção maior que 10 casos por 100.000 habitantes. Em termos práticos, a estratégia no Brasil projeta reduzir a taxa de casos novos de hanseníase com grau de incapacidade 2 (GI2) no diagnóstico para 5,5 casos/1 milhão e em 44% para crianças com GI2 além de, aspirar zero estigma e discriminação dos indivíduos já afetados pela doença (BRASIL, 2019b).

Em Minas Gerais, ao longo dos anos, observou-se redução do número absoluto de casos novos de hanseníase, de 1.873 em 2009, para 1.035 casos notificados em 2018, perfazendo um coeficiente de detecção de 4,92 por 100.000 habitantes (**Quadro 1**). Contudo, 75,2 % dos casos novos foram classificados como MB e desses, 11,9% já apresentavam grau 2 de incapacidade no momento do diagnóstico. O número de contatos examinados de 87,7%, em 2018, sugere que a vigilância epidemiológica desse grupo tem sido realizada com o intuito de descobrir novos casos da doença entre aqueles que convivem ou conviveram com casos-índice e encontrar suas possíveis fontes de infecção (BRASIL, 2019c).

Embora a hanseníase ocorra em todas as idades, atenta-se para o número de menores de 15 anos de idade em Minas Gerais (5,6%) (BRASIL, 2019c), indicando a precocidade da exposição ao agente etiológico o que implica na necessidade de ações de controle e monitoramento que vão além das unidades básicas, como observado em alguns programas de busca ativa em escolas de ensino fundamental e médio no Brasil (Barreto *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2018).

Quadro 1. Situação operacional e epidemiológica da hanseníase em Minas Gerais, entre 2009 a 2018.

INDICADORES /ANO	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Proporção de municípios silenciosos: sem diagnóstico de casos novos no ano %(n)	58,6 (500)	59,3 (506)	58,5 (499)	59,2 (505)	64,5 (550)	64,5 (550)	64,4 (549)	65 (554)	64,7 (552)	67,6 (577)
Número absoluto de casos novos de hanseníase	1.873	1.572	1.524	1.479	1.220	1.215	1.141	1.106	1.111	1.035
Coefficiente de detecção de casos novos de hanseníase (por 100.000 habitantes)	9,35	8,02	7,78	7,45	6,2	5,86	5,47	5,27	5,26	4,92
Proporção de casos novos em menores de 15 anos % (n)	4,5% (84)	3,7% (51)	4,1% (63)	4,0% (60)	3,9% (48)	4,5% (55)	3,9% (45)	5,1% (56)	5,6% (62)	5,6% (58)
Proporção de contatos de casos novos de hanseníase examinados entre os registrados (%)	81,3	76,0	75,1	82,1	81,9	90,7	94,5	94,6	93,6	87,7
Proporção de casos novos de hanseníase curados nas coortes (%)	88,9	90,1	88,9	88,4	87,9	88,4	89,4	87,1	86,8	87,3
Proporção de casos novos de hanseníase com grau 2 de incapacidade no diagnóstico (%)	9,8	12,3	10,1	12,3	10,5	10,9	12,4	14,0	12,0	11,9

Fonte: Adaptado de Coordenadoria Estadual de Dermatologia Sanitária, SES/MG, 2019.

É importante observar que no mapa de detecção por municípios em MG (**Figura 3**), no ano de 2018, nota-se que ao lado de cidades hiperendêmicas como as do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, existem outros que estão completamente silenciosos, zerados no número de notificações de casos novos (BRASIL, 2019c).

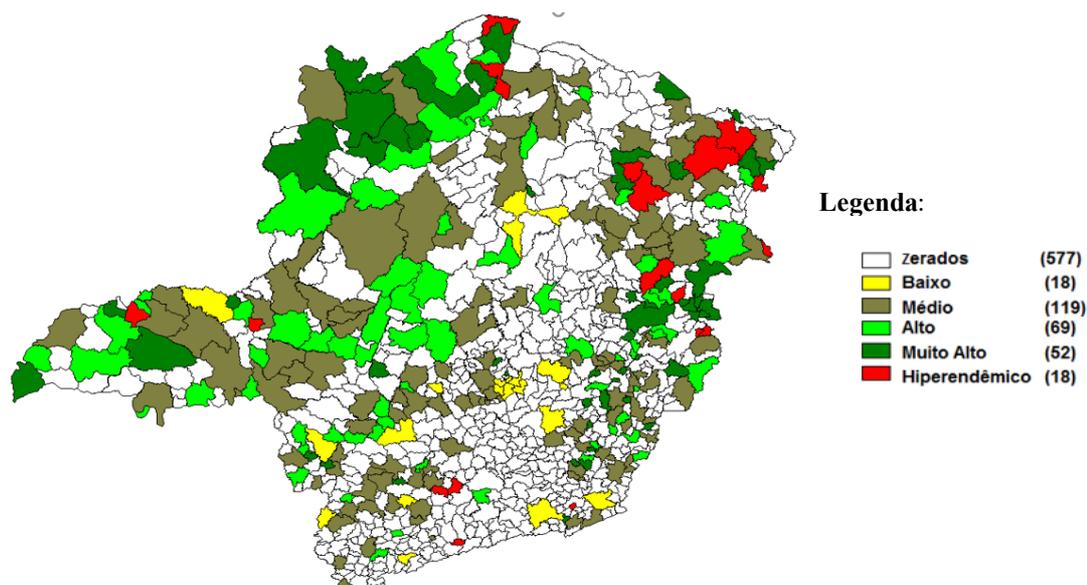


Figura 3. Taxa de detecção de hanseníase por município de Minas Gerais, 2018.

Fonte: Coordenadoria Estadual de Dermatologia Sanitária, SES/MG - 2019

2.3. O *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* foi descrito em 1873 por Gerhard Henrik Armauer Hansen, em Bergen, na Noruega. Essa descoberta fez com que o patógeno bacteriano fosse o primeiro a ser associado a qualquer doença humana. É um bacilo reto ou ligeiramente encurvado que se cora em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem em solução álcool-ácido sendo assim, classificado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Bhat e Prakash, 2012; Cunha *et al.*, 2015; Eichelmann *et al.*, 2013).

É uma bactéria com envelope celular extremamente complexo e com estrutura peculiar rica em lipídeos. Sua estrutura inclui membrana celular, parede celular composta prioritariamente por peptídeoglicanos (lipoarabinomanana-LAM) e ácidos micólicos (ácidos graxos de elevado peso molecular), e mais externamente, uma cápsula rica em glicolípido fenólico I (PGL-I, do inglês *Phenolic Glycolipid-I*), o qual confere especificidade imunológica ao *M. leprae* (Hunter; Brennan, 1983; Hunter e Brennan, 1990; Spencer *et al.*, 2011). As proteínas do envelope celular possuem um papel essencial na patogênese do *M. leprae*, como é o caso das adesinas que participam da interação do bacilo com as células epiteliais e endoteliais, sítios que constituem as fontes primárias de infecção, e também da interação com as células de Schwann (Silva *et al.*, 2013; Vidal Pessolani *et al.*, 2003).

O bacilo é intracelular obrigatório e tem predileção por macrófagos de pele e células de Schwann nos nervos periféricos. Nos tecidos infectados, os micro-organismos aparecem isolados ou em feixes paralelos, dispondo-se no que convencionalmente se chama de globias. Além disso, possui crescimento lento (aproximadamente duas semanas) em temperatura de 33-34°C, o que favorece o seu metabolismo, e poderia explicar o seu tropismo por áreas periféricas do corpo (Bhat e Prakash, 2012; Franco-Paredes e Rodriguez-Morales, 2016).

O *M. leprae* não é uma bactéria cultivável em meio de cultura artificial, apesar de poder ser mantido em culturas axênicas por algumas semanas, o que constitui um fator limitante nos estudos biológicos e bioquímicos. Contudo, em macrófagos humanos, o bacilo mantém a sua viabilidade quando cultivado a 35°C por quatro semanas, mas perde sua viabilidade quando exposto a 37°C por duas semanas (Gaschignard *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2019). Consequentemente, o cultivo do bacilo é feito *in vivo* e está restrito a alguns modelos animais, incluindo o tatu e camundongos, que têm sido utilizados para obtenção do bacilo para fins experimentais a partir de seu crescimento no coxim plantar de animais atímicos (nude), fornecendo quantidades significativas de bacilos viáveis (Monot *et al.*, 2005; Truman e Krahenbuhl, 2001).

Apesar de mais de cem anos de pesquisa, ainda não temos a compreensão clara da patogênese e da fisiologia dessa micobactéria. Por conseguinte, com o sequenciamento completo do genoma do *M. leprae*, sabe-se hoje que o bacilo apresenta uma notável conservação de seu genoma. O estudo de quatro linhagens diferentes revelou uma identidade de 99,995% de conservação, com 215 sítios polimórficos, principalmente os polimorfismos de nucleotídeo único (Singh e Cole, 2011). Análises de bioinformática exibiram 1614 genes que codificam proteínas e outros 50 que codificam RNAs estáveis (Gomez-Valero *et al.*, 2007). Aproximadamente 50% do genoma é ocupado por pseudogenes (genes que sofreram algum tipo de inativação), ligados especialmente a vias do metabolismo energético (Marri, Bannantine e Golding, 2006; Singh e Cole, 2011), e a outras vias fundamentais, o que pode ter promovido uma evolução adaptativa no bacilo levando-o de um modo de vida livre para um nicho intracelular (Monot *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2009).

A análise da sequência do genoma do *M. leprae* melhorou a compreensão da fisiologia, patogênese e genética da hanseníase, contribuindo para o desenvolvimento de métodos diagnósticos, novos marcadores e ferramentas epidemiológicas moleculares para monitoramento da dinâmica de transmissão e as tendências de resistência a medicamentos (Cole *et al.*, 2001; CURTISS III *et al.*, 2001; Eiglmeier *et al.*, 2001).

2.4. Transmissão da Hanseníase

Os mecanismos de transmissão da hanseníase, ainda não são completamente conhecidos, contudo, estudos recentes utilizando a análise de DNA por qPCR de amostras de biópsias de mucosas oral e nasal (Abreu *et al.*, 2014; Araujo *et al.*, 2016; Patrocínio *et al.*, 2005), *swabs* nasais (Cabral *et al.*, 2013; Job *et al.*, 2008) e da sorologia de pacientes e seus contatos de áreas endêmicas, corroboram a indicação de que a principal via de transmissão do *M. leprae* ocorre, provavelmente, por disseminação do bacilo por via aérea antes mesmo do aparecimento das lesões de pele (Marques *et al.*, 2018; Turner, McGuinness e Leder, 2015). Sugere-se, portanto, que as células epiteliais das vias aéreas possuam um papel central na interação inicial com o bacilo e conseqüentemente durante o curso natural da doença (Silva *et al.*, 2013).

A hipótese de transmissão respiratória tem sido também validada por estudos que demonstraram que certas moléculas de adesão presentes na superfície do *M. leprae*, como a hemaglutinina ligadora de heparina e a proteína semelhante à histona podem ligar-se em células epiteliais alveolares e nasais e assim, tornam-se capazes de sustentar a sobrevivência bacteriana (Chattree, Khanna e Rao, 2007; Silva *et al.*, 2015). O período de incubação é, em média, de dois

a sete anos (Pinto *et al.*, 2017). O *M. leprae* caracteriza-se por alta infectividade e baixa patogenicidade, significando que muitos se infectam e poucos adoecem; 90 a 95% da população geral têm boa resistência imunológica (natural) contra *M. leprae* (Araújo, 2003; Goulart, Penna e Cunha, 2002).

O *M. leprae* não atravessa a pele íntegra e a infecção não se dissemina pelo toque. O contato próximo e contínuo de uma pessoa doente da forma contagiosa e uma pessoa saudável de seu convívio pessoal ou social é o determinante na transmissão da hanseníase (Britton e Lockwood, 2004). A consanguinidade também já foi associada ao risco de adoecimento como demonstrado em um estudo da Indonésia em que o risco estimado para hanseníase foi cerca de nove vezes maior em famílias de pacientes e quatro vezes maior em pessoas com relações diretas com pacientes (Beers, Hatta e Klatser, 1999), assim como na Índia (Soebono e Klatser, 1991). Os contatos diagnosticados em programas de vigilância ativa nas escolas (Barreto *et al.*, 2015) e em programas de saúde da família, apresentam menor chance de complicações clínicas quando comparados a contatos detectados de forma passiva reforçando a ideia de que a vigilância nos contatos é uma estratégia poderosa no controle da hanseníase (Hacker *et al.*, 2012; Sarno *et al.*, 2012).

Outros estudos relatam que a forma clínica e a carga bacilar do paciente também são critérios importantes na transmissão da doença, demonstrando que contatos com maior risco de contrair hanseníase são aqueles próximos a pacientes que exibem alta carga bacilar como o caso das formas multibacilares (Moet *et al.*, 2004; Moet *et al.*, 2004), porém, indivíduos com infecção subclínica têm importante papel na cadeia de transmissão, visto que eles podem carrear e transmitir o bacilo, pois estariam sem diagnóstico e tratamento adequados (Martins *et al.*, 2010).

Os tatus silvestres (*Dasyus novemcinctus*) são descritos na literatura como fonte de transmissão pela ingestão da sua carne infectada, pois, esses animais são hospedeiros naturais do *M. leprae* e, portanto, são considerados como um potencial reservatório ambiental para esse micro-organismo (Oliveira, Deps e Antunes, 2019). Essa transmissão zoonótica a humanos foi relatada no sul dos Estados Unidos, especialmente nos estados do Texas, da Louisiana e da Flórida com sobreposição entre áreas com maiores taxas de casos de hanseníase e de tatus infectados com *M. leprae* (Balamayooran *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2015; Truman *et al.*, 2011).

Na América do Sul, os tatus também são comuns e em algumas regiões do Brasil, os moradores locais caçam e os comem como fonte proteica alimentar. Um estudo recente demonstrou que os indivíduos que consumiam carne de tatu com maior frequência mensal apresentavam níveis de anticorpos anti-PGL-I significativamente mais altos do que aqueles com menor ingestão mensal desse alimento (da Silva *et al.*, 2018). No entanto, outro estudo realizado em dezesseis comunidades rurais da região amazônica brasileira não conseguiu evidenciar

correlação entre os casos novos de hanseníase, obtendo total de 3,4% entre os indivíduos que desenvolveram a doença e o consumo de carne de tatus selvagens. Dos 12 animais investigados, apenas um apresentou histopatologia de pele compatível com hanseníase indeterminada, mas a presença do DNA do bacilo não foi confirmada pelo RLEP-PCR, um passo importante para ligação entre a doença humana e o consumo de tatus (Stefani *et al.*, 2019).

Outros reservatórios ambientais temporários, que poderiam participar como fonte de transmissão da doença, foram observados em solo de regiões onde a hanseníase é endêmica e as pessoas convivem próximas a animais como os tatus e os esquilos. No estudo em questão, foram identificados DNA de *M. leprae* em 16% das amostras dos solos de casas de pacientes com hanseníase (Bangladesh), 10,7% nos buracos de tatus (Suriname) e, em 5% no habitat dos esquilos vermelhos (Ilhas Britânicas) (Tió-Coma *et al.*, 2019). Na Índia, foram analisadas 160 amostras de solo coletadas ao redor de um hospital de atendimento de pacientes com hanseníase e de uma aldeia de reassentamento de pacientes casos ativos e pós-cura. Utilizando como alvo o gene RLEP, foi identificada a presença de DNA viável do *M. leprae* em 36% das amostras de solo, 83% de amostras de esfregaço de pele e 100% das amostras de sangue dos pacientes, sugerindo que a contaminação do solo possa ser originada da excreção de pessoas infectadas pelo bacilo (Turankar *et al.*, 2015).

Estudos mais recentes detectaram o mRNA de *M. leprae* em 76,7% (23/30) das amostras de água coletadas em cinco municípios do estado do Ceará, no nordeste do Brasil. O georreferenciamento mostrou uma relação entre as residências dos casos de hanseníase e a fonte de água que contém a bactéria sugerindo que o ambiente desempenha importante papel na manutenção da hanseníase endêmica na região estudada (Arraes *et al.*, 2017).

2.5. Aspectos do diagnóstico da Hanseníase

O reconhecimento precoce da hanseníase e tratamento oportuno são elementos cruciais para cessar a transmissão e prevenir as incapacidades que tanto limitam as pessoas acometidas pela doença. O diagnóstico de hanseníase é fundamentalmente clínico e epidemiológico, realizado através de anamnese clínica, exame geral e investigação dermato-neurológica para identificar um ou mais sinais cardinais da doença: 1. lesões ou áreas na pele com alteração de sensibilidade e/ou 2. comprometimento de nervos periféricos, alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas e, 3. a presença de bacilos do *M. leprae*, que pode ser confirmada na baciloscopia de esfregaço intradérmico ou na biópsia de pele (BRASIL, 2016). A baciloscopia, o teste de intradermorreação (Mitsuda), a histopatologia, os testes imunológicos (sorologia e

imunohistoquímica), genéticos (identificação molecular) e a eletroneuromiografia são ferramentas auxiliares que podem complementar o diagnóstico clínico (Lastória e Abreu, 2014; Lima *et al.*, 2016).

Quanto à baciloscopia para avaliação da carga bacilar e também a morfologia dos bacilos, o Ministério da Saúde (MS) preconiza realizar o raspado intradérmico em quatro sítios, com preferência pela lesão ativa ou com alteração de sensibilidade, além dos lóbulos auriculares e cotovelo contralateral à lesão. Quando a lesão não puder ser localizada, deve-se realizar o raspado intradérmico em ambos os lóbulos e cotovelos (BRASIL, 2016). A baciloscopia negativa não afasta o diagnóstico de hanseníase e, se positiva, o índice baciloscópico (IB) expressará o número de bacilos em escala logarítmica entre 0 e 6 (Ridley e Jopling, 1962), sendo o método quantitativo de escolha para determinar a leitura da baciloscopia para hanseníase (Ridley e Jopling, 1966). Em relação à morfologia, esse teste verifica a viabilidade do bacilo para determinar a evolução ou a transmissão da doença.

Escala Logarítmica de Ridley

- (0) – Ausência de bacilos em 100 campos examinados.
- (1+) – Presença de 1 a 10 bacilos, em 100 campos examinados.
- (2+) – Presença de 1 a 10 bacilos, em cada 10 campos examinados.
- (3+) – Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado.
- (4+) – Presença de 10 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado.
- (5+) – Presença de 100 a 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado.
- (6+) – Presença de mais de 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado.

O IB de um paciente é calculado pela média aritmética dos IBs de cada sítio analisado, somam-se os quatro sítios e divide-se o total por quatro. Do ponto de vista morfológico, o *M. leprae* pode apresentar-se nas formas de bacilo íntegro, fragmentado ou granuloso, sendo o íntegro considerado a forma viável (BRASIL, 2016; Ridley e Jopling, 1966).

O teste de Mitsuda é uma reação de hipersensibilidade tardia que indica o grau de imunidade do indivíduo frente ao *M. leprae* após injeção intradérmica de 0,1mL desse antígeno na face anterior do antebraço utilizando seringa de insulina (BRASIL, 2017). Quanto à interpretação do teste, verifica-se uma reação precoce em 72 horas, caracterizada por eritema e endureção local (reação de Fernandez), e uma reação tardia, denominada reação de Mitsuda, que após 28 dias, o local de administração do antígeno apresentará características conforme foram definidos no Congresso internacional de Tóquio (1948) interpretados como resultados em: teste de Mitsuda negativo, observando-se ausência de qualquer sinal no local de inoculação antigênica

ou nódulo menor que 5 mm de diâmetro; teste de Mitsuda positivo, com presença de nódulo maior ou igual a 5 mm de diâmetro, indicativo de positividade para imunidade mediada por célula frente ao patógeno (Bechelli, Souza e Quagliato, 1957; BRASIL, 2017).

No exame histopatológico de lesões de pele ou nervo são realizadas biópsias para confirmação de casos clinicamente duvidosos ou para definir a classificação de acordo com o espectro de formas clínicas (Ridley e Jopling, 1966). Nesse exame, a sensibilidade de detecção é baixa, sendo necessários cerca de 1.000 bacilos/cm³ de tecido para que seja possível visualizar um único BAAR na lâmina. A visualização de bacilos íntegros, solidamente corados, indica que eles são viáveis e são capazes de se multiplicar. Bacilos fragmentados ou poeira bacilar são achados que indicam a morte do bacilo (Lyon-Moura; Pedrosa, 2013). Identifica-se o bacilo, corado pelos métodos de coloração Ziehl-Neelsen, mas sobretudo a coloração de Fite-Faraco e a de Wade. Para cada forma clínica da doença tem-se a análise de características histológicas peculiares que vão desde a presença de granulomas epitelioides coesos com bainha linfocitária perivascular ou perineural até numerosos histiócitos vacuolados (células de Virchow) contendo inúmeros bacilos formando as globias (Piris, Lobo e Moschella, 2010).

Infelizmente, ocorre que nem sempre a baciloscopia e o exame histopatológico estão disponíveis em muitos serviços de atenção básica de saúde, limitando-se, muitas vezes, aos centros de referência em dermatologia sanitária dos estados brasileiros (BRASIL, 2010).

Os testes sorológicos têm avançado para auxiliar no diagnóstico da hanseníase e têm como alvo a detecção de anticorpos específicos contra o *M. leprae*. Desde a década de 1980, com a descoberta do glicolípido fenólico-1 (PGL-1), um componente antigênico específico do *M. leprae* (Hunter; Brennan, 1983; Hunter e Brennan, 1990; Hunter, Gaylor e Brennan, 1986) e o surgimento dos primeiros testes, abriu-se a possibilidade de detecção da infecção subclínica e do diagnóstico precoce. No teste de imunoabsorção enzimática ou do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) utiliza-se o antígeno bruto ou proteínas específicas do *M. leprae* e de outras micobactérias como *M. tuberculosis* para verificação de reação cruzada (Burgess *et al.*, 1988; Cho *et al.*, 2001; Levis *et al.*, 1986).

Níveis elevados de IgM anti-PGL-1 indicam presença do antígeno em pessoas sem tratamento, com carga bacteriana elevada, exposição recente a pacientes multibacilares, reação hansênica ou resistência terapêutica. Pessoas paucibacilares ou indivíduos tratados com boa resposta ao esquema terapêutico tendem a apresentar níveis baixos desses anticorpos no soro (LYON *et al.*, 2008), porém, a sorologia não consegue distinguir infecção passada de uma atual, nem pode ser usada como ferramenta única na distinção entre infecção clínica ou subclínica (Oskam, Slim e Bühner-Sékula, 2003).

A partir de 2003, foi desenvolvido o teste imunocromatográfico ou teste de fluxo lateral ou ML Flow, que se utiliza do antígeno PGL-1 do *M. leprae* para detecção rápida dos anticorpos IgM no soro humano (Bührer-Sekula *et al.*, 2003). Este teste foi utilizado em estudo realizado no Brasil, no Nepal e na Nigéria com pacientes de hanseníase, como instrumento auxiliar na classificação em PB e MB, reduzindo o risco de tratamento desnecessário e avaliando o uso do exame baciloscópico (Bührer-Sékula *et al.*, 2007; Oskam, Slim e Bührer-Sékula, 2003). Em comparação com o teste de ELISA, o ML Flow mostrou-se de mais fácil execução, dispensando laboratório, de mais baixo custo e mais rápido, sendo possível sua utilização como ferramenta auxiliar para classificação dos pacientes para fins de tratamento nas unidades básicas de saúde (Grossi *et al.*, 2008)

Provavelmente, um dos mais importantes avanços no diagnóstico laboratorial da hanseníase tenha sido o surgimento dos exames moleculares que utilizam técnicas de identificação do material genético do *M. leprae* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional ou PCR quantitativa em tempo real (qPCR), a partir de biópsias de pele, nervo, muco nasal ou sangue. Essas técnicas têm alta sensibilidade e especificidade diagnóstica (Martinez *et al.*, 2006, 2009, 2011), porque amplificam sequências do genoma bacilar e assim, auxiliam em casos de difícil diagnóstico clínico, tais como baciloscopia negativa nos pacientes PB, contatos domiciliares e sociais, histopatologia inconclusiva e na forma neural pura, quando não existem lesões de pele (Martinez *et al.*, 2014). Contudo, este tipo de ferramenta até então, é utilizada exclusivamente em pesquisa, com uso restrito em alguns serviços de referência no Brasil.

Considera-se que a maioria das deformidades que ocorrem na pessoa com hanseníase provém das sequelas da neuropatia hansênica. A eletroneuromiografia consiste no estudo da função dos nervos e dos músculos analisando a presença de lesões e a sua real localização, verificando complementarmente as informações da patologia (axonal, desmielinizante, mista) se aguda ou crônica. Assim, auxilia no diagnóstico das formas neurais primárias da hanseníase, na evolução da terapêutica nos estados reacionais e nos diagnósticos diferenciais diante de outras neuropatias periféricas (Garbino *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018).

2.6. Classificação da Hanseníase e formas clínicas

A classificação da hanseníase leva em consideração o amplo espectro de manifestações clínicas segundo as peculiaridades clínicas, imunológicas e histopatológicas.

A classificação de Madri (1953) adota critérios de polaridade, considerando as características clínicas da doença, que foram acrescidos pelos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, definindo os grupos polares, tuberculoide (T) e virchowiano (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma *borderline* (B) ou dimorfa (D) (MADRID, 1953).

A Classificação Operacional para fins de tratamento poliquimioterápico (PQT), implementada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS), baseia-se no número de lesões cutâneas classificando em paucibacilares (PB), pacientes que apresentam até cinco lesões de pele e multibacilares (MB), pacientes que apresentam mais de seis lesões de pele. A baciloscopia de esfregaço intradérmico pode ser utilizada como exame complementar para a classificação dos casos PB e MB. A baciloscopia positiva classifica o caso como MB, independentemente do número de lesões, porém, o resultado negativo não exclui o diagnóstico da doença (BRASIL, 2016).

A Classificação segundo Ridley e Jopling (1966) é a mais utilizada em pesquisas e leva em consideração a imunidade dentro de um espectro clínico de resistência do hospedeiro, a saber: formas clínicas polares tuberculoide-tuberculoide (TT) apresentando doença localizada, vigorosa resposta imune celular, poucos bacilos e lesões limitadas; virchowiana-virchowiana (VV), extrema suscetibilidade ao *M. leprae*, em que a proliferação disseminada do bacilo resulta em lesões de pele difusamente distribuídas e está associada a forte resposta humoral com anticorpos anti- *M. leprae*. Na subdivisão dimorfa (D) em dimorfa-tuberculoide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV) observam-se formas imunologicamente instáveis com evolução progressiva de DT para DV com redução da resposta imune mediada por célula acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosos, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos (Goulart, Penna e Cunha, 2002; Ridley e Jopling, 1966).

A **Figura 4** ilustra o espectro de classificação imunológica da hanseníase segundo Ridley-Joplin (1966), caracterizando a doença em cinco formas clínicas distintas e apresentando a resposta imune segundo a expressão de algumas citocinas. Como exemplo, na forma TT, no padrão de resposta tipo Th1, a IL-2 exerce ação como fator de crescimento autócrino para células T auxiliares *helper*, fazendo ativação de macrófago mediada pelo IFN- γ (imunidade mediada por célula). De outra maneira, na forma VV, a IL-4 estimula a proliferação de linfócitos Th2 e a diferenciação de células B para a produção de anticorpos (imunidade humoral). Na resposta imune da hanseníase, observa-se ainda que, em relação às ao padrão Th1, a IL-12 representa poderoso estímulo para células T *helper*, enquanto no padrão Th2, a IL-10 suprime a ação dos macrófagos (Fonseca *et al.*, 2017; Goulart, Penna e Cunha, 2002).

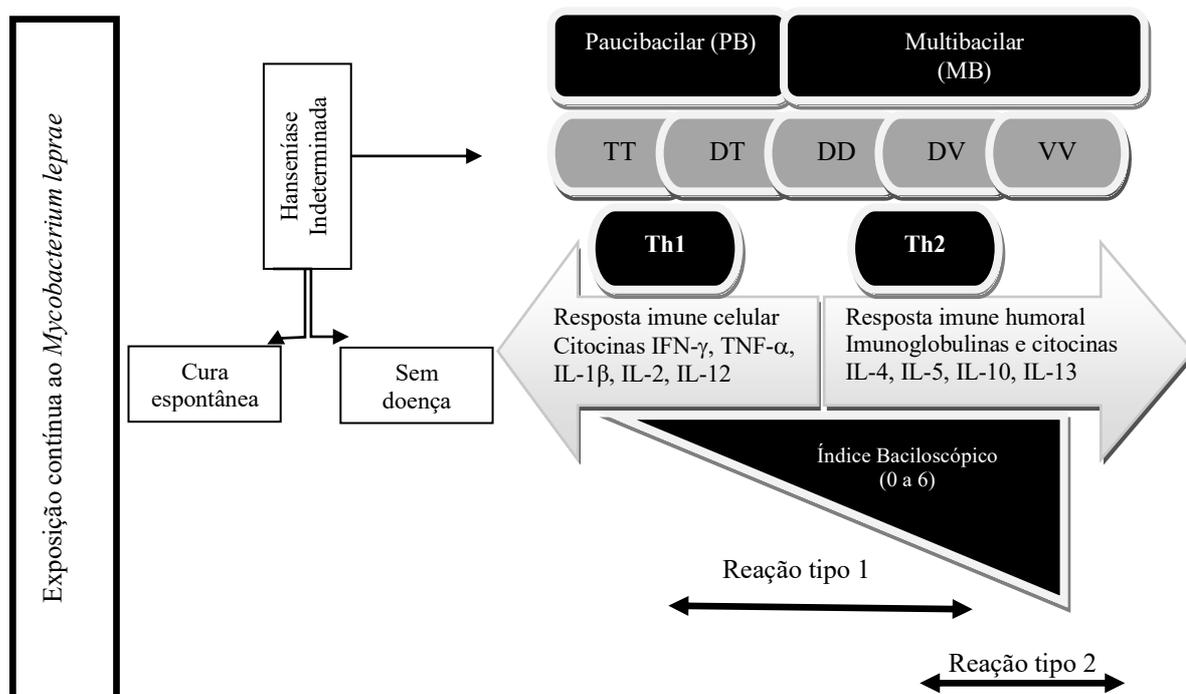


Figura 4. Representação esquemática do espectro da resposta imunológica da hanseníase. Classificação segundo Ridley-Jopling (1966), separando as formas clínicas em Tuberculoide-Tuberculoide (TT), Dimorfo-Tuberculoide (DT), Dimorfo-Dimorfo (DD), Dimorfo-Virchowiano (DV) e, Virchowiano-Virchowiano (VV), e no esquema da classificação operacional da OMS/MS: Paucibacilar (PB) e Multibacilar (MB). A resposta imune do hospedeiro (Th1 e Th2) e o índice baciloscópico correlacionado a cada subtipo de hanseníase.

Fonte: própria autoria.

2.7. Aspectos imunológicos na Hanseníase

O sistema imune humano atua numa rede bastante dinâmica através da organização de componentes estruturais, moleculares e celulares com funções específicas e direcionadas para a defesa do organismo. É fato que, em quase a totalidade das doenças infecciosas, a maioria das pessoas promove a destruição desses micro-organismos e impede a evolução da infecção. Por outro lado, se ineficiente, seja a resposta imune inata (disfunções das células fagocíticas e deficiência das proteínas do complemento) ou a imunidade adaptativa (deficiência na função das células T ou B para produção de anticorpos), observa-se a ausência de proteção, e por vezes, a evolução negativa das doenças infecciosas (Fonseca *et al.*, 2017; Kosgei e Yun-Peng, 2015; Walker e Lockwood, 2006).

Diante da exposição ao *M. leprae*, acredita-se que mais de 90% dos indivíduos apresentem resistência natural e, portanto, não desenvolvem a doença (Pinheiro *et al.*, 2018), ou

até mesmo, dada a infecção, a doença permaneça em estágio de latência, no qual o sujeito permanece assintomático por longo período que pode variar de dois a cinco anos dependendo do organismo (BRASIL, 2016).

A atividade de células como os macrófagos e as subpopulações de linfócitos T serão determinantes para apresentação clínica na hanseníase. Os macrófagos e as células dendríticas apresentam receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) que são responsáveis por reconhecer os padrões moleculares associados aos patógenos como o *M. leprae* (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Após o reconhecimento do patógeno pelos macrófagos e as células dendríticas durante a imunidade inata, essas células são ativadas, e induzem a produção de citocinas pró ou anti-inflamatórias. As primeiras influenciam na diferenciação de linfócitos T auxiliares *helper 1* (Th1), enquanto as anti-inflamatórias estimulam a diferenciação de linfócitos T auxiliares *helper 2* (Th2). Dessa forma, o sistema imune inato contribui para a definição do tipo de estratégia a ser usada pela resposta imune adaptativa do hospedeiro no combate à infecção (Foss e Motta, 2012; Sadhu *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2017).

Os PRRs como os receptores das proteínas do complemento CR1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18) são responsáveis por reconhecer o PGL-1 (Tabouret *et al.*, 2010); os receptores de lectina tipo C (CD209) reconhecem os LAM (Teles *et al.*, 2010); e os receptores *scavenger* dos macrófagos (CD36) se ligam a fosfolipídeos oxidados da parede celular do *M. leprae*, além de outros PRRs, como os receptores do tipo Toll (TLRs) por exemplo, o TLR-2 (Krutzik *et al.*, 2003; Sieling *et al.*, 2008), são responsáveis por identificar os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) localizados principalmente na parede celular do *M. leprae* como o LAM, os lipopolissacarídeos, a manose e o PGL-1 (Lastória e Abreu, 2014).

Os TLRs ativados direcionam a resposta inata por fagocitose inibindo a atividade microbiana, pela ação de peptídeos antimicrobianos como a catelicidina pela via dependente de vitamina D (Kim *et al.*, 2018), bem como desencadeiam a liberação de citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α do inglês: *Tumor Necrosis Factor*), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF– do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), a interleucina IL-12, e a diferenciação das células dendríticas, possibilitando assim, que o sistema imune inato contribua para o desenvolvimento de uma efetiva resposta imune adaptativa (Krutzik *et al.*, 2005).

Na resposta imune inata, a catelicidina tem ação antibacteriana, antifúngica e antiviral, além de ser potente imunomoduladora. A catelicidina atua juntamente com as defensas destruindo micro-organismos e atuando como ponte entre as imunidades inata e adaptativa (Vandamme *et al.*, 2012). A observação da presença desses peptídeos antimicrobianos naturais

derivados da pele humana contra infecções bacterianas sustenta a hipótese de que estes peptídeos sejam parte de um tipo de sistema de defesa primária (Chen *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007).

Na hanseníase, a presença de níveis séricos suficientes de vitamina D (25-hidroxivitamina D3) durante a diferenciação de macrófagos induzida por IL-15 e IL-10, aumentou a expressão do mRNA do peptídeo antimicrobiano catelicidina, levando a uma resposta antimicrobiana mais efetiva contra o *M. leprae* (Kim *et al.*, 2018). Por outro lado, níveis séricos acentuadamente reduzidos de catelicidina foram observados em Iemenitas com hanseníase, tratados ou não, em comparação a indivíduos saudáveis, sugerindo estreita relação da catelicidina com a infecção causada pelo *M. leprae*, principalmente para pacientes multibacilares (Matzner *et al.*, 2011).

Na fase crônica, a resposta imune montada contra o *M. leprae* pode ser regulada por vários mecanismos supressores do hospedeiro, entretanto os mecanismos presentes nos pacientes com as formas mais graves parecem não ser suficientes para controlar a doença. Uma possibilidade para explicar tal fato pode ser o balanço entre a resposta efetora e mecanismos imunorreguladores, em pacientes com as formas mais graves, ocorrer de maneira diferenciada daquele observado nos outros pacientes (Talhari, Talhari e Penna, 2015).

A característica principal das bactérias intracelulares como é o caso do *M. leprae*, é a capacidade de sobreviver dentro dos macrófagos utilizando-se de mecanismos como a inibição de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) pelo PGL-1 e a expressão da enzima superóxido-dismutase que impede a ação da ROS e RNS, o que num primeiro momento parece ser paradoxal, é também útil para o hospedeiro, por induzir forte resposta inflamatória sob estímulo de linfócitos TCD4⁺, através da expressão de antígeno associado ao MHC classe II (do inglês: *Major Histocompatibility Complex* ou complexo principal de histocompatibilidade classe II) e a secreção de IFN- γ , que ativa macrófagos levando à produção aumentada de óxido nítrico (NO) e destruição das bactérias. Além disso, os macrófagos também incitam os linfócitos TCD8⁺ através da expressão de antígenos associados a moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I (MHC I), estimulando o mecanismo de defesa através da citotoxicidade para destruição dos macrófagos que se encontram infectados (Abdel-Hafez, Mohamed e Abd-Elghany, 2009; Cemerski *et al.*, 2002; Tjabringa *et al.*, 2003).

Os indivíduos que apresentam a forma clínica no polo tuberculoide (TT), exibem um perfil de citocinas relacionadas à resposta de linfócitos Th1, com citocinas inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ , e TNF- α) (Sieling e Modlin, 1994) e correlação negativa com o índice baciloscópico (IB) enquanto os indivíduos na forma polar virchowiana (VV) apresentam perfil

de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (Modlin, 1994) e correlação positiva com o IB (Moubasher *et al.*, 1998; Walker e Lockwood, 2006; Yamamura *et al.*, 1991).

Assim, sugere-se que os pacientes TT, tenham um padrão de resposta imune mediada pelas células T parcialmente eficientes, com produção de citocinas que contribuem principalmente para a maturação e ativação de macrófagos, e juntamente com os linfócitos ativado formam granulomas, e predomínio de linfócitos TCD4⁺ no centro e linfócitos TCD8⁺ na periferia (Foss, 1999; Goulart e Goulart, 2008; Walker e Lockwood, 2006), para o controle da multiplicação dos bacilos e a sua posterior eliminação. Já os pacientes VV, parecem possuir um perfil de citocinas que induz a redução da resposta inflamatória, com inibição macrofágica e perfil característico da resposta humoral, com elevados títulos de anticorpos IgM, IgG, IgE e IgA, padrões imunológicos que, somados a outros fatores, seriam insuficientes para conter o *M. leprae* permitindo assim, a progressão da doença e a disseminação bacilar (Kumar, Parkash e Girdhar, 2014; Macedo, de *et al.*, 2018; Marçal *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2018).

Por muitos anos, a principal interpretação da resposta de defesa do hospedeiro foi baseada na caracterização do paradigma imune estabelecido entre os linfócitos Th1 e Th2. Estudos mais recentes com novas abordagens de interpretação das vias imunológicas identificaram novos subtipos de linfócitos T como Th9, Th17, Th22 e Tregs (Quaresma *et al.*, 2015; de Sousa, Sotto e Simões Quaresma, 2017). Os linfócitos Th17, que expressam as citocinas IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23, desempenham papel importante não só em doenças autoimunes, onde foram descritos pela primeira vez, mas também em muitas doenças infecciosas no homem e em modelos experimentais (Saini *et al.*, 2016, 2018; Saini, Ramesh e Nath, 2013).

Na hanseníase, as citocinas IL-17A/F estariam envolvidas na imunopatogênese do eritema nodoso hansênico (ENH), característico de formas multibacilares (Polycarpou, Walker e Lockwood, 2017; Saini *et al.*, 2016), atrai neutrófilos para defesa contra patógenos, além de estar associada a outros mecanismos imunológicos que ajudam a controlar doenças como a leishmaniose e a tuberculose (Santos *et al.*, 2017). Nesses casos, a talidomida reduz os componentes inflamatórios da resposta Th17, enquanto aumenta simultaneamente outros componentes envolvidos na resposta imune celular (Martiniuk *et al.*, 2012).

Estudo brasileiro realizado na região centro-oeste observou maior expressão de IL-17 em lesões de pacientes com episódios reacionais do tipo 2 em comparação aos pacientes com reação do tipo 1 ou aos pacientes que se apresentavam sem lesões, sugerindo portanto, um papel significativo das populações de células Th17 na imunopatogênese das reações hansênicas (Costa *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2017).

Contudo, estudo desenvolvido na região nordeste brasileira avaliou a presença das células Th17 em lesão de pele de pacientes com hanseníase, assim como, analisou os níveis séricos da

citocina IL-17A e em células mononucleares periféricas (PBMCs) de pacientes com e sem reação hansênica. Os resultados indicaram altas concentrações séricas de IL-17A em pacientes PB em comparação aos pacientes MB, sugerindo ainda, que essas células estariam associadas a uma resposta inflamatória eficaz nas formas de PB, porém, não sendo preditivas de reações inflamatórias em pacientes MB (Santos. *et al.*, 2017). Estudo semelhante observou altas concentrações de citocinas do padrão Th17 em cultura de PBMCs de contatos assintomáticos e na borda da lesão de pele de pacientes do polo TT, quando comparadas aos pacientes VV (Saini, Ramesh e Nath, 2013).

Esses achados enfatizam que o balanço de citocinas representa elemento chave no estabelecimento e manutenção de diferentes formas clínicas da Hanseníase. Assim, avaliar a produção de diferentes citocinas com características inflamatórias e reguladoras produzidas por subpopulações de leucócitos da imunidade inata e adaptativa representa estratégia pertinente para caracterização imunopatogênica dos pacientes com diferentes formas clínicas de doenças infecciosas como no caso da hanseníase.

2.8. Manifestações clínicas da Hanseníase

A hanseníase apresenta quadro clínico variado, relacionando-se ao tipo de resposta imunológica do hospedeiro frente à capacidade de multiplicação bacilar. Essas manifestações são precedidas de um longo período de incubação, podendo variar, desde máculas hipocrômicas e placas eritematosas na pele a nódulos cutâneos, com ou sem acometimento neural (Lastória e Abreu, 2014). O *M. leprae* acomete as fibras sensitivas, motoras e autonômicas do sistema nervoso periférico. Na pele, o bacilo invade tanto as fibras sensitivas como as autonômicas, levando à diminuição da sensibilidade cutânea, hipoidrose ou anidrose. Quando ocorrem lesões das fibras motoras, a resposta muscular aos estímulos eferentes do sistema nervoso fica diminuída ou abolida, levando à paralisia e à atrofia muscular (Franco-Paredes e Rodriguez-Morales, 2016; Talhari, Talhari e Penna, 2015).

No grupo indeterminado observam-se máculas hipocrômicas, únicas ou em pequeno número, de limites imprecisos, com ligeira diminuição da sensibilidade, hiperestesia ou anestesia, anidrose e alopecia, mas sem espessamento neural. A baciloscopia é negativa e a reação de Mitsuda é positiva ou negativa, indicando a tendência de evolução para o polo TT ou VV (Lastória e Abreu, 2014; Lyon, 2013).

Na forma tuberculoide, a doença é limitada pela boa resposta imunocelular do hospedeiro. As lesões cutâneas, isoladas e assimétricas, são placas eritemato-hipocrômicas ou

eritematosas, bem delimitadas, frequentemente com bordas externas discretamente elevadas ou com microtubérculos e centro normal. A placa apresenta anestesia térmica, dolorosa e tátil com alteração importante da sensibilidade. Alopecia e anidrose podem estar presentes pelo comprometimento dos anexos cutâneos e espessamento de filete nervoso dérmico (Lastória e Abreu, 2014; Lyon, 2013).

O grupo dimorfo apresenta manifestações diversas, por sua instabilidade nas respostas imunocelulares do hospedeiro frente ao *Mycobacterium leprae*. As lesões cutâneas dos DT se assemelham ao TT, porém são mais numerosas e menores; bordas pouco delimitadas surgindo lesões satélites decorrentes de reações tipo 1, o espessamento dos nervos tende a ser irregular, não tão intenso, contudo, mais numeroso. O teste de Mitsuda é positivo, a baciloscopia é negativa e a histologia predominando granulomas tuberculoide (Araújo, 2003; Lastória e Abreu, 2014). As lesões cutâneas dos DD mostram características entre as formas TT e VV, sendo pouco simétricas, e o acometimento nervoso é moderado; são sugestivas de placas eritematosas, ferruginosas, infiltradas, edematosas e brilhantes, com bordas externas características e internas bem definidas com centro oval hipopigmentado. As lesões cutâneas dos DV lembram as dos virchowianos, tendendo a ser numerosas e não tão simétricas (Lyon, 2013).

No polo VV, as lesões cutâneas, múltiplas e simétricas, caracterizam-se por placas eritematovioláceas, com bordas mal definidas, geralmente sem anestesia e podendo ter espessamento neural. É negativa para o teste Mitsuda e positiva para BAAR. É comum a presença de edema dos membros inferiores e com a multiplicação bacilar, formam-se nódulos e a fâcies leonina, com infiltração e queda dos supercílios (madarose), podendo incorrer em comprometimento das mucosas, olhos, testículos e ossos, além da perda dos dentes incisivos centrais superiores, perfuração do septo nasal e manifestações viscerais (Araújo, 2003; Lastória e Abreu, 2014; Lyon, 2013).

Do ponto de vista do espectro imunológico da hanseníase, o indivíduo pode ainda manifestar clinicamente os estados reacionais antes, durante e após o tratamento com a PQT, ou até mesmo depois de considerado curado, em razão da hipersensibilidade aos antígenos do *M. leprae*. Esses fenômenos são chamados de episódios reacionais ou reações hansênicas do tipo 1 ou do tipo 2, e, são alterações do sistema imunológico que se exteriorizam como manifestações inflamatórias agudas e subagudas e ocorrerem mais frequentemente nos casos MB (BRASIL, 2016; Teixeira, Silveira e França, 2010). Por volta de 50% dos pacientes com hanseníase desenvolvem os episódios reacionais durante o tratamento e 30% deles após a alta por até 5 anos. Os pacientes que apresentam IB maior ou igual a 2 tem maior risco de apresentar esses processos inflamatórios reacionais (Kumar, Dogra e Kaur, 2004).

A reação do tipo 1 ocorre especialmente em DT, porém alguns pacientes da forma TT podem exibir reações locais de hipersensibilidade tardia. Tende a surgir mais precocemente, depois de iniciado o tratamento, entre o segundo e o sexto mês, e cursa com infiltrações de células TCD4⁺ de lesões de pele e nervos, levando a inflamação granulomatosa destrutiva dos nervos. Normalmente, relaciona-se à resposta imunocelular, para melhora (reação reversa) ou piora (reação de degradação), cujas lesões podem se tornar hiperestésicas, eritematoedematosas, descamam e, às vezes, geram úlceras. Cursam com edema das extremidades e neurite, com mínimas manifestações sistêmicas nos indivíduos TT, mas importantes nos próximos ao polo VV (Geluk, 2018; Grossi, 2013).

A reação do tipo 2 manifesta na forma VV e em alguns dimorfos, principalmente os DV, em geral associada a infecções intercorrentes, traumatismos, estresse físico, cirúrgico ou psíquico, imunizações, gravidez, parto, puberdade, uso de iodetos, dentre outros. Tem correlação com a deposição de imunocomplexos nos tecidos ou com a imunidade humoral frente a antígenos bacilares, que acompanham alterações iniciais da imunidade celular com aumento das citocinas séricas, como o TNF- α e o IFN- γ (Geluk, 2018; Grossi, 2013). É também designada de eritema nodoso hansênico (ENH) com surgimento de nódulos inflamatórios subcutâneos simétricos, em qualquer região, às vezes com necrose por obliteração vascular (eritema nodoso necrótico), e sintomas gerais, como febre, mal-estar, mialgias, edema e artralguas, podendo ocorrer comprometimento hepatorenal (Lastória e Abreu, 2014; Polycarpou, Walker e Lockwood, 2017).

O diagnóstico e o tratamento imediatos melhoram significativamente a recuperação desses estados inflamatórios na doença, reduzindo assim os riscos de incapacidades permanentes quando empregados até os seis meses após o início dos sintomas. Somente assim será possível prevenir que a neuropatia seja permanente (Geluk, 2018).

2.9. Tratamento e poliquimioterapia na Hanseníase

O tratamento da hanseníase é considerado estratégico no controle epidemiológico da doença, uma vez que leva à interrupção da transmissão logo após seu início. A partir de 1981, a OMS recomendou o tratamento poliquimioterápico (PQT) em substituição a monoterapia com a Dapsona, o que reduziu as chances de resistência medicamentosa. No Brasil, adota-se as recomendações constantes na Portaria n° 149 de 3 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016), que aprovou as diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de

saúde pública, definindo os critérios para tratamento conforme a classificação operacional e normas da OMS (**Quadro 2**).

O tratamento da hanseníase é ambulatorial, utilizando-se esquemas terapêuticos padronizados, de acordo com a classificação operacional. A associação desses antimicrobianos pode ocasionar efeitos adversos e a impossibilidade de administração, devendo o paciente ser encaminhado pelas estratégias de saúde da família, aos centros especializados para definição do esquema substitutivo ou de outros medicamentos (BRASIL, 2016; Gonçalves, 2013; Gonçalves, Mantellini e Padovani, 2010).

Quadro 2. Apresentação das cartelas de medicação na poliquimioterapia para pacientes paucibacilares e multibacilares.

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

Fonte: Ministério da Saúde, 2016.

Os indivíduos PB são submetidos a doses supervisionadas mensais, durante 6 meses de Dapsona (DDS) na dose de 100mg (1 comprimido) e Rifampicina (RFM) na dosagem de 600mg (2 comprimidos de 300mg) com doses diárias autoadministradas de dapsona de 100mg por dia (BRASIL, 2016). Os indivíduos MB são manejados com esquemas de tratamento diferente envolvendo o acréscimo da Clofazimina (CFZ) e aumento no tempo de duração da terapêutica que nesse caso serão de 12 meses com doses supervisionadas a cada 28 dias de Rifampicina (600mg, 2 comprimidos de 300mg), clofazimina (300mg, 3 comprimidos de 100mg) e dapsona (100mg, 1 comprimido de 100mg) e dose diária autoadministrada de clofazimina (50mg, 1 comprimido) e dapsona (100mg, 1 comprimido) (BRASIL, 2016).

A rifampicina é um composto semissintético que tem ação inibitória da RNA polimerase dependente de DNA nas células procariotas, bloqueando enfim, a síntese de RNA mensageiro e a produção de proteínas essenciais para a multiplicação bacteriana (Lester, 1972). Após a administração da rifampicina, em poucos dias, não haverá bacilos viáveis em lesões cutâneas ou mucosa nasal na análise por microscopia. Alguns efeitos adversos podem ocorrer como alteração da cor da urina, plaquetopenia, distúrbios gastrointestinais, síndrome pseudogripal, insuficiência renal, diminuição da eficácia dos anticoncepcionais orais, alterações hepáticas e hematológicas

(BRASIL, 2016). A primeira dose de rifampicina é capaz de diminuir em até 99,9% as cepas viáveis do *M. leprae* de um indivíduo infectado reduzindo a viabilidade do bacilo e principalmente, a sua integridade morfológica (BRASIL, 2016; Bullock, 1983).

A dapsona é um medicamento bacteriostático cujo mecanismo de ação é basicamente impedir a síntese do ácido fólico bacteriano pela competição com o ácido paraminobenzóico por uma enzima denominada di-hidropteroato sintetase (Modderman *et al.*, 1983; Zuidema, Hilbers-Modderman e Merkus, 1986). Os efeitos adversos mais comuns desse medicamento são anemia hemolítica, hepatite medicamentosa, meta-hemoglobinemia, gastrite, agranulocitose, eritrodermia, dermatite esfoliativa, distúrbios renais e a síndrome sulfona caracterizada por um quadro grave acompanhado de febre, dentre outros sinais e sintomas (BRASIL, 2016).

Outra medicação do esquema padrão é a clofazimina de ação bacteriostática e anti-inflamatória cujo mecanismo de ação consiste na inibição da replicação e crescimento bacteriano, uma vez que o fármaco se liga nas sequências contendo a base guanina do DNA do *M. leprae* (Arbiser, Moschella e Boston, 1995). Os efeitos adversos descritos na literatura são hiperpigmentação da pele, ictiose e distúrbios gastrointestinais como dor abdominal e diminuição da peristalse (BRASIL, 2016).

Existem esquemas substitutivos para tratamento da hanseníase que estão disponíveis para casos especiais relacionados a transtornos mentais, uso de álcool e/ou outras drogas, situações como resistência medicamentosa e intolerância aos fármacos tradicionais da PQT. Os antibióticos mais comuns incorporados são a ofloxacina (OFX), minociclina (MNC) e nos casos de resistência aos antibióticos tem-se utilizado a claritromicina nos serviços de referência (BRASIL, 2016).

Em relação ao tratamento dos episódios reacionais da hanseníase, esse deve ser realizado, no nível ambulatorial, tão logo o diagnóstico do tipo de reação seja definido, sendo utilizada terapia anti-inflamatória que pode estar associada à PQT, sob prescrição e supervisão médica. Essas ocorrências devem ser consideradas como situações de emergência e encaminhadas às unidades de saúde do nível secundário e terciário, para tratamento nas primeiras 24 horas. Nos pacientes com reação do tipo 1 é utilizada a prednisona na dose de 1mg/kg/dia ou dexametasona 0,15mg/kg/dia em caso de doentes hipertensos ou cardiopatas, enquanto para a reação do tipo 2, o tratamento é feito com Talidomida na dose de 100 a 400mg/dia conforme a gravidade do caso. Quando há comprometimento neural nas reações ou contraindicações, como a gravidez, lesões oculares reacionais, edema inflamatório de mãos e pés, glomerulonefrite, dentre outros, são utilizados esteroides tais como a prednisona na dose de 1mg/kg/dia (BRASIL, 2016).

Algumas observações são importantes quanto à manutenção do estado nutricional dos indivíduos com hanseníase em função dos efeitos colaterais das medicações. É importante

considerar que a dapsona é gastrotóxica, porém, sua absorção não é alterada substancialmente pela presença de alimentos. A rifampicina tem sua absorção reduzida quando ingerida com alimentos, portanto, deve ser ingerida após 2 horas de uma refeição completa, mantendo sua biodisponibilidade e eficácia bactericida inalterada. Faz-se necessário, portanto, orientar sobre o uso da medicação (dose diária ou supervisionada), preferencialmente no período da tarde, até duas horas após o almoço. Atenção também deve ser dada, caso ainda persistam sintomas dispépticos, as medicações para alívio sintomático deverão ser prescritas como cimetidina, ranitidina, omeprazol, metoclopramida (BRASIL, 2016).

2.10. Genética da Hanseníase

2.10.1 Aspectos gerais

Ao longo de séculos, as doenças infecciosas constituem importante causa de morte na maior parte do mundo. Considera-se que o aumento da expectativa da vida humana, se deva não somente ao ajuste do nosso sistema imunológico, mas também ao estabelecimento de práticas básicas de higiene, imunização, boa nutrição, novos medicamentos e ao forte componente genético próprio do hospedeiro humano, que contribui para a variabilidade individual da qualidade da resposta imune inata ou adaptativa, frente aos micro-organismos causadores de doenças (Alter *et al.*, 2011; Casanova e Abel, 2018).

Em relação à história da humanidade, nenhuma doença gerou estigma social tão intenso quanto a hanseníase, convencionalmente associada a conceitos errôneos como pecado, impureza e punição, contudo, a natureza infecciosa da hanseníase confirmou-se com a identificação do bacilo causador em 1873. Contudo, achados clínicos indicaram que o contato com o bacilo não era suficiente para o indivíduo desenvolver a doença, e que a hanseníase ocorria com maior ou menor frequência em diferentes populações, manifestando-se de maneiras bem distintas em cada pessoa infectada (Fitness, Tosh e Hill, 2002; Moraes *et al.*, 2006; Prevedello e Mira, 2007).

Há um grande conjunto de evidências indicando a influência genética na proteção ou susceptibilidade da hanseníase. Entre eles podem ser citados os estudos de agrupamento familiar, prevalência em grupos étnicos, análises de segregação, abordagens de genes candidatos e varreduras do genoma do *M. leprae* para demonstrar o papel de regiões específicas, genes ou polimorfismos de nucleotídeo único - *SNPs* (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) na progressão da doença (Beiguelman, 2002; Fernando e Britton, 2006; Prevedello e Mira, 2007).

Com o sequenciamento completo do genoma do *M. leprae*, demonstrou-se que existe importante redução evolutiva e a perda de genes. No entanto, nota-se a manutenção de um conjunto mínimo de genes que implica numa diversidade genética do patógeno muito pequena. Esse fato, sugere que a evolução da doença dependa, em sua maior parte, da susceptibilidade genética do hospedeiro. Neste contexto, acredita-se que um conjunto diferente de genes modifiquem a susceptibilidade à hanseníase não só em termos do controle da infecção *per se*, mas para a definição das formas clínicas de apresentação da doença bem como, a gravidade dos episódios reacionais (Fitness, Tosh e Hill, 2002; Pereira *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

O gene do VDR (do inglês, *Vitamin D Receptor*) está localizado no cromossomo 12 e abrange quase 134 milhões de pares de bases do DNA, de 4 a 4,5 % do total de DNA das células e, provavelmente contém aproximadamente 1200 genes que fornecem instruções para produzir proteínas. O VDR encontra-se na região 12q12-q14, contendo nove regiões codificantes, incluindo uma região promotora passível de *splicing* alternativo, e por isso considerada como *éxon 1* (Kohama *et al.*, 2000). Além disso, possui vários *SNPs* localizados em sítios de enzimas de restrição, gerando RFLPs (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphisms*). As variantes polimórficas mais estudadas são as que ficam próximas a região 3'UTR para as enzimas *TaqI*, *ApaI*, *BsmI*, comumente relacionadas à atividade funcional do VDR e à sua expressão gênica como demonstrado na **Figura 5**.

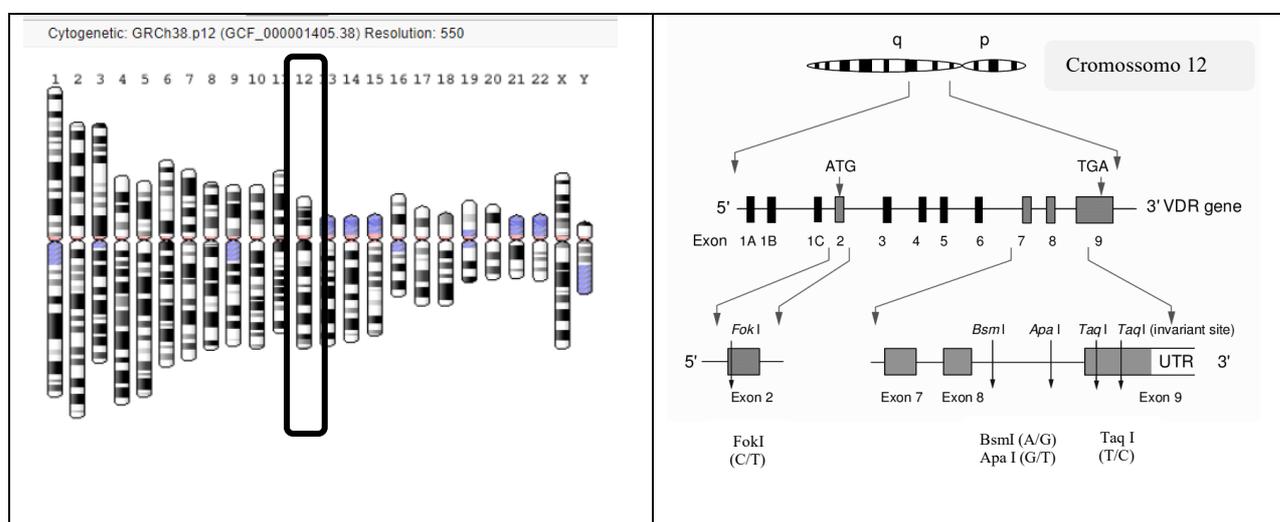


Figura 5. Organização genômica e mapa de restrição do gene do receptor de vitamina D (VDR). Apresentação das regiões de polimorfismo *FokI* (Exon 2), *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* (Exons 8/9).
Fonte: Adaptado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>, e KOHAMA *et al.*, 2000.

Estudos de associação correlacionam a ocorrência e a gravidade da hanseníase a esses polimorfismos específicos do gene do VDR, que se mostrou crucial na via antimicrobiana da resposta imune no combate à micobactérias. Os estudos de associação do VDR com proteção ou

gravidade na hanseníase (**Quadro 3**) foram destacados em uma revisão sistemática do nosso grupo de pesquisa em 2017 (Oliveira *et al.*, 2017), e posteriormente outras publicações acrescentaram informações sobre esse assunto nas populações brasileira e indiana (Araújo *et al.*, 2018; Pepineli *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2018).

Quadro 3. Estudos de associação do gene VDR com proteção ou gravidade na hanseníase.

<i>Referência/ População estudada</i>	<i>Evento comparativo do gene do VDR em pessoas com hanseníase</i>	<i>Resultados de proteção ou gravidade na hanseníase</i>
Roy <i>et al.</i> ,1999/ Índia	Polimorfismo TaqI em pacientes das formas clínicas TT e VV	Susceptibilidade para hanseníase TT (genótipo tt) e hanseníase VV (genótipo TT)
Fitness <i>et al.</i> ,2004/ Malawi	Polimorfismos TaqI, ApaI, BsmI em pessoas com hanseníase	Susceptibilidade para hanseníase VV (genótipo tt) quando associados valores negativos do teste Mitsuda com positivos de índice baciloscópico.
Goulart <i>et al.</i> ,2006/ Brasil	Polimorfismo TaqI em pessoas com hanseníase PB e MB	Susceptibilidade para hanseníase VV (alelo T e genótipo TT)
Velarde-Félix <i>et al.</i> ,2009/México	Polimorfismo TaqI em pacientes com a forma clínica VV	Não foram encontradas associações entre os polimorfismos para proteção ou gravidade na hanseníase.
Marques, 2010/ Brasil	Polimorfismos TaqI, FokI e rs4760658 em pacientes PB e MB	Proteção para os indivíduos controle (genótipos CT, Fok/rs4760658/Taq; haplótipos C/C/C e T/T/T e Fok/Taq; haplótipos T/T)
Sapkota <i>et al.</i> ,2010/ Nepal	Polimorfismos TaqI, FokI e BsmI em pacientes com reação do tipo 1 e eritema nodoso hansênico.	Não foram encontradas associações entre os polimorfismos para proteção ou gravidade na hanseníase.
Teles <i>et al.</i> ,2013/não especificada	Expressão do mRNA em lesões de pele de pacientes nas formas clínicas TT e VV, e pacientes com reação reversa.	Expressão reduzida do mRNA do VDR em lesões de pele de pacientes na forma clínica VV em relação a TT e reação reversa.
Neela <i>et al.</i> ,2015/ Índia	Polimorfismos TaqI, FokI e ApaI em pacientes PB e MB	Susceptibilidade para hanseníase <i>per se</i> (Apa: genótipos AA, Aa, aa); hanseníase TT (Fok: genótipos ff e alelo f); hanseníase PB (Taq/Fok/Apa: haplótipo TFa) e hanseníase MB (haplótipo Tfã)
Mandal <i>et al.</i> ,2015/ Índia	Expressão do mRNA em células mononucleares do sangue periférico em pacientes com reação hansênica do tipo 1 e reação do tipo 2.	Expressão reduzida de 5 a 10% em pacientes com reação do tipo 1 comparados aos não infectados.
Araújo <i>et al.</i> ,2018/ Brasil	Polimorfismos TaqI (T61968C ou rs731236 e uma variação sinônima A61894G em pacientes com hanseníase PB e MB.	Ambos polimorfismos estão intimamente associados ao desenvolvimento da hanseníase. O genótipo TCAA favorece a susceptibilidade à doença.
Singh <i>et al.</i> ,2018/ Índia	Associação de expressão do VDR, polimorfismos FokI e TaqI do gene do VDR e níveis séricos de vitamina D em pacientes nas formas clínicas TT, DT, DV e VV da hanseníase.	Expressão reduzida do VDR foi menor nos grupos TT, DT, DV e VV em relação aos controles. O genótipo ff de FokI e o tt de TaqI foram associados à hanseníase <i>per se</i> . O haplótipo t-F-a poderia ser usado como marcador genético para identificar indivíduos com alto risco de desenvolver hanseníase.
Pepineli <i>et al.</i> , 2019/ Brasil	Polimorfismos BsmI, ApaI, TaqI e FokI em pacientes PB e MB.	Não foram encontradas associações entre os polimorfismos e o desenvolvimento da hanseníase, o haplótipo bAt formado pelos polimorfismos BsmI, ApaI e TaqI foram associados à proteção da hanseníase <i>per se</i> e à forma clínica Multibacilar, enquanto o haplótipo BAT foi um fator de risco para hanseníase <i>per se</i> para pessoas maiores de 40 anos.

Nota: Busca na literatura de estudos até novembro de 2019. Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2017.

Em consonância com o que será apresentado posteriormente, os estudos acima referenciados, estudaram o gene do VDR com relação à expressão reduzida de mRNA em lesões de pele, sangue total e células mononucleares do sangue periférico, assim como, os polimorfismos de *SNPs* localizados em sítios de enzimas de restrição, *TaqI*, *FokI*, *BsmI* e *ApaI*. Esses polimorfismos estão correlacionados à geração de instabilidade do RNAm e por consequência, alterações significativas na produção de proteínas como as citocinas e os peptídeos antimicrobianos. Essa condição geraria um desequilíbrio nos perfis de resposta imunológica no combate ao bacilo, condição fundamental para definir as manifestações clínicas e a gravidade da hanseníase (Araújo *et al.*, 2018; Pepineli *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2018).

Em relação à hanseníase, o polimorfismo *TaqI* já foi associado a risco e gravidade nas populações brasileira, mexicana, africana e indiana (Fitness *et al.*, 2004; Goulart, Ferreira e Goulart, 2006; Roy *et al.*, 1999; Velarde Félix *et al.*, 2009). As demais variantes *Apa* e *Bsm*, também já foram associadas às doenças infecciosas, como a tuberculose. Estudos funcionais utilizando macrófagos infectados pelo *M. tuberculosis*, sugerem que a presença dos polimorfismos *Bsm* e *Taq* e do haplótipo formado por *Bsm/Apa/Taq* exerça influência negativa no potencial fagocítico (Selvaraj, 2011; Selvaraj *et al.*, 2004).

Apesar dos estudos relatando correlações da expressão gênica ou polimorfismos do gene do VDR à hanseníase, muitas dessas associações não puderam ser replicadas, presume-se que por fatores que afetem a qualidade dos estudos tais como, tamanho amostral e número reduzido de indivíduos por forma clínica da doença, características genéticas das populações testadas, o tipo de material biológico utilizado para os experimentos e a metodologia empregada para a investigação, implicando em grande número de variações que podem influenciar na heterogeneidade das respostas entre diferentes populações.

2.10.2 Vitamina D e VDR na Hanseníase

2.10.2.1. Aspectos gerais

Do ponto de vista nutricional do hospedeiro, a hanseníase é uma doença oportunista em populações carentes que não dispõem de uma alimentação equilibrada em relação ao balanço de nutrientes ou a insuficiência de alimentos. Esse desequilíbrio pode deixar o indivíduo mais vulnerável ao desenvolvimento de doenças infectocontagiosas e prejudicar a destruição dos agentes patogênicos. Apesar disso, poucos estudos avaliam aspectos nutricionais de indivíduos

com doenças tropicais negligenciadas, levando a uma carência de informações sobre a condução da terapia nutricional desses pacientes (Dwivedi *et al.*, 2019; Werneck, Hasselmann e Gouvêa, 2011).

Estudo desenvolvido em área endêmica da Bangladesh mostrou que a escassez de alimentos foi identificada como fator de risco para desenvolvimento da hanseníase porque as famílias de baixa renda tiveram dificuldade em manter dieta diversificada, consumindo baixa ingestão de alimentos nutritivos, como carne, peixe, leite, ovos, frutas e legumes que são fontes de nutrientes essenciais para resposta imune competente frente ao *M. leprae* (Wagenaar *et al.*, 2015). Da mesma forma, outro estudo conduzido na Indonésia, constatou que renda instável, anemia, insegurança alimentar, menor diversidade dietética e dificuldade de estocar alimentos, estão fortemente associados a risco aumentado de ter hanseníase, enquanto ter cursado ensino superior e ter casa própria foram descritos como fatores de proteção (Oktaria *et al.*, 2018).

Nessa perspectiva, entende-se que as vitaminas e os seus metabólitos são essenciais para grande número de processos fisiológicos e bioquímicos, cumprindo diversas funções como hormônios e antioxidantes. Entre as vitaminas que estão mais estudadas nos últimos anos está a vitamina D, pois já se conhece que ela influencia de maneira muito específica o prognóstico de diversas doenças, pois, ao nível molecular é requerida para ativar vias imunológicas a partir da ligação ao receptor nuclear (Maggini *et al.*, 2007; Mora, Iwata e Andrian, 2008; Wintergerst, Maggini e Hornig, 2007).

Assim, a partir de observações científicas sobre a associação da vitamina D em diversas patologias como as do metabolismo do cálcio e da formação óssea; doenças autoimunes como esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide; e nas infecciosas como tuberculose, pneumonia, hepatite C, Chagas e esquistossomose (Kearns *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2010; Oliveira Junior *et al.*, 2019), inferiu-se que a vitamina D, após ligar-se ao seu receptor, teria propriedades imunorreguladoras cujos mecanismos fisiológicos precisavam ser explorados inclusive no controle da resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae* (Lagishetty, Liu e Hewison, 2011; Sarkar *et al.*, 2016; White, 2008, 2013).

2.10.2.2 Moduladores do sistema imune

A vitamina D₃ (VD₃), também chamada de colecalciferol, é um pré-hormônio produzido na pele quando a radiação ultravioleta B (UVB) do sol (comprimento de onda de 270-300nm) desencadeia a conversão do 7-desidrocolesterol (7-DHC). Alternativamente, ela pode ser obtida pela dieta provindo de alimentos de origem animal, principalmente peixes gordurosos de águas

frias e profundas, como o salmão e o atum, através da ingestão de suplementos vitamínicos. Outra fonte dietética de vitamina D é o ergosterol (vitamina D₂), proveniente de alimentos vegetais. Dados da literatura mostram que a VD₂ apresenta baixa potência biológica quando comparada à VD₃. O colecalciferol e o ergosterol são transportados no sangue por uma glicoproteína, a proteína ligadora da vitamina D (DBP, do inglês *vitamin D binding protein*) (Bikle, 2014; Gonçalves Castro, 2011).

Como ilustrado na **Figura 6**, ao alcançarem o fígado, as vitaminas D₂ e D₃ sofrem hidroxilação no carbono 25, por enzimas da superfamília do complexo do citocromo P450 (CYP450) localizadas no retículo endoplasmático. A enzima 27-hidroxilase (CYP27A1), converte a VD em 25-hidroxivitamina D₃ - 25(OH)VD₃ (ou calcidiol), que é a principal forma circulante no sangue. A seguir, a 25(OH)VD₃ acoplada a DBP é transportada a vários tecidos cujas células contêm a enzima 1 α -25-hidroxilase (CYP27B1), convertendo-a em 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂VD₃), o seu metabólito fisiologicamente ativo (Mora, Iwata e Andrian, 2008).

Além do fígado e dos rins, a VD₃ pode ser metabolizada por células da próstata, da mama, do cólon, do cérebro, placenta, endoteliais e, do sistema imune. As células T e B ativadas só podem executar a etapa final de conversão de 25(OH)VD₃ em 1,25 (OH)₂VD₃. No entanto, macrófagos e células dendríticas (CD) derivadas de monócitos e CD dérmicas, expressam os dois conjuntos de enzimas necessárias para a conversão de VD₃ em 1,25 (OH)₂VD₃. Ao final do processo, nos rins e no intestino, a enzima 24-hidroxilase, cataboliza o 1,25 (OH)₂VD₃ em seu metabólito inativo, o ácido calcitroico, que é então excretado pela bile (Bikle, 2014; Mora, Iwata e von Andrian, 2008; Moran-Auth *et al.*, 2013).

Os efeitos biológicos da 1,25(OH)₂VD₃ são mediados pelo seu receptor (VDR), um fator de transcrição, que pertence à família de receptores hormonais nucleares. O VDR é expresso em quase todas as células humanas e parece participar, de maneira direta ou indireta, de regulação de cerca de 3% do genoma humano. Como vários outros membros dessa família, o VDR age por meio da heterodimerização com uma das três isoformas do receptor do retinoide X (RXR). Assim, em sua estrutura, ele apresenta domínios específicos para o acoplamento da 1,25(OH)₂VD₃, heterodimerização com o RXR, ligação ao DNA e ativação da transcrição (Mora, Iwata e von Andrian, 2008).

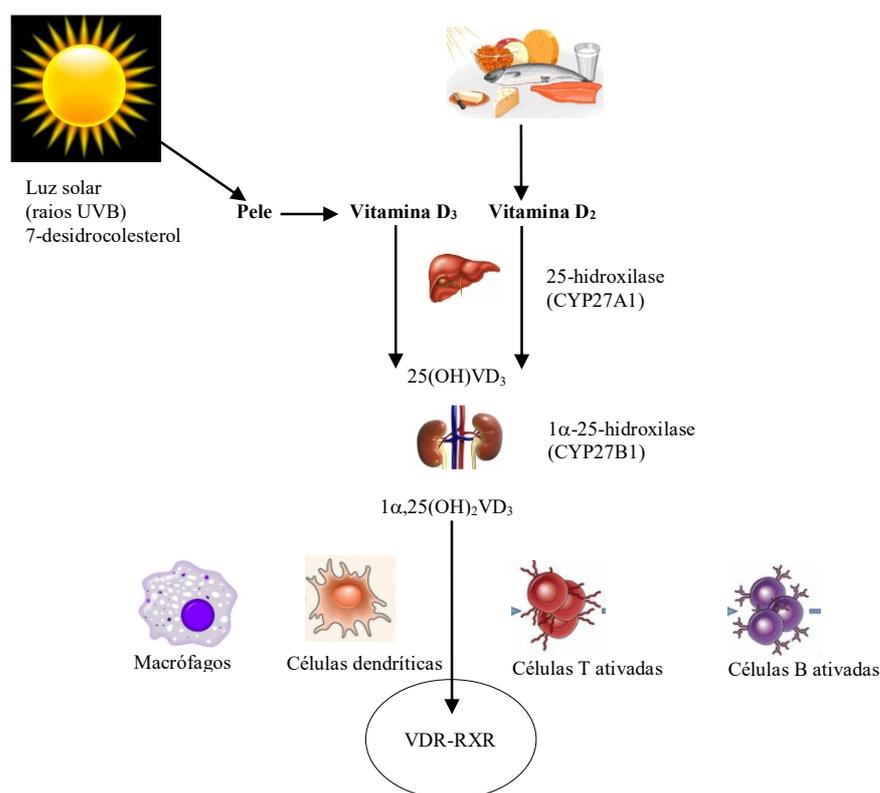


Figura 6. Visão geral do metabolismo da vitamina D e sua ligação ao receptor nuclear (VDR). Destaque para sua função imunológica (autócrina ou parácrina) nos macrófagos, células dendríticas e células T e B quando ativadas. A vitamina D₃ (VD₃) é adquirida na dieta ou sintetizada na pele e hidroxilada no fígado a 25(OH)VD₃ pela enzima 25-hidroxilase (CYP27A1), a principal forma de circulação. Nos rins passa por outra hidroxilação, catalisada pela 1α-25diidroxilase (CYP27B1), tornando-se 1,25(OH)₂VD₃, o metabólito fisiologicamente mais ativo, que tem múltiplos efeitos sistêmicos. Para a manutenção do equilíbrio intracelular, a 1,25(OH)₂VD₃ é catabolizada pela 24-hidroxilase (CYP24A1) em seu metabólito inativo, o ácido calcitroico, que é excretado na bile.

Fonte: autoria própria.

A vitamina D através de sua forma ativa, a 1α,25(OH)₂VD₃ age como modulador do sistema imune, melhorando a fagocitose e a fusão lisossômica de macrófagos infectados (**Figura 7**). É ainda capaz de ativar monócitos, estimular a imunidade celular e suprimir a imunidade humoral, regulando a expressão excessiva de citocinas inflamatórias e aumentando o potencial oxidativo dos macrófagos (Baeke *et al.*, 2010; Cantorna, 2006; Veldman, Cantorna e DeLuca, 2000). Além disso, a 1α,25(OH)₂VD₃ age sobre neutrófilos, monócitos, células *Natural Killer* (NK) e células epiteliais, levando à produção de potentes peptídeos antimicrobianos (catelicidina e defensinas). A expressão destas moléculas leva à proteção do trato respiratório contra infecções

(Cannell *et al.*, 2006), aumenta a eficiência das barreiras epiteliais e melhora as respostas celular e humoral (Maggini *et al.*, 2007; Wintergerst, Maggini e Hornig, 2007).

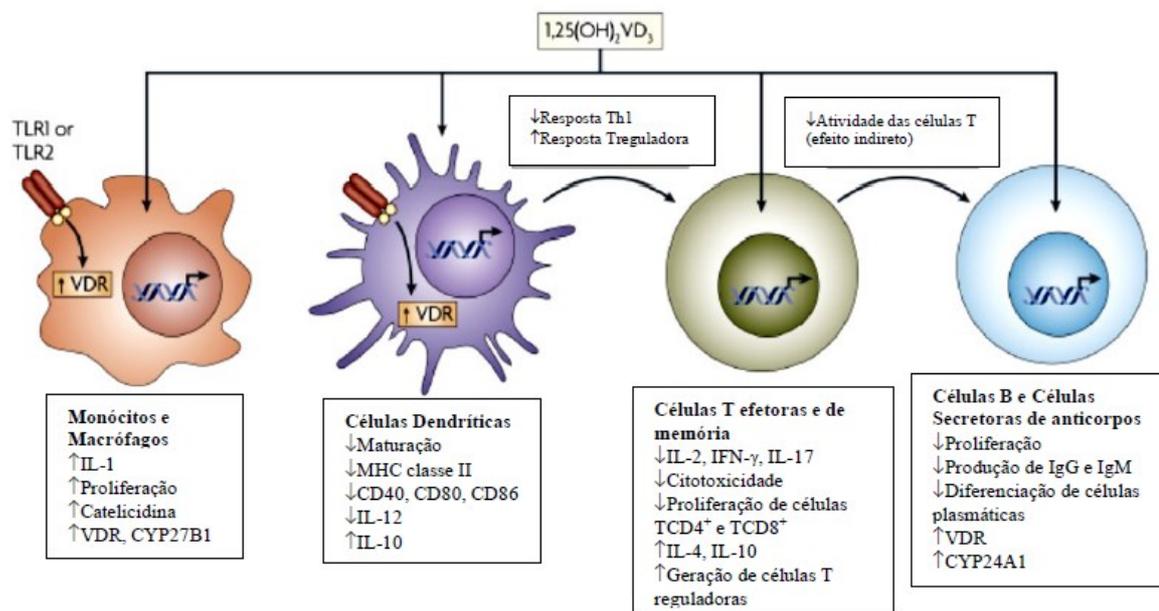


Figura 7. Mecanismos de imunomodulação da vitamina D através da ligação de sua forma bioativa. O $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ sistêmico ou produzido localmente exerce seus efeitos em vários tipos de células imunes, incluindo macrófagos, células dendríticas (CDs), células T e B.

Fonte: Adaptado de MORA; IWATA; von ANDRIAN, 2008

Os macrófagos e as células dendríticas expressam constitutivamente o VDR, enquanto nas células T, a expressão do receptor para a vitamina D se dá somente após a sua ativação. Nos macrófagos e monócitos, a $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ influencia positivamente seus próprios efeitos, aumentando a expressão do VDR e da enzima 1α -25-hidroxilase (CYP27B1). Certos sinais mediados pelos receptores Toll (TLR) também podem aumentar a expressão do VDR. A $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ também induz a proliferação de monócitos e a expressão de interleucina-1 (IL-1) e do peptídeo antimicrobiano catelicidina por macrófagos, contribuindo assim para resposta imune inata frente a algumas bactérias, como por exemplo, o *M. leprae* (Passos-Vázquez *et al.*, 2014). $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ diminui a maturação das CDs, inibindo assim, a regulação positiva da expressão de MHC classe II, CD40, CD80 e CD86 (Baeke *et al.*, 2010; Mora, Iwata e Andrian, 2008).

Além disso, diminui a produção de IL-12 pelas CDs, enquanto induz a produção de IL-10. Nas células T, o $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ diminui a produção de IL-2, IL-17 e interferon- γ (IFN- γ) e atenua a atividade citotóxica e a proliferação de células TCD4⁺ e TCD8⁺. $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ também pode promover o desenvolvimento de FOXP3⁺, (*do inglês: forkhead box protein 3*)⁺,

aumentando a produção de células T reguladoras (T_{Reg}) que suprimem a resposta Th1 e interferem nas funções microbidas dos macrófagos, impulsionando a resposta imune para tentar controlar a proliferação bacteriana através produção de anticorpos e citocinas Th2: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 (Passos-Vázquez *et al.*, 2014). Finalmente, $1,25(OH)_2VD_3$ bloqueia a proliferação de células B, a diferenciação de células plasmáticas e a produção de imunoglobulina. (Bikle, 2014; Moran-Auth *et al.*, 2013; Prietl *et al.*, 2013; Zavala *et al.*, 2018).

2.10.3 – Peptídeo antimicrobiano catelicidina na Hanseníase

A competência da barreira cutânea para ajudar a defender o organismo humano contra os agentes patogênicos depende tanto da resposta imune inata quanto da adquirida. A imunidade inata na pele é um sistema primário de proteção efetivo contra infecções e os peptídeos antimicrobianos (*AMP*, do inglês: *Antimicrobial Peptides*), desempenham um importante papel na defesa contra os agentes patogênicos agindo como moléculas efetoras para eliminar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (Antal *et al.*, 2011; Schaubert e Gallo, 2008; Silva *et al.*, 2018).

As catelicidinas são uma classe notável de peptídeos antimicrobianos. O símbolo oficial para o gene do peptídeo antimicrobiano catelicidina é CAMP (localização cromossomal: 3p21.31), que codifica o peptídeo LL-37 (37 aminoácidos), gerado pela clivagem extracelular da proteína de 18-kDa hCAP18 por serino-proteases (**Figura 8**). Esse peptídeo possui potente atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral (Kahlenberg e Kaplan, 2013; Schaubert e Gallo, 2008; Żelechowska, Agier e Brzezińska-Błaszczak, 2016). Quando em solução, o peptídeo LL-37 forma uma alfa hélice, e devido à sua carga positiva, permite associar preferencialmente com membranas fosfolipídicas carregadas negativamente, resultando em interação e formação de poros transmembranas (Lee *et al.*, 2011), penetração e lise bacteriana. Esse peptídeo é normalmente encontrado em locais de inflamação, liberando espécies reativas de oxigênio e α -defensinas dos neutrófilos (Zheng *et al.*, 2007) para a defesa primária contra bactérias, como é o caso da infecção pelo *M. leprae* e *M. tuberculosis* (Dürr, Sudheendra e Ramamoorthy, 2006; Kahlenberg, Michelle e Kaplan, 2013; Lyrio *et al.*, 2015; Yamshchikov *et al.*, 2010).

O peptídeo LL-37 despertou o interesse da comunidade científica porque, além de suas propriedades antimicrobianas, nas células epiteliais e linfócitos, ele estimulará a resposta celular do hospedeiro, resultando na liberação de citocinas, quimiocinas, e outras proteínas no sítio da inflamação, além de auxiliar na angiogênese (Grigat *et al.*, 2019; Joly *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 1998). Quanto às suas funções imunomoduladoras, a catelicidina aumenta a migração celular

através do estímulo de quimiocinas a monócitos, macrófagos, células *Natural Killer* (NK), células epiteliais da pele e linfócitos modulando a resposta de citocinas pró e anti-inflamatórias, como a produção de IFN do tipo-1 ou fazendo a regulação negativa da expressão de IL-12, IL-4, IFN- γ e, TNF- α (Kahlenberg, Michelle e Kaplan, 2013; Vandamme *et al.*, 2012).

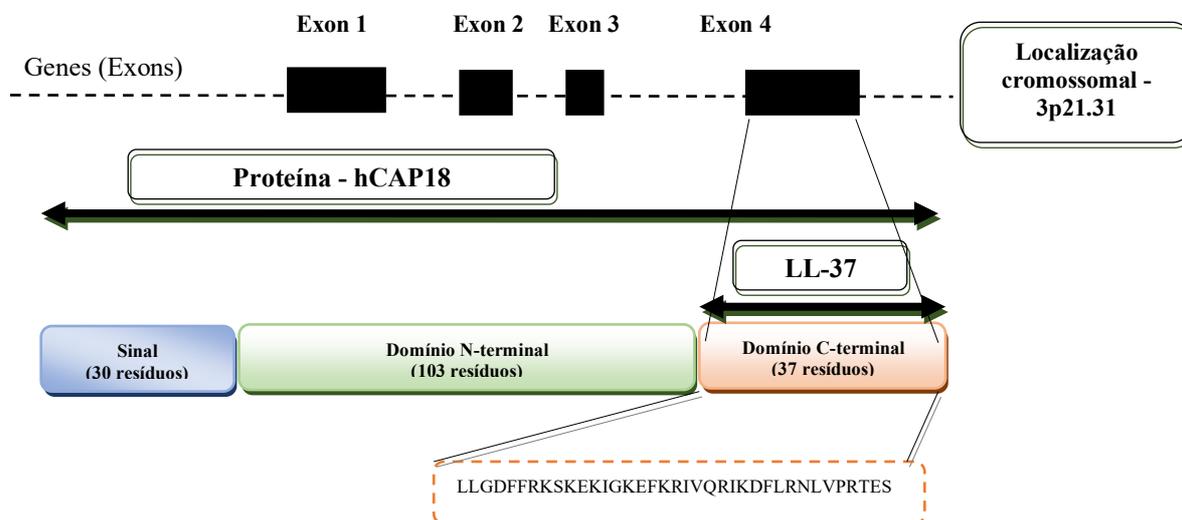


Figura 8. Localização cromossômica do gene do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP). Geração do peptídeo LL-37 após clivagem extracelular da proteína de 18-kDa (hCAP18) por serino-proteases.

Fonte: autoria própria.

Estudo realizado com população saudável norte-americana observou correlação positiva entre baixos níveis séricos de 25(OH)Vitamina D (<32ng/mL) e a concentração plasmática do gene de catelicidina hCAP18, sugerindo que a transcrição do gene de CAMP nessas pessoas poderia estar comprometida, uma vez que esse gene é regulado pela forma bioativa de VD, o 1,25(OH) 2 VD 3 e seu receptor de nuclear VDR (Dixon *et al.*, 2012).

Na infecção por *M. leprae*, existem evidências recentes que sugerem papel ativo da catelicidina na progressão da doença e acredita-se que esse peptídeo possa ajudar a monitorar o processo de resposta imune em pacientes com hanseníase, especialmente em condições de níveis reduzidos de vitamina D (Lyrio *et al.*, 2015; Matzner *et al.*, 2011; Teles *et al.*, 2013).

Neste contexto, estudo com amostras de lesões de pele de pessoas com hanseníase virchowiana revelou que monócitos infectados com *M. leprae* tinham níveis reduzidos de LL-37. Nesses pacientes, a expressão diferenciada do microRNA (hsa-mir-21) teria inibido a expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos dependentes de vitamina D, o CAMP e o DEFB4A (sigla do inglês, gene *beta-defensin 4A*) (Liu *et al.*, 2012).

No Iêmen, níveis séricos reduzidos de LL-37 foram observados em pacientes com hanseníase, porém, essa redução foi mais acentuada em pacientes não tratados quando comparados aos que já estavam em tratamento há mais de um ano. Além disso, os pacientes não tratados apresentaram correlação inversa entre os níveis séricos de vitamina D e LL-37 (Matzner *et al.*, 2011).

Nessa perspectiva, observou-se que o gene da catelicidina é expresso constitutivamente nos queratinócitos humanos normais, reforçando o conceito de que o queratinócito é fundamental não apenas como barreira mecânica, mas como local ativo da imunidade inata (Schröder, 2010). Essa condição parece ser propícia, especialmente para pessoas com hanseníase, uma vez que o acometimento cutâneo é sinal da infecção pelo *M. leprae*. Todas essas funções descritas anteriormente complementam o papel da catelicidina como antimicrobiano direto e ressaltam sua ação crucial no mecanismo imunológico de defesa contra o *M. leprae*.

Com base no exposto em relação à importância da vitamina D e de seu receptor, além do papel da catelicidina e das citocinas sobre a resposta imune do hospedeiro no cenário da infecção pelo *M. leprae*, foi proposto este trabalho que busca elucidar o comportamento e a interação destas moléculas antes e após seis meses de tratamento da hanseníase.

JUSTIFICATIVA

3 – JUSTIFICATIVA

A hanseníase é uma doença que prevalece como problema de saúde pública no Brasil, apesar de todos os esforços para sua eliminação no mundo (BRASIL, 2019a). Estima-se que, por ano, mais de 200 mil pessoas sejam infectadas, com altas taxas de prevalência geralmente associada a condições precárias de saúde e educação, especialmente nos países em desenvolvimento impactando negativamente na situação econômica do indivíduo e por conseguinte, do próprio país (OMS, 2017; WHO, 2019).

Diante do contexto nutricional de que as vitaminas e seus metabólitos são essenciais para um número de processos fisiológicos e bioquímicos, e de que a vitamina D influencia de maneira muito específica o prognóstico de diversas doenças, pois ao nível molecular é requerida para ativação de importantes vias imunológicas a partir da ligação ao receptor nuclear presente nas principais células do sistema imune (Maggini *et al.*, 2007; Mora, Iwata e Andrian, 2008; Wintergerst, Maggini e Hornig, 2007).

Além disso, quanto a influência direta dos padrões genéticos sobre as respostas imunológicas frente a infecção pelo *M. leprae* (Camargo *et al.*, 2018; Panda *et al.*, 2019; Pepineli *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2017), delineou-se essa pesquisa para a identificação das relações de causa e efeito entre os marcadores sorológicos moleculares, imunológicos e genéticos especialmente relacionados à expressão dos genes do VDR e de CAMP. Acredita-se que este estudo, ao investigar os contatos possa contribuir para o diagnóstico precoce e tratamento adequado; ao analisar pessoas recém diagnosticadas e após seis meses de tratamento possa monitorar os efeitos da PQT e suas consequências para a resposta imune frente ao bacilo e, assim sendo, sugerir estratégias profiláticas para acompanhar os pacientes de maior risco na hanseníase.

O monitoramento de genes que estão relacionados à resposta imune inata e adaptativa quer sejam em estudos de associação ou aqueles ligados a desfechos clínicos na hanseníase, como os genes estudados nesta tese, cujas vias estão interligadas e diretamente relacionadas à resposta inicial do hospedeiro frente à infecção pelo *M. leprae*, podem ser decisivos para o controle ou progressão severa da doença.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão dos genes do receptor da vitamina D (VDR) e do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) e sua relação com níveis séricos de vitamina D, catelicidina e citocinas em indivíduos saudáveis, pessoas com hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia (PQT) e de contatos atendidos em um Centro de Referência em Dermatologia Sanitária do estado de Minas Gerais.

4.2 Objetivos específicos

1. Investigar os níveis séricos de 25(OH)Vitamina D₃, do peptídeo antimicrobiano catelicidina e de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 de indivíduos saudáveis, pessoas com hanseníase antes e após seis meses de tratamento poliquimioterápico e, contatos de casos-índices de hanseníase;
2. Avaliar a expressão dos genes do receptor de vitamina D (VDR) e do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) de indivíduos saudáveis, pessoas com hanseníase antes e após seis meses de tratamento poliquimioterápico e, contatos de casos-índices de hanseníase;
3. Identificar e descrever as interações que envolvem expressão dos genes VDR e CAMP e os demais biomarcadores séricos, e demonstrar os efeitos dessas interações nos diagramas causais de análise de trilha para cada um dos grupos estudados.

5 – POPULAÇÃO E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo, local de coleta e processamento das amostras

Este é um estudo de natureza observacional, com abordagem quantitativa (descritiva e analítica), cujo delineamento do tipo caso-controle foi conduzido a partir da coleta de dados e amostras biológicas de indivíduos saudáveis (grupo controle), pessoas com hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia, e de contatos de casos-índice de hanseníase, atendidos no Ambulatório de Dermatologia Sanitária do Centro de Referência em Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais - FHEMIG.

Os experimentos que serão descritos foram realizados no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas e nos Laboratórios de Imunologia Clínica e de Toxicologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.2 Delineamento do estudo

5.2.1 Sujeitos da pesquisa e questões éticas

Neste estudo caso-controle, a população foi compreendida por pessoas com hanseníase virgens de tratamento e após seis meses de tratamento poliquimioterápico, na faixa etária de 18 a 65 anos, atendidos no Hospital Eduardo de Menezes – FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016, contatos de casos-índice de hanseníase e indivíduos controles.

O critério para seleção da amostra foi por conveniência, desde que após o diagnóstico clínico fosse confirmada a forma clínica da hanseníase pelo laudo do exame histopatológico e da baciloscopia. Pacientes imunossuprimidos, com outras doenças infecciosas ou autoimunes, com surto reacional no momento da coleta, recidiva ou interrupção do tratamento não foram incluídos nessa pesquisa. Para compor o grupo controle, foram selecionados indivíduos com bom estado geral de saúde e que não apresentavam sinais e sintomas clínicos da hanseníase, respeitando-se critérios de pareamento como faixa etária, sexo e etnia. Para o grupo de contatos, seguiu-se a determinação das diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública (BRASIL, 2016), cuja definição para contato domiciliar de hanseníase é toda e

qualquer pessoa que resida ou tenha residido com o doente de hanseníase, independentemente do tempo de convívio.

Este estudo foi realizado em concordância com as normas de pesquisas envolvendo seres humanos, contidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil, “Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos”. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG sob parecer CAAE n°. 14887414.0.0000.5149 para pessoas com hanseníase (**Anexo A**) e sob parecer CAAE n°. 54988016.0.0000.5149 para contatos de casos-índice de hanseníase (**Anexo B**). No **Anexo C** consta o Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Plataforma Brasil com a aprovação geral para desenvolvimento da pesquisa. Todos os indivíduos incluídos neste estudo participaram de forma voluntária e foram esclarecidos quanto aos objetivos e métodos do estudo. Após a leitura e a concordância em participar, foram incluídos na pesquisa os que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (**Anexo D e Anexo E**) em duas vias, ficando uma com o voluntário da pesquisa e outra com o pesquisador responsável.

5.2.2 Cálculo do tamanho da amostra

O Ambulatório de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes atende, em média 80 casos novos de hanseníase ao ano. Como este estudo é descritivo e analítico, para serem encontradas diferenças estatisticamente significativas, com resultados precisos e de validade para as inferências decorrentes das análises, foi realizado o cálculo amostral cujo objetivo principal é determinar a quantidade de elementos necessários para compor a amostra, a fim de se obterem resultados válidos, mas não mais do que o suficiente através de ferramentas estatísticas. Considerando-se os dados de artigos mais recentes sobre hipovitaminose D e expressão do gene do VDR em pessoas com hanseníase, considerando 10% a 20% de redução na expressão (Mandal *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2018), para um nível de confiança de 95%, e margem de erro de 5%, estimou-se pelo programa *OpenEpi* (versão 3.01), o tamanho da amostra de 25 indivíduos para os grupos a serem estudados (OpenEpi, 2006). No entanto, como na prática clínica, nem sempre é possível obter toda a amostra em função da livre demanda, recusa em participar da pesquisa e agendamentos do sistema de saúde, a opção foi por constituir uma amostra por conveniência.

5.2.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para formação dos grupos foram:

1. Indivíduos maiores de idade, na faixa etária de 18 a 65 anos.
2. Pessoas com hanseníase paucibacilar ou multibacilar, virgens de tratamento e após 6 meses de tratamento poliquimioterápico (PQT);
3. Indivíduos em boa condição de saúde e sem o diagnóstico de hanseníase para formação do grupo controle,
4. Contatos de casos-índices de hanseníase.

Os critérios de exclusão considerados para essa pesquisa foram:

1. Pessoas com hanseníase apresentando episódios reacionais no diagnóstico e após seis meses de poliquimioterapia, talidomida e/ ou corticoterapia (prednisona); em uso de imunoterapia, imunobiológicos e análogos que poderiam afetar a atividade do sistema imunológico.
2. Indivíduos portadores de outras doenças crônicas ou agudas com exceção da hanseníase, que pudessem alterar os parâmetros clínicos e imunológicos referentes às análises laboratoriais da pesquisa: diabetes, cardiopatias, pneumopatias, nefropatias, hepatopatias, doenças inflamatórias crônica de origem autoimune, doenças dermatológicas, infecções crônicas (Tuberculose, Leishmanioses visceral ou cutânea ou Doença de Chagas), infecções agudas (Dengue, Zika vírus, Chikungunya, Sarampo, Rubéola, Herpes Zóster dentre outras).

5.2.4 Variáveis sociodemográficas e clínicas analisadas nos grupos hanseníase, controle e contatos

Os principais dados gerais e clínicos coletados para essa pesquisa foram: gênero (feminino e masculino), idade (em anos), etnia (branco, negro, pardo, indígena), nível educacional (sem escolaridade, ensinos fundamental, médio, técnico e superior), a forma clínica segundo classificação de Ridley e Jopling (1966): Tuberculoide-Tuberculoide (TT), Dimorfo-Tuberculoide (DT), Dimorfo-Dimorfo (DD), Dimorfo-Virchowiano (DV), Virchowiano-Virchowiano (VV), classificação operacional: paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) fundamentada nos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), índice baciloscópio (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6), lesões de pele ≤ 5 ou > 5 lesões, grau de incapacidade física (0, 1 e 2), injúria de

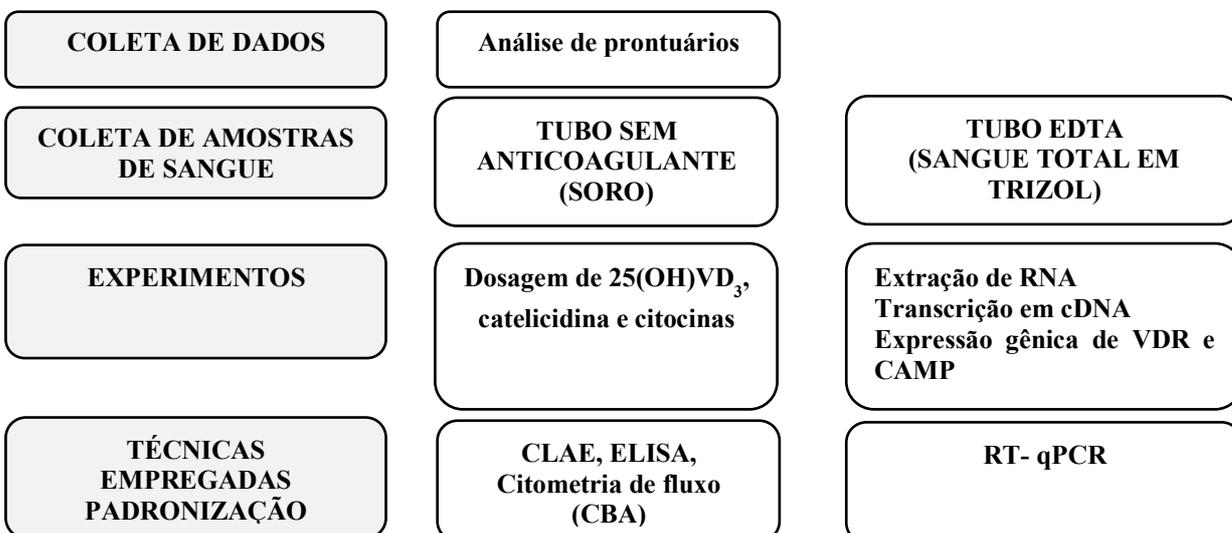
nervos (0, 1, 2, 3, 4 e 5), episódios reacionais (não, tipo 1 e tipo 2), terapia medicamentosa (PQT PB e PQT MB), e o desfecho da doença (cura, abandono do tratamento, não descrito no prontuário e recidiva), informações coletadas do prontuário do paciente em 2018.

5.2.5 Coleta de material biológico

Amostras de sangue periférico de pessoas com hanseníase antes (HANS Tzero) e após seis meses de PQT (HANS T6M), indivíduos saudáveis (Controles) e contatos de casos índices (Contatos) foram coletadas em tubos à vácuo com gel e ativador de coágulo e, em tubos *Vacutainer*® EDTA K2, contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (Vacuum II EDTA K3 a 15%) (Becton-Dickinson-BD, EUA). Os tubos com sangue, sem anticoagulante, foram centrifugados por 10 minutos a 1.500rpm, para a separação do soro e após a coleta armazenados em *ependorf* para posterior dosagem de vitamina D, peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) e de citocinas. Do tubo de sangue colhido em EDTA foram retiradas alíquotas e transferidas para tubos *ependorf* contendo volume igual de TRIZOL® (1:1) para posterior extração de RNA. Esses tubos foram imediatamente mantidos ao abrigo de luz e armazenados em freezer a -80°C, na FAFAR e no ICB/UFMG.

5.3 Métodos

A metodologia da pesquisa envolveu a coleta de dados sociodemográficos e de amostras de sangue dos participantes, que foram processadas para prosseguir com os experimentos como ilustrado no fluxograma abaixo.



Fluxograma de coleta de dados sociodemográficos e de amostras de sangue, os experimentos e técnicas empregados durante a pesquisa para obtenção dos resultados.

5.3.1 Dosagem sérica de 25(OH)Vitamina D (Colecalciferol)

Para as análises referentes à dosagem de 25(OH)VD₃, amostras de soro armazenadas em tubos tipo *eppendorf* da cor âmbar foram utilizadas na determinação pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, no inglês HPLC, *high liquid performance chromatography*) no cromatógrafo líquido de alta resolução da marca *Thermo*, modelo *Finnigan Surveyor*, com amostrador automático, (*Autosampler Plus*), bomba quaternária e detector (Plus UV- Visível), e coluna cromatográfica Purospher® STAR RP-18 *endcapped*, (5µm), LiChroCART® 150mm x 4,6mm, de fase reversa, (marca *Merck Millipore*), instalados no Laboratório de Toxicologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

A curva de calibração foi realizada em metanol (MeOH85, J.T.Baker®, Atlanta, GA), de acordo com metodologia previamente descrita na literatura (Hymøller e Jensen, 2011). Para tal foram preparadas cinco concentrações crescentes do padrão de 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D₃) (≥98% HPLC- Sigma Life Science®) de 15ng/mL a 95ng/mL, em triplicata. O procedimento baseou-se em adicionar diretamente no tubo de uso do amostrador automático, volumes diferentes das soluções correspondentes à mistura de 25(OH)D₃, do padrão interno 1-α-hidroxitamina D₃ (1α(OH)D₃)(≥97% HPLC - Sigma Aldrich®, Darmstadt, Germany) e MeOH85, para a obtenção das soluções padrão de trabalho. O volume de 50µL de cada uma das soluções padrão foi colocado no carrossel do cromatógrafo para iniciar o procedimento de curva padrão.

O preparo da amostra passou por dois processos, sendo o primeiro de saponificação e o segundo de extração. O primeiro foi com o intuito de quebrar as ligações ésteres presentes na matriz lipoproteica e isolar os metabólitos da vitamina D, e o segundo a fim de extrair os analitos desejados para a fase orgânica.

Em tubos Falcon de 50mL devidamente identificados foram adicionados 500µL de soro, ou da solução de 25(OH)D₃ em MeOH85 e adicionados 950µL de água tipo ultrapura (tipo 1), 50µL de MeOH85 e 250mL de solução padrão de uso 1α(OH)D₃ (200ng/mL). A saponificação foi realizada adicionando-se 500µL de MeOH85, 1000µL de ácido ascórbico 20% (Affymetrix, USBioAnalyzed, Ohio, USA) e 450µL de KOH 50% (Anidrol, São Paulo, Brasil). Os tubos Falcon foram colocados em banho-maria 80°C por 20 minutos e imediatamente resfriados em banho de gelo por aproximadamente 5 minutos.

A extração foi realizada após o banho de gelo, adicionando 5,0mL de heptano (AppliChem Panreac[®], Dublin, Ireland), em cada tubo Falcon, agitando por 2 minutos em agitador tipo *vortex* e centrifugando por 10 minutos a 1500rpm (Centrífuga de rotor para 4 tubos - Sigma, Osterode, Germany), em temperatura de 25°C. A parte superior, fase orgânica, foi recolhida e transferida para tubos de ensaio médio, limpos e secos. Repetiu-se o processo de extração com a mesma quantidade de heptano e novamente a parte superior foi recolhida padronizando um volume semelhante para todas as amostras. Os tubos de ensaio contendo a fase orgânica foram colocados em banho-maria à 40°C e evaporados em atmosfera de nitrogênio. Os extratos foram retomados com 85µL de MeOH85 e homogenizados por 1 minuto em agitador *vortex*. As soluções foram transferidas para os tubos de amostra e colocados no amostrador automático. O volume injetado no sistema de CLAE foi de 50µL, para cada solução.

A linearidade foi analisada por regressão linear obtida a partir da equação da reta e do coeficiente de determinação (R^2). Para a avaliação desse parâmetro foram construídas três curvas de calibração em MeOH85, nas concentrações de 15ng/mL, 35ng/mL, 55ng/mL, 75ng/mL e 95ng/mL para o metabólito da vitamina D₃, estabelecendo-se o coeficiente de determinação do metabólito $R^2 = 0,9954$ e a equação da reta de $y = 0,0371x - 0,1444$.

Para a análise dos resultados foram considerados os valores de referência adotados pelas Sociedades Brasileiras de Patologia Clínica e de Endocrinologia e Metabologia (SBPC/ML e SBEM), cujo posicionamento está pautado nas verificações de características clínicas individuais e a idade do indivíduo: valores acima de 20ng/mL são o desejável para população saudável (até 60 anos); valores entre 30 e 60ng/mL são o recomendado para grupos de risco como: idosos, gestantes, lactantes, pacientes com raquitismo/osteomalácia, osteoporose, pacientes com história de quedas e fraturas, causas secundárias de osteoporose (doenças e medicações), hiperparatireoidismo, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, doença renal crônica e síndromes de má absorção (clínicas ou pós-cirúrgicas); valores acima de 100ng/mL: risco de toxicidade e hipercalcemia (Ferreira *et al.*, 2018). Para as análises comparativas entre os grupos experimentais foram considerados válidos os valores entre 5 a 100ng/mL. Valores abaixo ou acima desse intervalo foram desconsiderados.

5.3.2 Determinação dos níveis séricos do peptídeo antimicrobiano catelicidina

As análises do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) foram realizadas no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia/UFMG. Os níveis séricos de CAMP foram determinados pelo ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA (do inglês

Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Esse método se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Nesse método, considera-se que o ELISA é indireto, pois um antígeno aderido a um suporte sólido é preparado para permitir a detecção de anticorpos específicos. Se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá a formação da ligação antígeno-anticorpos que posteriormente é detectada pela adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar anticorpos, a qual é ligada à peroxidase. Este anticorpo anti-IgG, ligado à enzima denomina-se conjugado. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima (isto é, H₂O₂ dissolvida em uma substância química) ocorre uma reação que pode ser observada pela mudança de cor, devido ao desdobramento da H₂O₂. Para essa técnica foi utilizado o kit *Cloud-Clone Corp.* (Houston, Texas, USA), contendo uma placa de 96 poços revestidos com anticorpos anti-CAMP.

Foram seguidas as instruções constantes no manual do fabricante considerando-se o limite de detecção de 47,4ng/mL e o coeficiente de variação inter-ensaios de <12%. A absorbância foi lida a 450nm usando o leitor de microplacas *SpectraMax Plus384* (Molecular Devices, EUA) e o *SoftMax Pro Software* para cálculo das concentrações em ng/mL. Os ensaios foram realizados em duplicata e as concentrações foram calculadas a partir de curva padrão com valor máximo de 10.000ng/mL (diluições 3x).

5.3.3 Avaliação do padrão de citocinas plasmáticas por citometria de fluxo - técnica de Cytometric Bead Array (CBA)

Os níveis séricos de citocinas foram avaliados usando o kit *LEGENDplex Human Th Cytokine Panel* (13-Plex) (BioLegend, San Diego, CA, EUA). As citocinas avaliadas e a concentração mínima detectável (CMD), em pg/mL estão apresentadas dentro do parênteses: IL-2 (1,3), IL-4 (1,1), IL-5 (1,3), IL-6 (1,1), IL-9 (1,2), IL-10 (0,9), IL-13 (1,1), IL-17A (1,8), IL-17F (1,3), IL-21 (2,3), IL-22 (2,2), IFN- γ (1,4) e TNF- α (0,9). A CMD é o limite teórico de detecção aplicando algoritmo de ajuste de curva de cinco pontos.

Essa técnica emprega mistura de esferas de poliestireno com intensidades de fluorescência variável, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas, permitindo a avaliação simultânea de diversas moléculas solúveis no mesmo ensaio, mesmo em pequenos volumes de amostra. Todos os reagentes foram mantidos à temperatura ambiente (20-25°C) e as amostras de soro centrifugadas a 1000xg por 10 minutos, posteriormente deu-se sequência aos passos sugeridos pelo fabricante iniciando com a pipetagem de 25 μ L de amostra para os respectivos poços segundo o grupo de estudo.

Para aquisição dos dados das amostras, foi utilizado o citômetro de fluxo *LSRFortessa X-20* que possui o *software BD FACSDiva®*. Após os ajustes de tamanho (FSC) e granulidade (SSC) para o posicionamento adequado das esferas de captura, procedeu-se o ajuste da intensidade de fluorescência em FL3 e a análise do deslocamento das esferas em função da intensidade de fluorescência em FL2 através de gráficos bidimensionais de FL2 versus FL3. Os valores correspondentes à intensidade média de fluorescência FL2 na escala logarítmica foram utilizados como a unidade de análise semiquantitativa para cada citocina avaliada e os valores obtidos foram expressos em intensidade média de fluorescência (MIF) e/ou picogramas por mililitro (pg/mL) através do programa *LEGENDplex Data Analysis 8.0*. Para cada tubo processado foram adquiridos no mínimo 8.000 eventos na região selecionada R1.

5.3.4 Extração de RNA de sangue total

Para o isolamento do RNA de sangue total foi utilizada a técnica de extração por TRIzol®, seguindo o protocolo do fabricante (Invitrogen Life Technologies, California, USA). Como no protocolo, a proporção de TRIzol para amostra era de 3:1, os volumes dos reagentes foram ajustados, uma vez que as amostras foram estocadas na proporção de 1:1. Sendo assim, após descongelada, a amostra foi homogeneizada por pipetagem para cima e para baixo várias vezes e centrifugada por 10 min a 12.000xg a 4 °C. O sobrenadante transparente foi transferido para novo tubo e sobre ele foram adicionados 200µL de clorofórmio para lise das células, procedendo à incubação por 2-3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se mais uma centrifugação a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi então separada e 500µL de isopropanol foram adicionados sob homogeneização, seguida por incubação à temperatura ambiente por 10 min. O próximo passo incluiu centrifugação a 12.000xg por 10 min, a 4 °C, com descarte do sobrenadante. O RNA total precipitou produzindo sedimento branco tipo gel no fundo do tubo, que foi lavado com 1mL de etanol a 75% e centrifugado a 7.500xg por 5 min a 4°C, e descarte do sobrenadante com micropipeta. O sedimento foi então seco e ressuspenso em 40µL de água ultrapura e incubado em banho-maria na temperatura variando de 55-60 °C por 10-15 minutos. Finalmente, as amostras foram armazenadas a -80°C para as etapas posteriores.

A qualidade e a quantificação da concentração do RNA extraído foi verificada nos seguintes aspectos: pureza da amostra (razão 260/280: entre 1,8 a 2,0) e integridade da amostra (razão 260/230 = entre 2,0 a 2,2). O valor quantificado de RNA na razão ng/µL foi obtido pelo espectrofotômetro NanoDrop® 2000/2000c da Thermo Scientific (EUA) selecionando um comprimento de onda de 260nm em que os ácidos nucleicos absorvem a luz.

Inicialmente, as superfícies superior e inferior ópticas do aparelho foram limpas com 1µL de água deionizada; em seguida, fechou-se a alavanca permitindo que o pedestal superior entrasse em contato com a água deionizada, seguido por limpeza com papel. No software NanoDrop®, selecionou-se o aplicativo ácido nucléico, calibrando o aparelho com pequena quantidade de água deionizada selecionando a função branco (*blank*). Após esse momento, realiza-se a mensuração do RNA (1,0µL de volume) na superfície ótica inferior, selecionando no *software* a função *Measure* e obtendo a concentração em ng/uL com registro em banco de dados para os procedimentos posteriores. O RNA foi submetido a uma etapa adicional de purificação e tratamento com TURBO® DNase (2U/µL), de acordo com o protocolo do fabricante Ambion® - ThermoFisher Scientific (USA). Para padronização, todos os volumes foram ajustados para 1000ng de RNA por amostra para utilização nas próximas etapas. O RNA purificado foi armazenado a -80°C.

Para confirmar a ausência de DNA genômico concomitante nas amostras de RNA, uma alíquota contendo 1µg de RNA total de cada extração foi submetida à reação de cadeia de polimerase convencional (PCR) em volume total de 20µL, durante 40 ciclos e com *primer* do gene de β-tubulina, utilizando como comparativo amostras humanas que sabidamente continham DNA genômico.

5.3.5 Síntese de DNA complementar utilizando a transcriptase reversa

O DNA complementar foi sintetizado a partir do RNA extraído do sangue total (1000 ng), utilizando um kit de transcrição reversa *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher Scientific - Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, EUA). Para cada amostra, foram empregados componentes na preparação do Mix para reação de transcrição reversa, utilizando assim para um total de 10µL foi preparada usando 2µL de 10xRT *buffer*, 0,8µL de 25X dNTPs *Mix*, 2µL de 10X *Random Primers* e 1µL de MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µL) e 4,2µL de nucleasse *free* RNA. Alíquotas de 10µL do master mix foram adicionados em cada tubo e adicionados o volume de 10µL de amostra de RNA pipetando delicadamente para homogeneizar e evitar a formação de bolhas que pudessem interferir na reação. Para padronização da concentração de RNA de cada amostra, 1000ng foram definidos para a reação de transcrição e os volumes ajustados até um volume final de 20µL. As amostras permaneceram no gelo até a transferência para o termociclador SimpliAmp® Applied biosystems (Thermo Fisher Scientific) para proceder a síntese de cDNA. As condições de ciclagem usadas para a promoção de transcrição reversa estão descritas a seguir: 1º. ciclo: 25°C por 10 min, 2º. ciclo:

37°C por 120min, 3°. ciclo: 85°C por 5 minutos, 4°. ciclo: 4°C para conclusão da reação. O produto resultante desta reação foi imediatamente armazenado a -20°C.

5.3.6 Verificação da síntese de cDNA – PCR convencional

Para verificação da síntese de cDNA das amostras dos grupos, realizou-se reação de PCR convencional, com *primers* que amplificassem um fragmento conhecido de DNA. Para tanto, procedeu-se a técnica utilizando dois *primers* de proteínas β -tubulina, que sabidamente amplifica DNA genômico (gDNA) e de β -2-microglobulina que somente amplifica DNA complementar (cDNA). Se as amostras amplificassem β -tubulina, possivelmente não poderiam ser utilizadas para fazermos a leitura em RT-qPCR, pois a expressão de mRNA dos genes alvos não estaria correta. O *Mix* da reação foi preparado utilizando 4 μ L de tampão GoTaq (5X), 2 μ L dNTP 10 mM, 0,5 μ L de *primer Forward* (0,25 μ M) + 0,5 μ L de *primer Reverse* (0,25 μ M), 0,25 μ L *Taq* Polimerase, 11,75 μ L de água ultra-pura, perfazendo um total de 19 μ L. Para o teste do cDNA fora acrescido 1 μ L (50ng/ μ L) de amostras de cDNA ao *Mix* preparado anteriormente em cada microtubo. As amostras foram colocadas no termociclador estabelecendo-se 6 ciclos com funções de tempo e temperatura, conforme se segue:

- 1° Ciclo com temperatura de 94°C e tempo de 5 minutos (desnaturação inicial);
- 2° Ciclo com temperatura de 94°C e tempo de 30 segundos (desnaturação);
- 3° Ciclo com temperatura de 60°C e tempo de 30 segundos (anelamento);
- 4° Ciclo com temperatura de 72°C e tempo de 30 segundos (extensão);
- Repetição por 35 vezes dos ciclos 2°, 3° e 4°;
- 5° Ciclo com temperatura de 72°C e tempo de 10 minutos (extensão final).

Concluído o processo, preparou-se as amostras para testar a qualidade da amplificação da molécula de DNA em gel de agarose a 2%.

5.3.7 Eletroforese de cDNA em gel de agarose a 2%

A eletroforese é um método que se utiliza de campo elétrico para a separação de moléculas conforme seu tamanho, forma ou carga. No caso do experimento, a eletroforese do cDNA é uma etapa realizada para se visualizar e analisar a qualidade da amplificação da molécula, empregando-se o gel de agarose a 2%, que é a matriz na qual é aplicada a amostra e que permite realizar a separação. O DNA apresenta carga negativa e migra em direção ao polo

positivo (ânodo) e assim, nota-se no gel de agarose, os fragmentos de DNA que se pretende separar, migrando para o polo positivo. A separação é visualizada correndo-se em uma das canaletas do gel, um padrão de corrida de 50pb ou 100pb.

A Agarose é um polissacarídeo neutro extraído da parede celular de determinadas algas e sua estrutura química possibilita a formação de gel altamente resistente, mesmo em baixas concentrações. O gel possui estrutura macrorreticular (com aspecto de rede, formando malhas), que pode ser ajustada simplesmente pela variação da concentração de agarose (quanto mais alta a concentração, menor o tamanho dos poros). Isso permite a passagem das moléculas, atuando como peneiras moleculares, e fornece as condições ideais para a realização da eletroforese. Adicionou-se 2g de agarose à solução tampão TBE 1X, com aquecimento em micro-ondas para completa dissolução do gel e esfriamento para posterior preparo do suporte do gel selando as laterais para evitar o seu extravasamento. Após resfriamento parcial acrescentou-se 2,5µL brometo de etídio homogeneizando levemente e adicionando o gel no suporte suavemente para evitar a formação de bolhas. Um pente com o número de canaletas de acordo com as amostras a serem verificadas foi inserido no gel aguardando a solidificação. Transferiu-se o suporte com o gel na cuba de eletroforese e adicionou-se o tampão TBE 1X até cobertura total até 1mm acima. Aplicou-se cada amostra de cDNA nas canaletas formadas no gel, reservando 2 poços para utilização de um padrão de corrida de 50pb ou 100pb.

5.3.8 Padronização da técnica de RT-qPCR para análise da expressão dos genes de VDR e CAMP em sangue total humano

5.3.8.1 Otimização de primers

Para fins de análise da expressão gênica do receptor da vitamina D (VDR) e do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) foram utilizadas as instalações no laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foi feito por pesquisadores experientes do laboratório, observando os critérios de tamanho do *amplicon*, temperatura de anelamento, conteúdo e posição de guanina/citosina (G/C: 45-55%), repetições de base única, complementaridade da ligação *primer*-molde para evitar grampos de interações intra-moleculares ou de auto- ou cross-dímeros, de forma que a especificidade e a eficiência fossem adequadas ao propósito das análises. Além disso, os primers utilizados foram desenhados em

junções exon-exon dos genes avaliados, para garantir a amplificação apenas de cDNA. Para evitar amplificação não específica, além da temperatura e comprimento ideal dos *primers*, realizamos o “BLAST – *Basic local alignment search tool*” dos iniciadores contra o banco de dados NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) de sequência não-redundante para evitar desenhar *primers* que pudessem amplificar regiões inespecíficas.

Como não há na literatura um gene de referência ou gene constitutivo que responda de forma universal para todas as amostras humanas, foram desenhados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e avaliados quanto à integridade (<http://www.idtdna.com/calc/analyze/>) frente às amostras, os seguintes *primers*: NM_001101.4 - *Homo sapiens actin beta* (ACTB), mRNA; NM_000194.2 - *Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* (HPRT1), mRNA; NM_001069.2 - *Homo sapiens tubulin beta 2A class IIa* (TUBB2A), mRNA; NM_000994.3 - *Homo sapiens ribosomal protein L32* (RPL32), mRNA; NM_001256799.2 - *Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), mRNA; e NM_004048.2 - *Homo sapiens beta-2-microglobulin* (B2M), mRNA.

A partir dos resultados dos testes de eficiência, os *primers* utilizados no RT-qPCR foram: receptor de 1,25-di-hidroxivitamina D3 (VDR - XM_006719587.3) *Forward*: 5'-CTTCCCTGCCTGACCCTGGAGACTTT-3' e *Reverse*: 5'-AATAGTGCCTTCCGCTTCATGCTTCGGTCTG-3' (151pb); Peptídeo antimicrobiano de catelicidina (CAMP - NM_004345.4) *Forward*: 5'-CC0AGGTCCTCAGCTACAAG-3' e *Reverse*: 5'-GTCTGGGTCCCCATCCATCG-3' (128pb); β -2-microglobulina (B2M - NM_004048.2) *Forward*: 5'-CACTGAATTCACCCCACTGA-3'; e *Reverse*: 5'-CTGCTTACATGTCTCGATCCCA-3' (104pb). Os *primers* foram avaliados por RT-qPCR, para verificar a contaminação por DNA genômico. Os valores do ciclo de quantificação (Cq) para os genes alvos foram determinados e comparados com o gene de referência β -2-microglobulina (β 2M). A análise da curva de *melting* foi realizada para determinar a integridade da amplificação e descartar a formação de dímero de *primer*. A porcentagem de eficiência dos *primers* das curvas padrão foi determinada na ordem de 97,5% para β 2M, 103,1% para VDR e 93,2% para CAMP, não ultrapassando 10% de variação entre eles. Os demais genes constitutivos testados não responderam com porcentagens de eficiência que pudessem ser utilizados na comparação aos genes alvos.

Para a otimização e validação dos *primers* dos genes alvo, foram realizados testes com concentração fixa dos iniciadores (2mM) e a concentração de cDNA foi variável (80ng, 40ng, 20ng, 10ng e 5ng). Após a corrida, foram analisadas as curvas-padrão, os valores de *slope* e de R^2 , para posteriormente calcular a eficiência de cada par de *primer*. Verificou-se desempenho satisfatório do *primer* para VDR e de CAMP na avaliação de amostras de cDNA na

concentração de 20ng. A β -2-microglobulina foi escolhida como gene de referência por apresentar eficiência de amplificação semelhante aos iniciadores VDR e CAMP.

A RT-qPCR foi preparada em volume final de 10 μ L, sendo 1 μ L dos *primers* (*Forward* 2mM + *Reverse* 2mM), 5 μ L de SYBR Green PCR Mastermix e 4 μ L de cDNA (5ng/ μ L) das amostras testadas. Para amplificação, os seguintes parâmetros foram utilizados: desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, anelamento por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15seg e extensão de 60°C por 1min. A análise quantitativa foi realizada em placa de 96 poços em sistema de PCR em tempo real de 7500 (Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, EUA) e seu desempenho, interpretação e nomenclatura estão de acordo com as diretrizes do *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments – MIQE* (Bustin *et al.*, 2009). Ao final de cada reação foram analisadas as curvas de dissociação para cada par de primer, e apenas um pico foi observado. Para a otimização da reação foram testadas diversas concentrações de *primers* (1mM, 2mM e 4mM), mantendo-se fixa a concentração de cDNA (20ng). A concentração ideal dos *primers* foi determinada avaliando a curva de amplificação, e foi escolhida a menor concentração de iniciador que permitiu a máxima amplificação (2mM).

Para cada amostra, os valores de ciclo de quantificação de VDR e CAMP foram normalizados usando a fórmula $\Delta C=Cq_{VDR}$ ou $CAMP - Cq_{\beta 2M}$. Para determinar os níveis de expressão relativa, foi utilizada a seguinte fórmula: $\Delta\Delta Cq = amostra \Delta Cq(1) - calibrador \Delta Cq(1)$, sendo o grupo controle saudável usado como calibrador. O valor usado para plotar a expressão relativa de VDR ou CAMP foi calculado usando o método $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$ (Livak e Schmittgen, 2001; Schmittgen e Livak, 2008). Os valores foram expressos no gráfico com escala logarítmica na base 10, para melhor visualização da comparação entre os grupos estudados.

5.4 Análises estatísticas

Os dados quantitativos foram analisados utilizando o *software GraphPad Prism versão 7.0* (San Diego, CA, EUA). Os grupos estudados perfizeram um total de 77 indivíduos, que foram distribuídos da forma que se segue: Hanseníase (n=34) [PB (n= 14), MB (n=20)], Controles (n=18) e Contatos (n= 25). Inicialmente, o teste *Shapiro-Wilk* foi utilizado para verificar a normalidade dos conjuntos de dados (indicado para pequenas amostras) e a análise de *outliers* pelo método *ROUT* (*Robust Regression and Outlier Removal*).

Quando a normalidade foi confirmada, os dados foram analisados por *ANOVA One-Way* e o teste *post-hoc* de Tukey para comparar médias entre dois ou mais grupos. Para os dados não-paramétricos utilizou-se os testes de comparação múltipla de Kruskal-Wallis e o teste *post-hoc*

de Dunn, adotando-se o nível de significância de $p < 0,05$ para as interpretações dos resultados que seriam obtidos.

Na análise multivariada, utilizou-se matriz de correlação de *Pearson* para encontrar as principais relações entre as variáveis básicas (y) (expressão de mRNA dos genes VDR ou CAMP) e as explicativas (x_1, x_2, x_3, x_n) (níveis séricos de 25(OH)D₃, catelicidina e das citocinas), existentes, nos tempos antes e após seis meses de PQT, para os indivíduos controle, pessoas com hanseníase e contatos. Ao se estabelecer os coeficientes de correlação linear de *Pearson* e a existência entre as variáveis analisadas nos dois tempos avaliados, ainda não se podia afirmar sobre a relação causa e efeito nem sobre a interferência de outras variáveis que também se relacionavam com a mesma variável básica pois a correlação analisada de forma isolada apenas discrimina sentido e magnitude da relação entre as duas variáveis.

As análises cujo nível de significância foi menor que 5% ($p < 0,05$) e os valores do coeficiente de correlação (r) maiores que 0,70, foram selecionadas para avaliação da relação causal entre as variáveis básicas (y) e as explicativas (x_1, x_2, x_3, x_n), pela análise de trilha (*Path Analysis*) através do modelo de regressão linear múltipla, desenvolvida por Wright (1921). Os cálculos dos coeficientes de correlação simples e parcial foram estabelecidos com uso do programa estatístico *GENES* (Aplicativo computacional em estatística aplicada à genética) (Cruz, 2013).

Para o diagnóstico de multicolinearidade (interferência de uma terceira variável no coeficiente de correlação linear simples que envolve apenas duas), que pode ocorrer em análises estatísticas cuja correlação entre duas variáveis independentes é alta, utilizou-se o programa estatístico *GENES*. Essa interferência pode ser identificada pela análise da matriz de correlação, dos fatores de inflação da variância (VIF) e da análise de autovalores e autovetores da matriz de correlação daquelas variáveis selecionadas nessa pesquisa. Quanto aos fatores de VIF, eles representam o quanto da variância do coeficiente de correlação está inflacionada quando comparada ao que seria se a variável não estivesse correlacionada com nenhuma outra variável. Assim conforme (Neter *et al.*, 1996), se houver qualquer $VIF > 10$ há indícios de multicolinearidade, que precisa ser corrigida, obtendo-se pelo método da regressão em crista, uma constante k no intervalo $0 < k < 1$.

Na análise de trilha e demais estatísticas multivariadas extraídas do modelo de regressão linear múltipla, busca-se explicar a ocorrência do desfecho (y) por meio do relacionamento entre variáveis independentes (x_1, x_2, x_3, x_n), atribuindo fatores de ponderação (peso) para cada uma das variáveis, visto que, esses são representados pelos coeficientes de regressão angular (b_1, b_2, b_3, b_4) observados na fórmula: $y = a + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_4 x_4 + e$, em que a letra a representa o coeficiente de regressão linear, b o coeficiente de regressão angular, e e representa todas

aquelas variáveis não englobadas no modelo, mas que atuam no desfecho, isto é, o *erro* consiste naqueles valores que o pesquisador não consegue prever no modelo de previsão (Fontelles, 2012).

Se o pesquisador almeja encontrar uma potencial relação de causa e efeito entre um conjunto de variáveis, deve-se implementar o estudo da análise de trilha, no entanto é necessário associar esse método com os achados na literatura específica, buscando informações sobre as inter-relações entre as variáveis pesquisadas.

Quanto às representações visuais da análise de trilha, são necessárias a formulação de uma tabela identificando os principais elementos da relação entre as variáveis e do diagrama de trilha (diagrama causal). A tabela deve conter elementos importantes para interpretação da análise de trilha, tais como:

1. A identificação das variáveis independentes (x_1, x_2, x_n) que se relacionam com a variável básica (y);
2. As vias de associação, identificando os efeitos diretos (relação da variável independente com a variável básica sem interferência das demais variáveis) e indiretos (efeito relacional entre determinada variável denominada x_1 , por exemplo, passando pela interferência de outra variável independente, x_2 , e influenciando a variável dependente y);
3. Os estimadores, que são combinações de letras e números, representam os coeficientes de trilha na qual (p_{yx1}), por exemplo, identifica o efeito direto da variável x_1 sobre y ; já a representação ($p_{yx2} r_{x1x2}$) corresponde ao efeito indireto da variável independente x_1 sobre a variável básica y passando pela via de influência de uma segunda variável independente, x_2 , conforme exemplo. Assim para obter a estimativa do efeito indireto multiplica-se o valor do efeito direto (p_{yx2}) pelo pela correlação de interesse (r_{x1x2}) (Alwin e Hauser, 1975).
4. As estimativas são representações numéricas (coeficientes de trilha) obtidos por meio da resolução de sistemas lineares de equações normais quando se calcula o efeito direto ou seu resultado pode ser o efeito indireto (McDonald, 1996).

O diagrama causal permite demonstrar, por meio de estimativas e estimadores, os efeitos direto e indireto das variáveis independentes sobre a variável dependente, além do efeito residual, também sobre a variável dependente, estabelecendo de maneira clara a relação entre as variáveis. A representação das setas presentes no diagrama de trilha, bem como o valor que acompanha cada uma delas, deverá ser interpretado da seguinte maneira:

1. Setas unidirecionais (\rightarrow) e seus respectivos valores direcionados à variável básica (0) são o efeito direto da variável independente sobre a variável dependente;

2. Setas bidirecionais (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam a correlação entre duas variáveis independentes;
3. A combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\rightarrow , \leftrightarrow), isto é, o produto de seus valores, indica o efeito indireto de uma determinada variável independente atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, dependente (0).

A interpretação da análise trilha segue os critérios de (Singh e Caudhary, 1979):

1. A variável explicativa (x) influencia a variável básica (y) apenas indiretamente, com valor causal apenas no conjunto, se o efeito direto em módulo ($|p_{yx}|$) da variável (x) for menor que o efeito residual ($p\varepsilon$) que por sua vez é menor que o efeito total (efeito da correlação r_{yx}) resumido por $|p_{yx}| < p\varepsilon < r_{yx}$;
2. Ou a variável explicativa (x) pode influenciar a variável básica (y) inferindo relação causal, se o efeito direto em módulo da variável (x) for maior que o efeito residual ($p\varepsilon$) estabelecido por $|p_{yx}| > p\varepsilon$.

O cálculo estatístico da análise de trilha com estimadores e estimativas dos coeficientes e das representações gráficas (diagramas de trilha) foram processados empregando-se o programa *GENES (Software for Experimental Statistics in Genetics)* (Cruz, 2013).

6. RESULTADOS

PARTE I. Caracterização geral e clínica dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.

A população deste estudo foi constituída por 77 indivíduos, compreendida pelos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de tratamento e contatos de casos-índices. Em sua maioria, 44 (57%) eram do sexo masculino, 67 (87%) tinham idade variando entre 18 e 60 anos, 54 (70%) se declararam afrodescendentes e 38 (49%) cursaram pelo menos o ensino médio, como exposto na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características gerais de indivíduos controles, pessoas com hanseníase e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.

Características	Hanseníase		Controles	Contatos
	PB	MB		
Gênero				
Masculino (57,1%)	10 (71,4)	11 (55,0)	15 (75,0)	8 (32,0)
Feminino (42,9%)	4 (28,6)	9 (45,0)	3 (25,0)	17 (68,0)
Total: 77	14	20	18	25
Média de idade em anos (média ± desvio padrão)	49,21±12,35		30,3±10,5	32±12,15
Faixa Etária				
18 a 60 anos	27 (79,4)		18 (100)	23 (92,0)
> 60 anos	7 (20,6)		-	2 (8,0)
Etnia				
Branco	8 (23,5)		6 (33,4)	8 (32,0)
Negro	5 (14,7)		8 (44,4)	5 (20,0)
Pardo	20 (58,8)		4 (22,2)	12 (48,0)
Indígena	1 (3,0)		-	-
Escolaridade				
Sem escolaridade	1 (2,9)		-	1 (4,0)
Ensino Fundamental	26 (76,5)		2 (11,2)	9 (36,0)
Ensino Médio	5 (14,8)		4 (22,3)	9 (36,0)
Ensino Técnico	1 (2,9)		5 (27,8)	3 (12,0)
Ensino Superior	1 (2,9)		7 (38,9)	3 (12,0)
Total	34		38	25

Fonte: Dados da pesquisa

Considerando as características clínicas da doença (**Tabela 2**), 6 (17,6%) pessoas com hanseníase foram classificadas como TT, 8 (23,5%) DT, 10 (29,4%) DD, 4 (11,8%) DV e 6

(17,6%) VV; 24 (70,6%) dos pacientes apresentaram resultados negativos para o teste ML-Flow; 24 (70,6%) apresentaram índice baciloscópico (IB) zero; 20 (58,8%) apresentavam menos de cinco lesões de pele; 21 (61,8%) pacientes não apresentaram comprometimento neural; 24 (70,6%) não apresentavam deficiência física; e cerca de 47% dos pacientes desenvolveram episódios reacionais tanto do tipo 1 como do tipo 2. Embora 14 (41,2%) pessoas tenham sido classificadas como PB, o esquema terapêutico adotado para tratamento para grande parte deles, 30 (88,2%) incluía rifampicina, dapsona e clofazimina ou outro regime substitutivo. Os outros quatro pacientes PB foram tratados segundo preconizado pelo MS, com rifampicina e dapsona. Em relação ao desfecho da doença, segundo dados coletados no prontuário do paciente no ano de 2018, 25 (73,5%) do total de indivíduos tiveram alta por cura.

Tabela 2. Características clínicas das pessoas com hanseníase atendidas no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.

Hanseníase (n= 34)			
(PB: 14; MB: 20)			
Formas clínicas	n (%)	Grau de Incapacidade	n (%)
Tuberculoide-Tuberculoide	6 (17,7)	0	24 (70,6)
Dimorfo-Tuberculoide	8 (23,5)	1	5 (14,7)
Dimorfo- Dimorfo	10 (29,4)	2	5 (14,7)
Dimorfo -Virchowiano	4 (11,7)	Injúria de nervos	
Virchowiano - Virchowiano	6 (17,7)	0	21 (61,7)
ML-Flow	n (%)	1	5 (14,7)
Negativo	24 (70,6)	2	3 (8,9)
Positivo	10 (29,4)	3	2 (5,9)
		5	3 (8,9)
Índice Baciloscópico	n (%)	Episódios reacionais	
0	24 (70,6)	Não	18 (52,9)
1 a 2	1 (2,9)	Tipo 1	13 (38,2)
>2 a 3	2 (5,9)	Tipo 2	3 (8,9)
>3 a 4	3 (8,9)		
>4	4 (11,7)		
Lesões de pele	n (%)	Poliqimioterapia	
≤ 5	20 (58,8)	PQT PB (rifampicina/dapsona)	4 (11,7)
> 5	14 (41,2)	PQT MB (rifampicina/dapsona/ clofazimina)	30 (88,3)

Fonte: Dados da pesquisa

PARTE II – Correlação entre níveis séricos de 25(OH)Vitamina D₃ (VD₃) e de catelicidina dos indivíduos dos grupos controles hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.

Os resultados em mediana e intervalos interquartis dos níveis séricos de Vitamina D₃ foram de 12,83 ng/dL (Q1=9,27-Q3=54,37 ng/dL) e 15,94 ng/dL (Q1=13,67-Q3=42,74 ng/dL) nos grupos de pessoas com hanseníase antes e após seis meses de tratamento, respectivamente. A deficiência de VD₃ (≤ 20 ng/dL) foi observada para 67,1% dos indivíduos estudados e, os grupos controle (10,97 ng/dL; Q1 = 8,40-Q3 = 19,04 ng/dL) e contatos (9,65 ng/dL; Q1 = 6,87-Q3 = 47,78 ng/dL) apresentaram os mais baixos níveis séricos de VD₃ em relação aos pacientes com hanseníase, porém, sem diferença estatística significativa (**Tabela 3**).

Tabela 3. Níveis séricos de 25(OH)Vitamina D₃ de indivíduos controles, pessoas com hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.

Níveis séricos de 25(OH)VD ₃	Mediana (ng/dL) (Q1-Q3)	Deficiência (<20ng/dL) n (%)	Insuficiência (20-30ng/dL) n (%)	Suficiência (>30ng/dL) n (%)	Total
Controles	10,97 (8,40-19,04)	12 (80,0)	-	3 (20,0)	15
Contatos	9,65 (6,87-47,78)	15 (71,4)	-	6 (28,6)	21
Hanseníase antes do tratamento	12,83 (9,27-54,37)	8 (53,3)	-	7 (46,7)	15
Hanseníase após 6 meses de tratamento	15,94 (13,67-42,74)	12 (63,1)	1 (5,3)	6 (31,6)	19
Total		47	1	22	70

Fonte: Dados da pesquisa.

Quanto aos aspectos nutricionais, 14 (41,2%) pacientes utilizaram algum tipo de suplementação nutricional, sendo que, 8 deles (23,5%) receberam associação de carbonato de cálcio com vitamina D e, 6 (17,6%) fizeram uso de compostos contendo ferro, vitamina B12 ou outras composições de vitaminas e minerais não especificadas nos respectivos prontuários. Quanto à exposição solar ao trabalho, 11 pacientes (32,4%) tinham a informação em prontuário de alguma profissão cujas atividades incluíam alguma forma de exposição ao ar livre por pelo menos parte do dia (**Tabela 4**).

Tabela 4. Aspectos nutricionais relacionados à suplementação nutricional, fórmula de suplementação e a exposição solar no trabalho de pessoas com hanseníase atendidas no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.

Suplementação Nutricional	n (%)
Não	20 (58,8)
Sim	14 (41,2)
Fórmula de suplementação	
Não	20 (58,8)
Carbonato de Cálcio + Vitamina D	8 (23,5)
Outros (Ferro, Vitamina B12 e outras composições)	6 (17,7)
Exposição solar no trabalho	
Não informada	2 (5,9)
Sim	11 (32,4)
Não	21 (61,7)
Total	34

Fonte: Dados da pesquisa

Para caracterizar os níveis séricos de 25(OH)Vitamina D₃, o **Gráfico 1A** ilustra os resultados de mediana com o intervalo interquartil para todos os grupos (n=70). A maior parte dos indivíduos apresentava *status* de vitamina D <20 ng/dL. A concentração sérica de catelicidina foi avaliada por ELISA (n = 47). Os resultados dos níveis séricos de catelicidina demonstraram uma redução significativa em pacientes com hanseníase antes (HANS T0) e após seis meses de PQT (HANS T6), em comparação com controles e contatos (**Gráfico 1B**), não se observando diferença estatística significativa entre os grupos de pessoas com hanseníase independente do tempo de tratamento. Contudo, observa-se correlação fortemente significativa entre níveis mais baixos de VD₃ e níveis mais baixos de catelicidina (**Gráfico 1C**) para o grupo de pacientes não tratados (r= 0,86, p= 0,0003), bem como, para o grupo de pacientes após seis meses de tratamento (r= 0,79; p= 0,002).

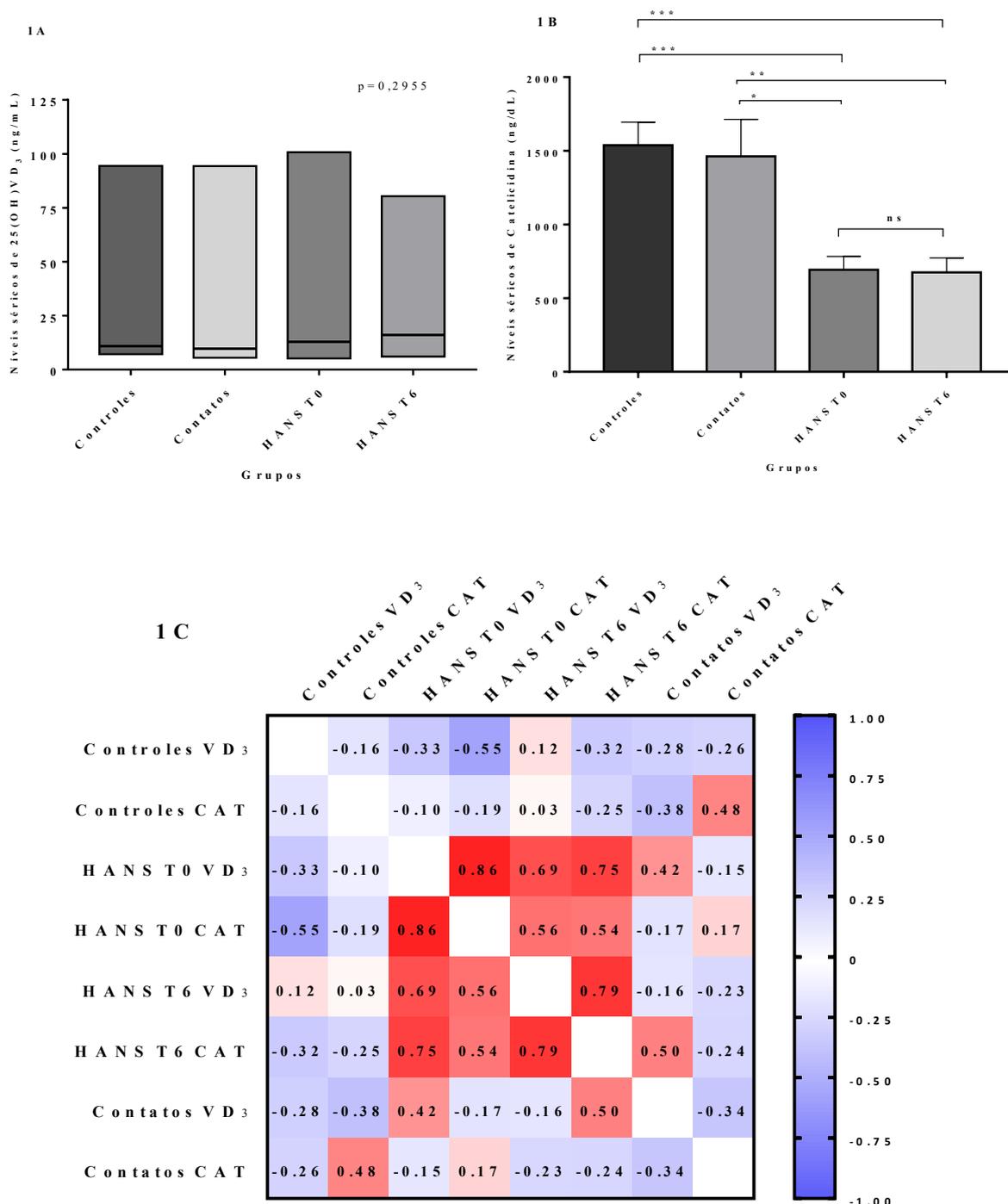


Gráfico 1. Correlação entre os níveis séricos de 25(OH)Vitamina D₃ (VD₃) e de catelicidina dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016. (A) Níveis circulantes de VD₃ foram monitorados por CLAE em controles (n= 15), contatos (n= 21) e pacientes com hanseníase recém-diagnosticados (n= 15) e pós-seis meses de PQT (n= 19). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos estudados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). (B) Níveis séricos de Catelicidina em pacientes com hanseníase antes ($692,5 \pm 90,38$ ng/dL) e após seis meses de tratamento ($675,2 \pm 98,39$ ng/dL), indivíduos controles ($1539 \pm 155,2$ ng/dL) e contatos ($1462 \pm 250,8$ ng/dL). Os dados são médias \pm DP de n = 16, 8, 11, 12, como apresentado no gráfico, respectivamente. Os níveis de catelicidina foram

significativamente reduzidos nos pacientes com hanseníase T0 e T6 quando comparados aos controles (T0: $p = 0,0008$; T6: $p = 0,0004$) ou aos contatos (T0: $p = 0,0131$; T6: $p = 0,0092$) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). **(C) O heatmap apresenta a correlação entre os níveis séricos de VD₃ e catelicidina para os grupos.** As concentrações séricas de vitamina D se correlacionaram fortemente ($r > 0,70$) com os níveis séricos de catelicidina (intensidade de cor vermelha) em pacientes com hanseníase antes ($r = 0,86$; $p = 0,0003$) e após seis meses de tratamento ($r = 0,79$; $p = 0,002$). O gradiente de cor avermelhado indica o aumento das correlações fortes e o gradiente de coloração azul demonstram as correlações fracas entre as variáveis. Os números incluídos nas células são os coeficientes de correlação de *Pearson* (r). As diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) foram representadas por * na comparação entre os grupos, nos quais * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns: não significativo. Controle: controle saudável; Contatos: contatos; HANS T0: pacientes com hanseníase não tratados; HANS T6: após seis meses de PQT; VD₃: níveis séricos de 25(OH) vitamina D₃; CAT: níveis séricos de catelicidina.

PARTE III – Expressão dos genes do receptor de vitamina D (VDR) e do peptídeo antimicrobiano catelicidina (CAMP) dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.

A técnica da reação da transcriptase reversa quantitativa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada na detecção da quantificação relativa da expressão dos genes VDR e CAMP. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold* ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge dado limiar, o que permite a análise quantitativa da expressão dos genes VDR e CAMP. Os quadros com os resultados de Ct (*cycle threshold*), ΔCt , $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e Log_{10} , obtidos pela expressão gênica relativa de VDR e CAMP em RT-qPCR, para cada um dos grupos avaliados, estão apresentados no **Apêndice 1**.

A expressão do VDR foi significativamente menor no grupo de pacientes com hanseníase PB não tratados (HANS T0), após seis meses de PQT (HANS T6) e contatos, em comparação ao grupo Controle (HANS PBT0 e Controles, $p < 0,0001$; $\text{Log}_{10} < -2$; HANS PBT6 e Controle, $p < 0,0001$, $\text{Log}_{10} < -2$; Contatos e Controles, $p < 0,0001$, $\text{Log}_{10} \cong -2$) (**Gráfico 2A**). Comparativamente, para esses grupos, a expressão gênica de VDR mostrou-se duas vezes menor em relação ao grupo de indivíduos controle. Além disso, quando foi comparada a expressão de VDR para pacientes MB, foram observadas diferenças estatísticas significativas entre HANS MBT0 e Contatos ($p = 0,0270$); HANS MBT6 e Contatos ($p = 0,0106$); mas não em comparação ao grupo PB. Quando a comparação foi realizada entre os tempos de tratamento para cada grupo operacional, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos HANS PBT0 e HANS PBT6, ou HANS MBT0 e HANS MBT6 ($p > 0,05$), entretanto, os valores mais baixos da

expressão gênica estavam no grupo PB, independentemente do tempo de tratamento (redução entre de duas vezes a três vezes). Diferentemente, os valores mais altos de expressão foram observados no grupo MB em comparação ao PB (HANS PBT0 e HANS MBT0, $p= 0,0024$); e significância estatística limítrofe entre PBT6 e MBT6 ($p= 0,0543$), ainda assim, inferiores aos valores observados para o grupo controle.

Em seguida, quando a expressão gênica de CAMP foi comparada entre os grupos Controles, Contatos e hanseníase antes e após seis meses de PQT, foram observados resultados significativamente mais baixos nos grupos hanseníase, mantendo-se a redução de expressão variando entre uma a duas vezes para os mesmos ou Contatos em comparação ao Controles: HANS PB T0 e Controles ($p < 0,0001$); HANS PB T6 e Controles ($p = 0,0149$); HANS MB T0 e Controles ($p = 0,0013$); Contatos e Controles ($p < 0,0001$) (**Gráfico 2B**). Embora não tenha sido observada diferença estatística significativa entre PB ou MB nos tempos estudados, houve uma tendência de aumento da expressão do gene de CAMP após seis meses de PQT em ambos os grupos, e mais intensamente para MB. Contudo, uma condição verificada para o grupo de Contatos foi que a expressão gênica de CAMP era proporcionalmente semelhante ao grupo hanseníase antes do tratamento, entre duas a três vezes menor que o grupo Controle.

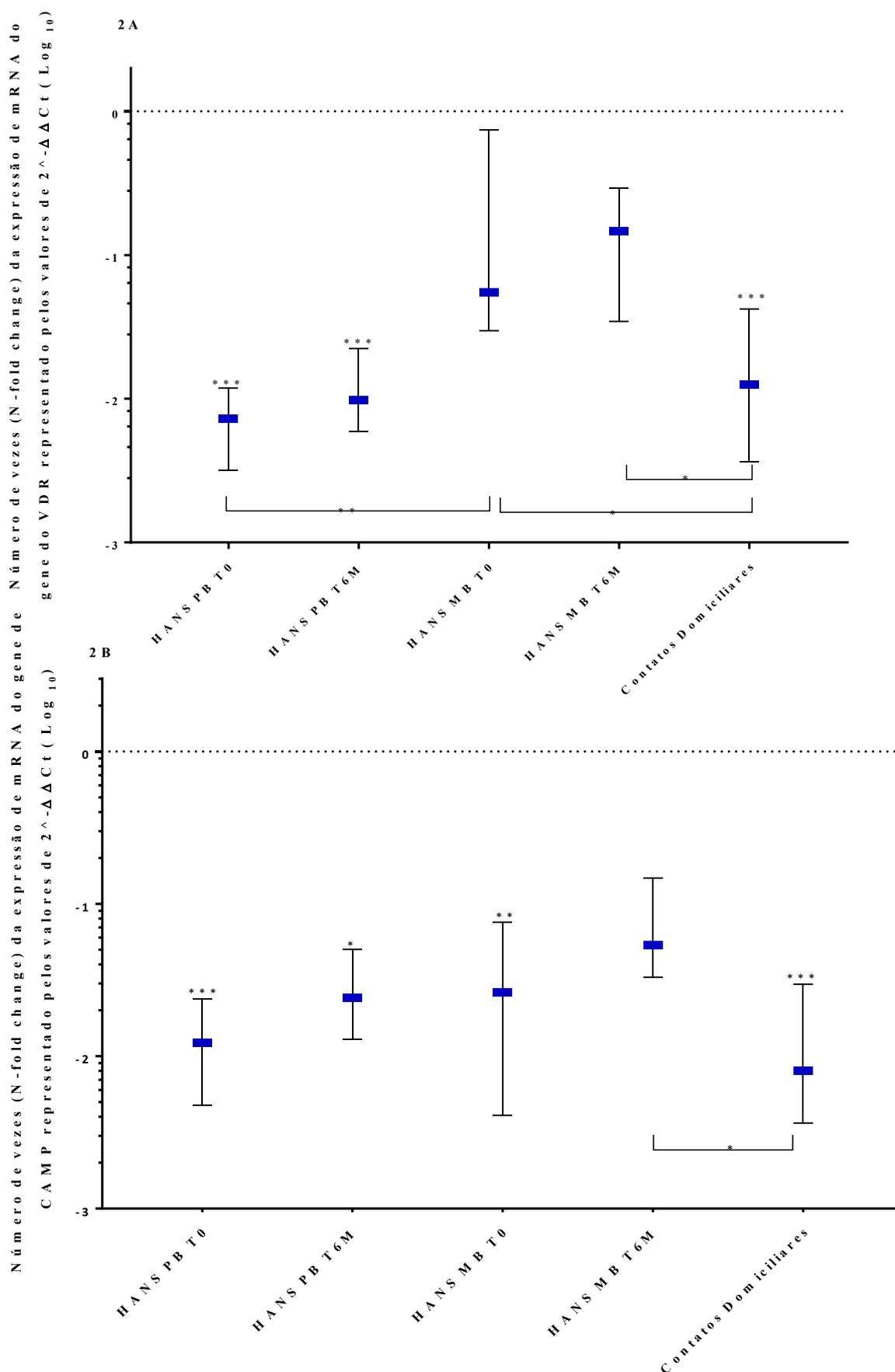


Gráfico 2. (2A) Expressão gênica do receptor da vitamina D (VDR) e (2B) do peptídeo antimicrobiano da catelicidina (CAMP) dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de

Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016. Os dados de RT-qPCR foram obtidos usando o cDNA de indivíduos controles (n= 10), contatos (n= 28) e pessoas com hanseníase antes do tratamento (VDR; CAMP: HANS PBT0 n= 14; 14, MBT0 n= 11; 14) e após seis meses de PQT (VDR; CAMP: HANS PBT6 n= 12; 9, MBT6 n= 13; 14). A expressão relativa de VDR (A) e CAMP (B) foi normalizada pelo gene de β -2-microglobulina e o *N-fold-change* (número de vezes) foi calculado pelo método $2^{(-\Delta\Delta Cq)}$. O grupo controle foi utilizado como calibrador. Os resultados para o grupo controle foram apresentados com a linha pontilhada marcada como zero no eixo y (escala logarítmica na base de 10). As análises estatísticas foram feitas pelos testes de Kruskal-Wallis e para comparações múltiplas o teste de Dunn. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001. O sinal de asterisco (*) apresentado acima das medianas refere-se à comparação dos grupos em relação ao grupo controle (marcada como zero no eixo y) e os asteriscos apresentados abaixo referem-se à comparação entre os grupos. Pessoas com hanseníase antes (HANS PBT0, HANS MBT0) e após seis meses de PQT (HANS PBT6, HANS MBT6).

PARTE IV –Perfil sérico de citocinas dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.

O desequilíbrio na síntese e na função das citocinas pró- e anti-inflamatórias é fator crucial para o direcionamento do curso clínico da hanseníase. Neste estudo, o perfil de citocinas foi avaliado por análise de citometria de fluxo, em um painel de 13 interleucinas, cujos resultados estão consolidados no **Apêndice 2**. As interleucinas IL-5, IL-9, IL-10, IL-22 não apresentaram resultados para os grupos avaliados. Para as demais citocinas, analisando os resultados por tempo de tratamento, observou-se que para os grupos PB e MB antes e após seis meses de PQT, os valores séricos de IL-6 (p=0,014), IL-13 (p=0,004), IL-17A (p=0,038), IL-17F (p=0,009) e TNF- α (p=0,001) apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas aos grupos controle e contatos (**Tabela 5**).

Tabela 5. Análise comparativa dos níveis séricos de citocinas de pessoas com hanseníase, antes e após seis meses de poliquimioterapia, em comparação aos grupos controles e contatos, atendidos entre 2014 a 2016.

Grupo hanseníase (antes e após seis meses de PQT)	Valores de p				
	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	TNF- α
Antes x após seis meses de PQT	0,0937	0,5864	0,1254	0,0395	0,0816
↑Antes da PQT x ↓Controles	0,2145	0,0321	0,5148	0,3876	0,0821
↑Antes da PQT x ↓Contatos	0,0020	0,0016	0,0138	0,0015	0,0001
Após seis meses de PQT x Controles	0,9123	0,0791	0,3199	0,2617	1,0000
↑Após seis meses de PQT x ↓Contatos	0,0435	0,0048	0,2314	0,2310	0,0162
↑Controles x ↓Contatos	0,0720	0,3578	0,1254	0,0199	0,0067

Nota: Os valores de p são apresentados para cada comparação das medianas (valores em pg/dL) entre todos os grupos como apresentado no Apêndice 2. As setas para cima indicam valores de medianas maiores que os observados no grupo comparativo.

Fonte: dados da pesquisa.

Ao compararmos apenas os pacientes PB e MB, considerando o tempo de tratamento dentro do grupo avaliado (**Tabela 6**), foi observado para PB, altos níveis de TNF- α ($p= 0,02$), IL-17F ($p= 0,046$), IL-21 ($p= 0,017$), enquanto para os pacientes MB, a relevância estatística foi observada em valores limítrofes ($p= 0,055$) para os níveis séricos de IL-6. Esses resultados foram explorados mais detalhadamente através de análise da correlação de *Pearson* e, posteriormente, por regressão linear na análise de trilha.

Tabela 6. Análise comparativa dos níveis séricos de citocinas para os grupos paucibacilar e multibacilar, antes e após seis meses de tratamento, atendidos entre 2014 e 2016.

Grupo Paucibacilar	Tempo de Poliquimioterapia	Q1	Mediana (pg/mL)	Q3	Valor de p
TNF-α	Antes	7,31	14,25	19,29	0,020
	Após seis meses	2,17	2,17	4,13	
IL-17F	Antes	9,8	15,5	70,0	0,046
	Após seis meses	9,83	9,83	9,83	
IL-21	Antes	2,1	15,4	76,8	0,017
	Após seis meses	2,07	2,07	2,07	
Grupo Multibacilar		Q1	Mediana	Q3	Valor de p
IL-6	Antes	6,09	35,4	52,6	0,055
	Após seis meses	2,09	3,24	9,82	

Nota: Para as variáveis em que o valor de $p < 0,05$, fez-se a comparação (Teste Kruskal-Wallis) entre os pares de grupos. Antes da PQT ($n=7$) e após seis meses de PQT ($n=8$). Fonte: dados da pesquisa.

PARTE V – Mapa de interações entre a expressão dos genes de VDR e CAMP e demais marcadores sorológicos dos indivíduos dos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de tratamento, e contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016.

Para testar a hipótese de que existem correlações importantes e significativas entre a expressão dos genes de VDR e CAMP e demais marcadores sorológicos: VD₃, citocinas pró- e anti-inflamatórias e de catelicidina em pacientes com hanseníase e nos demais grupos, utilizou-se a correlação de *Pearson* para obtenção dos coeficientes (r) que foram apresentados dentro de cada célula, assim como, os valores de p constantes das matrizes de correlação do **Apêndice 3**.

Assim, após identificar fortes associações ($r > 0,7$) entre as variáveis, os perfis de resposta imune para os grupos foram apresentados nos gráficos 3A a 3F.

Para pacientes PB antes do tratamento (**Gráfico 3A**), observou-se correlações fortes entre a expressão de VDR e CAMP e, de ambos genes com os níveis séricos de catelicidina e IL-2. Além disso, observou-se que IFN- γ se correlaciona fortemente com IL-4 e IL-17A e estes últimos entre si, bem como IL-2 com catelicidina sérica, além de IL-6 com IL-13 e IL-21. Ao analisar os resultados de PB após seis meses de tratamento (**Gráfico 3B**), as interações de citocinas se tornam complementares às anteriormente relatadas, podendo-se destacar conexões entre VDR e CAMP com TNF- α , IL-4, IL-17A, IL-17F, IL-21, além dos níveis séricos de 25(OH)VD₃. Adicionalmente, muitas outras interações entre citocinas foram observadas para complementar o padrão de resposta imune nos seis meses pós-PQT, como por exemplo, TNF- α e as citocinas IL-4, IL-17A, IL-17F e IL-21; IL-4 com IL-17A, IL-17F e IL-21; IL-6 com IL-13 e catelicidina sérica; IL-17A com IL17F e IL-21, e entre as duas últimas citadas.

No grupo de pacientes MB antes do tratamento (**Gráfico 3C**), observou-se um perfil mais amplo de correlações fortes do que antes observado para PB, com destaque para as interações entre VDR e CAMP, e de ambos genes com as demais citocinas TNF- α , IL-2, IL-17A, IL-21; além das numerosas interações entre as citocinas TNF- α , IL-4, IL-6, IL-17A, IL-17F e IL-21, vitamina D e catelicidina. Após seis meses de tratamento (**Gráfico 3D**), o perfil de correlações fortes redireciona a resposta imune frente à infecção por *M. leprae*, mostrando-se multifacetado com interações entre VDR e IFN- γ , IL-13, IL-21; CAMP e IFN- γ , TNF- α , IL-6; além da intrincada rede de comunicação formada por IFN- γ e IL-2, IL-4, IL-17A, IL-17F, IL-21; TNF- α e IL-6; IL-4 e IL-2, IL-17A, IL-17F e IL-21; IL-17A e IL-17F e IL-21, e dessas últimas entre si.

Em contrapartida, para o grupo controle (**Gráfico 3E**), notam-se importantes interações, entre a expressão dos genes avaliados, e do VDR com os níveis séricos de vitamina D, assim como, de CAMP com as citocinas IFN- γ , IL-17A e IL-17F. Já para o grupo de contatos (**Gráfico 3F**), verificaram-se correlações discretas entre a expressão de mRNA do gene CAMP e os níveis séricos de 25(OH)D₃, assim como de TNF- α e IFN- γ com IL-21 e, de IL-6 com IL-13.

Contudo, embora observadas correlações distintas para os grupos PB e MB, especialmente entre os tempos de tratamento, ainda assim, não fora possível concluir sobre as relações de causa-efeito entre as expressões gênicas e os demais marcadores sorológicos. Assim, para que se pudesse controlar o confundimento na relação entre esses biomarcadores e portanto, estabelecer a direção da influência de um sobre o outro, utilizou-se da regressão linear na análise de trilha para demonstrar as relações de causa e efeito e ilustrá-las em diagramas causais (Cortes, Faerstein e Struchiner, 2016).

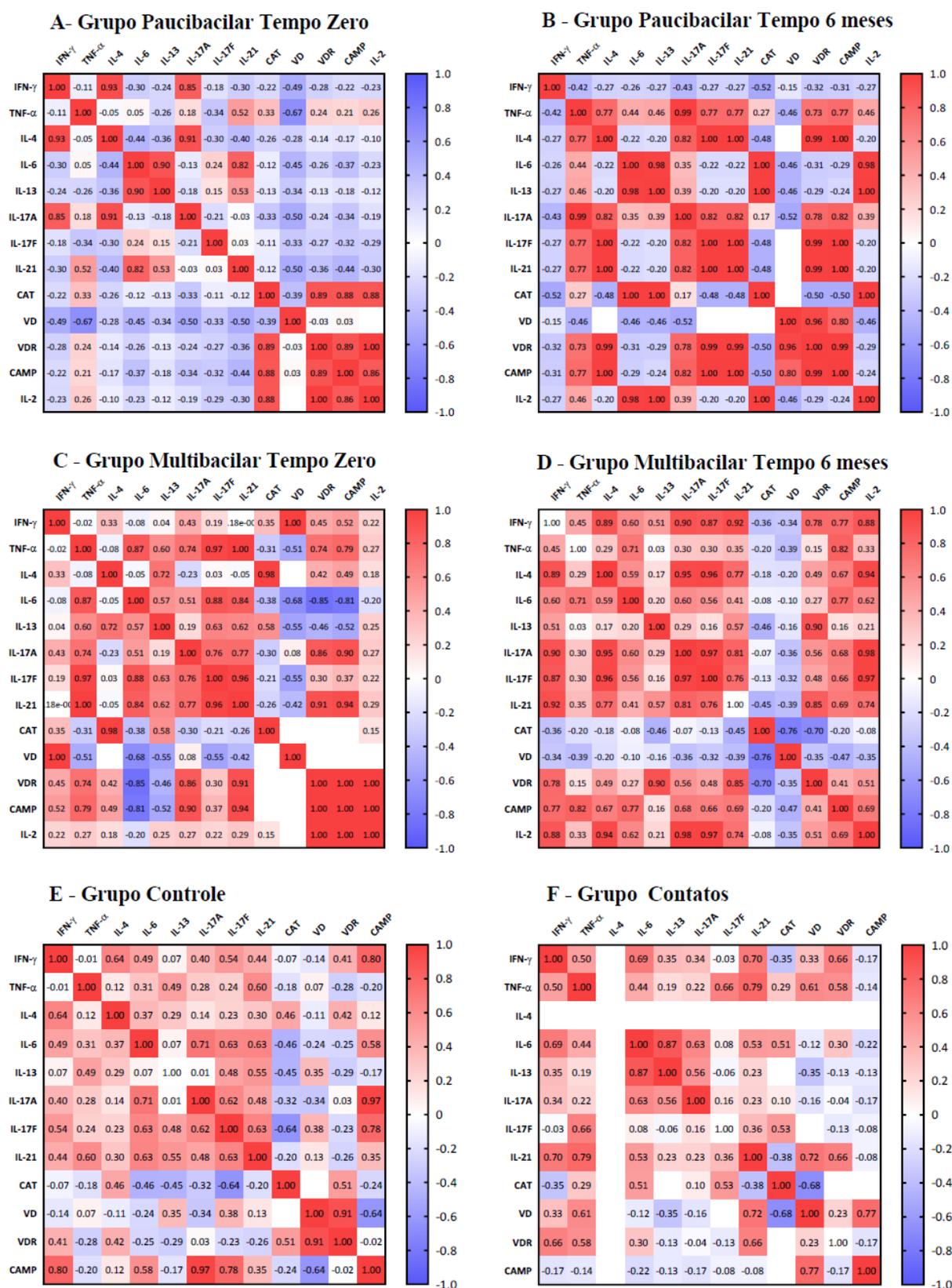


Gráfico 3. Mapa de calor (*heatmap*) ilustra a análise por correlação de *Pearson* entre os biomarcadores dos indivíduos dos grupos controle, pessoas com hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia e de contatos atendidos no Serviço de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos de 2014 e 2016. Os grupos PB (n = 8) e MB (n = 6) antes do tratamento (A e B); PB (n = 7) e MB (n = 13) após seis meses de PQT (C e D), Controles (E) e Contatos (F) foram analisados. O índice de correlação (r) dentro

das células foi usado para categorizar a força. A escala de cores vermelhas indica as correlações positivas e, quando maiores que 0,70 foram consideradas fortes. As correlações moderadas foram representadas no intervalo de $0 < r < 0,69$. As correlações fracas ou negativas foram representadas pela escala de cor azul ($r < 0$). Os grupos controle saudável (E) e os contatos (F) mostraram correlações proporcionalmente mais fracas entre os biomarcadores em comparação aos grupos de hanseníase (A-D). Os quadros em branco significam que as análises estatísticas não puderam ser feitas entre os marcadores em função dos dados inexistentes ou número de amostras insuficientes para os cálculos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. (VD: Vitamina D sérica; VDR: receptor da vitamina D; CAT: Catelicidina sérica, CAMP: gene do peptídeo antimicrobiano catelicidina).

PARTE VI - Análise de trilha enfatiza relação causa-efeito entre os genes VDR e CAMP e demais marcadores sorológicos durante a evolução da hanseníase

A análise de trilha foi utilizada como ferramenta estatística para verificar a relação causa-efeito entre o conjunto de variáveis já conhecidas na literatura por serem importantes na estruturação das respostas imune inata e adaptativa contra o *M. leprae*. No entanto, as pesquisas em ciências da saúde são receosas em avançar além dos estudos de correlação linear simples, o que caracteriza uma grande limitação, pois quando existe relação entre diversas variáveis, e concomitantemente entre alguns pares delas há estreitas e fortes correlações, faz-se necessário averiguar se essa magnitude não é efeito de uma terceira variável. Para a conclusão desta tese, após verificação das correlações apresentadas no mapa de calor, avaliou-se, por regressão linear de análise de trilha, a relação causa-efeito entre variáveis que mostraram poder estatístico após análise de correlação de *Pearson* ($p < 0,05$ e $r > 0,7$), nos grupos controle, hanseníase antes e após seis meses de PQT e contatos.

Grupo paucibacilar (PB) antes e após seis meses de tratamento poliquimioterápico

Em relação às variáveis que se correlacionaram para o grupo de pessoas com hanseníase paucibacilar antes do tratamento, a **tabela 7** apresenta os resultados da análise das estimativas dos coeficientes de trilha destacando a influência direta da expressão dos genes VDR (0,7389) nos níveis circulantes de IL-2 e indiretamente do CAMP (0,6607) e da catelicidina sérica (0,6548) via VDR, evidenciado pelos valores dos coeficientes maiores que o efeito residual do modelo (0,2608). Os valores de r e p para cada análise constam nas matrizes de correlação de *Pearson* e são requisitos básicos para que possa ser realizada a análise de trilha. A análise das tabelas é feita considerando o efeito residual e as estimativas diretas e indiretas, assim todas as variáveis do modelo de causa e efeito tem significância quando correlacionadas com a variável

dependente, porém, somente aquelas cuja estimativa direta ou indireta seja maior que o resíduo terão relação de causa e efeito.

Tabela 7. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes sobre a variável básica IL-2 no grupo paucibacilar antes da PQT, com correção da multicolinearidade ($k=0,849$).

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimador	Estimativa	VIF
Catelicidina sérica	Efeito direto sobre IL-2	p_{01}	0,1734448	3,96
	Efeito indireto via VDR	$p_{02} r_{12}$	0,65481915	2,82
	Efeito indireto via CAMP	$p_{03} r_{13}$	0,04181046	2,70
	Efeito total	r_{01}	0,88481243	
VDR	Efeito direto sobre IL-2	p_{02}	0,73893962	4,22
	Efeito indireto via catelicidina	$p_{01} r_{12}$	0,15370001	2,64
	Efeito indireto via CAMP	$p_{03} r_{23}$	0,04247974	2,79
	Efeito total	r_{02}	0,99790849	
CAMP	Efeito direto sobre IL-2	p_{03}	0,04750845	4,11
	Efeito indireto via catelicidina	$p_{01} r_{13}$	0,15264251	2,60
	Efeito indireto via VDR	$p_{02} r_{23}$	0,66072373	2,87
	Efeito total	r_{03}	0,86491158	
$R^2_{0,1234}$			0,9319	
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,2608	
k			0,0849	

Nota: $R^2_{0,1234}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; k: 0,849; VIF: Fatores de inflação da variância, IL-2; 0 (variável básica); 1: catelicidina sérica; 2: expressão gênica de VDR; 3: expressão gênica de CAMP, Interpreta-se: p_{01} (efeito direto da catelicidina sérica sobre a IL-2); $p_{02}r_{12}$: efeito indireto da catelicidina sérica via VDR sobre IL-2, obtido multiplicando-se o efeito direto de VDR sobre IL-2 (P_{02}) pela correlação entre catelicidina sérica e VDR (r_{12}); r_{01} : correlação entre IL-2 e catelicidina sérica, Utiliza-se a mesma regra para as demais combinações do modelo.

Fonte: dados da pesquisa.

Essas relações diretas e indiretas sobre os níveis séricos de IL-2 estão representadas no diagrama causal da **Figura 9** para o grupo hanseníase paucibacilar antes do tratamento.

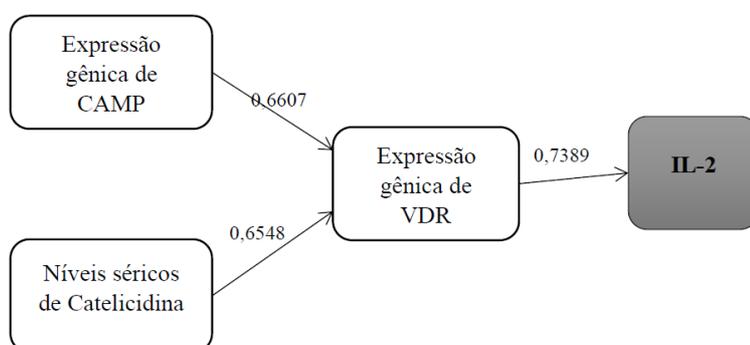


Figura 9. Diagrama causal da análise de trilha explorando como variável dependente os níveis séricos de IL-2 sob influência direta da expressão gênica de VDR e indireta de CAMP e catelicidina sérica para o grupo hanseníase paucibacilar antes do tratamento PQT.

Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\rightarrow) direcionadas à variável dependente (IL-2) e seus respectivos valores será igual ao efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, há relação causal, como pode ser notado nas setas indicadas entre expressão gênica de VDR sobre IL-2, Os efeitos indiretos são apresentados pelas setas precedentes à variável causal direta, que nesse caso são a expressão gênica de VDR e os níveis séricos de catelicidina.

A análise das estimativas dos coeficientes de trilha na **tabela 8**, ressalta a importância da expressão dos genes de VDR (0,3055) e CAMP (0,3312) influenciando direta e indiretamente os níveis séricos da citocina IL-17F, para o grupo de pessoas com hanseníase após seis meses de tratamento, com efeito residual de 0,1824. Os gráficos de multicolinearidade estão apresentados no **Apêndice 4**.

Tabela 8. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes VDR, CAMP e IL-21 sobre a variável dependente IL-17F no grupo paucibacilar após seis meses da PQT, com correção da multicolinearidade ($k=0,1002$).

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimador	Estimativa	VIF
VDR	Efeito direto sobre IL-17F	p_{01}	0,3055	7,462
	Efeito indireto via CAMP	$p_{02} r_{12}$	0,3278	6,279
	Efeito indireto via IL-21	$p_{03} r_{13}$	0,3302	6,588
	Efeito total	r_{01}	0,9943	
CAMP	Efeito direto sobre IL-17F	p_{02}	0,3312	7,758
	Efeito indireto via RVD	$p_{01} r_{12}$	0,3024	6,0407
	Efeito indireto via IL-21	$p_{03} r_{23}$	0,3316	6,644
	Efeito total	r_{02}	0,9985	
IL-21	Efeito direto sobre IL-17F	p_{03}	0,3321	8,066
	Efeito indireto via RVD	$p_{01} r_{13}$	0,3038	6,095
	Efeito indireto via CAMP	$p_{02} r_{23}$	0,3307	6,3904
	Efeito total	r_{03}	1	
$R^2_{0,1234}$			0,9667	
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,1824	
k			0,1002	

Nota: $R^2_{0,1234}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; k: 0,1002; VIF: Fatores de inflação da variância, IL-17F; 0 (variável dependente); 1: expressão gênica de VDR; 2: expressão gênica de CAMP; 3: níveis séricos de IL-21, Interpreta-se: p_{01} (efeito direto da expressão gênica de VDR sobre a IL-17F); $p_{02}r_{12}$: efeito indireto da expressão gênica de VDR via CAMP sobre IL-17F, obtido multiplicando-se o efeito direto de CAMP sobre IL-17F (P_{02}) pela correlação entre VDR e CAMP (r_{12}); r_{01} : correlação entre VDR e IL-17F, Utiliza-se a mesma regra para as demais combinações do modelo.

Fonte: dados da pesquisa.

Na **tabela 9** estão indicadas as associações complementares da influência dos níveis séricos de IL-6 (0,3524) e catelicidina (0,597) sobre a citocina IL-2, representado pelos valores dos coeficientes maiores que o efeito residual do modelo (0,2411).

Tabela 9. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes IL-6 e catelicidina sobre a variável dependente IL-2 no grupo paucibacilar após seis meses da PQT, com correção da multicolinearidade ($k=0,084$).

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimador	Estimativa	VIF
IL-6	Efeito direto sobre IL-2	p_{01}	0,3524	7,275
	Efeito indireto via Catelicidina	$p_{02}r_{12}$	0,5970	6,191
	Efeito total	r_{01}	0,979	
Catelicidina	Efeito direto sobre IL-2	p_{02}	0,5970	6,191
	Efeito indireto via IL-6	$p_{01}r_{12}$	0,3524	7,275
	Efeito total	r_{02}	0,9996	
$R^2_{0,1234}$			0,9418	
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,2411	
k			0,084	

Nota: $R^2_{0,1234}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; k: 0,084; VIF: Fatores de inflação da variância, IL-2; 0 (variável dependente); 1: Níveis séricos de IL-6; 2: Níveis séricos de catelicidina, Interpreta-se: p_{01} (efeito direto de IL-6 sobre a IL-2); $p_{02}r_{12}$: efeito indireto de IL-6 via catelicidina sobre IL-2, obtido multiplicando-se o efeito direto de catelicidina sobre IL-2 (P_{02}) pela correlação entre IL-6 e catelicidina (r_{12}); r_{01} : correlação entre IL-6 e IL-2, Utiliza-se a mesma regra para as demais combinações do modelo.

Fonte: dados da pesquisa.

Essas relações diretas e indiretas sobre os níveis séricos de IL-2 e IL-17F estão representadas nos diagrama causais da **Figura 10** para o grupo hanseníase paucibacilar após seis meses de tratamento PQT, destacando uma rede de intercomunicação imunológica um pouco mais complexa e elaborada em comparação ao grupo hanseníase sem tratamento.

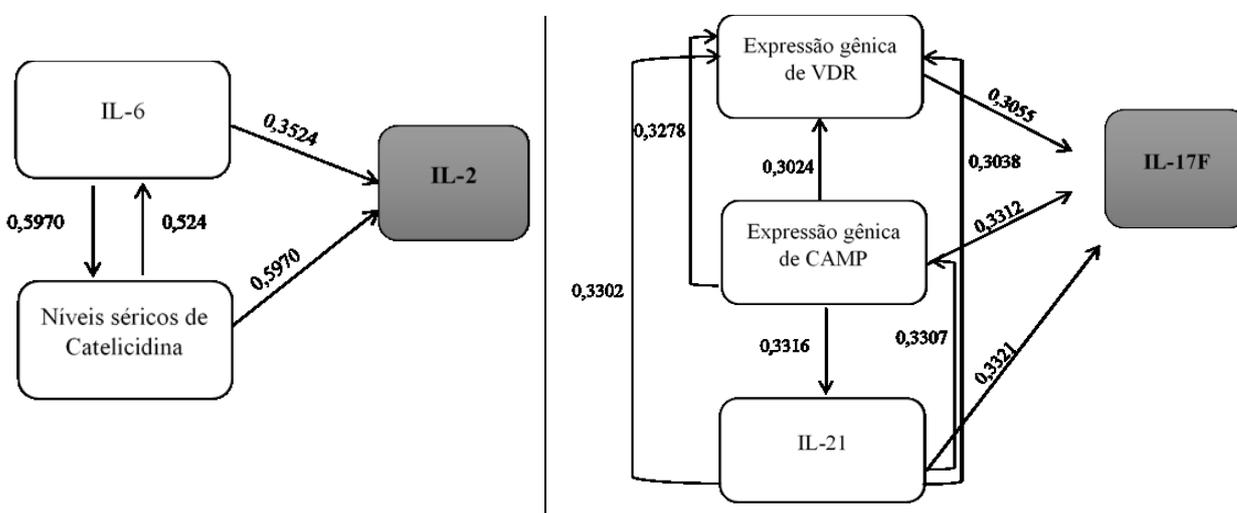


Figura 10. Diagrama causal da análise de trilha explorando como variáveis dependentes os níveis séricos de IL-2 e IL-17F, sob influência direta da expressão gênica de VDR e CAMP, e níveis séricos de catelicidina, IL-6 e IL-21 para o grupo hanseníase paucibacilar após seis meses do tratamento PQT.

Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\rightarrow) direcionadas às variáveis dependentes (IL-2 e IL-17F) e seus respectivos valores será igual ao efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, há relação causal, como pode ser notado nas setas indicadas entre expressão de VDR e CAMP sobre IL-17F; setas reversíveis (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam a correlação de duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\rightarrow

e \leftrightarrow), isto é, o produto de seus valores será igual ao efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso as citocinas IL-2 e IL-17F.

Grupo multibacilar (MB) antes e após seis meses de tratamento poliquimioterápico

Para o grupo multibacilar antes do tratamento, a análise das estimativas dos coeficientes de trilha, apresentou efeitos diretos e indiretos da interrelação da expressão dos genes de VDR (0,4573) e CAMP (0,4987) e desses, respectivamente, sobre os níveis séricos de IL-2 (0,5001; 0,4586), maior que o efeito residual de (0,2074), como apresentado na **tabela 10**.

Tabela 10. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes VDR e CAMP sobre a variável dependente IL-2, no grupo multibacilar sem tratamento PQT, após correção da multicolinearidade ($k=0,0849$).

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimador	Estimativa	VIF
VDR	Efeito direto sobre IL-2	p_{01}	0,45859517	6,99
	Efeito indireto via CAMP	$p_{02} r_{12}$	0,49872415	5,90
	Efeito total	r_{01}	0,99628703	
CAMP	Efeito direto sobre IL-2	p_{02}	0,50010023	6,99
	Efeito indireto via VDR	$p_{01} r_{12}$	0,45733333	5,90
	Efeito total	r_{02}	0,999928	
$R^2_{0,1234}$			0,9569	
Efeito Residual (pe)			0,2074	
k			0,0849	

Nota: $R^2_{0,1234}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; k: 0,0849; VIF: Fatores de inflação da variância, IL-2; 0 (variável dependente); 1: expressão gênica de VDR; 2: expressão gênica de CAMP; 3: níveis séricos de IL-2, Interpreta-se: p_{01} (efeito direto da expressão gênica de VDR sobre a IL-2); $p_{02}r_{12}$: efeito indireto da expressão gênica de VDR via CAMP sobre IL-2, obtido multiplicando-se o efeito direto de CAMP sobre IL-2 (P_{02}) pela correlação entre VDR e CAMP (r_{12}); r_{01} : correlação entre VDR e IL-2. Utiliza-se a mesma regra para as demais combinações do modelo.

Fonte: dados da pesquisa.

A **figura 11** esboça o diagrama causal com as relações diretas e indiretas da expressão gênica de VDR e CAMP sobre os níveis séricos de IL-2 no grupo hanseníase multibacilar antes do tratamento, destacando o importante papel na condução da resposta imune em pacientes que ainda a estão modulando frente à infecção pelo bacilo.

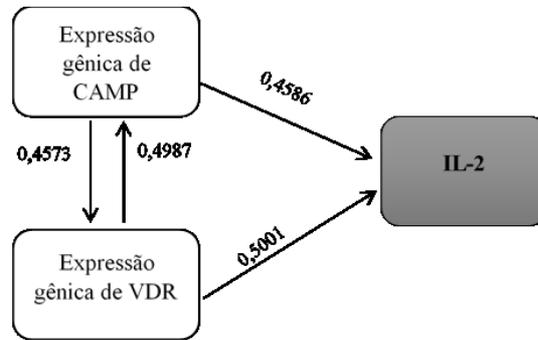


Figura 11. Diagrama causal da análise de trilha explorando como a variável dependente o nível sérico de IL-2, sob influência direta da expressão gênica de VDR e CAMP para o grupo hanseníase multibacilar antes da PQT.

Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\rightarrow) direcionadas à variável dependente (IL-2) e seus respectivos valores será igual ao efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, há relação causal, como pode ser notado nas setas indicadas entre expressão gênica de VDR e CAMP sobre IL-2; setas reversíveis (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam a correlação de duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\rightarrow e \leftrightarrow), isto é, o produto de seus valores será igual ao efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso a IL-2.

Fonte: dados da pesquisa.

Na **tabela 11**, estão apresentadas as análises das estimativas dos coeficientes de trilha, com destaque para os efeitos diretos da expressão dos genes de VDR (0,4263), CAMP (0,2627) e, IL-2 (0,4786) sobre os níveis séricos de IFN- γ , maiores que o efeito residual de (0,2126).

Tabela 11. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes VDR, CAMP e IL-2 sobre a variável dependente IFN- γ , no grupo multibacilar após seis meses de tratamento PQT.

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimador	Estimativa
VDR	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{03}	0,4263
	Efeito indireto via IL-2	$p_{01} r_{13}$	0,2438
	Efeito indireto via CAMP	$p_{02} r_{23}$	0,1087
	Efeito total	r_{03}	0,77880649
CAMP	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{02}	0,2627
	Efeito indireto via IL-2	$p_{01} r_{12}$	0,3321
	Efeito indireto via VDR	$p_{03} r_{23}$	0,1764
	Efeito total	r_{02}	0,77115192
IL-2	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{01}	0,4786
	Efeito indireto via CAMP	$p_{02} r_{12}$	0,1823
	Efeito indireto via VDR	$p_{03} r_{13}$	0,2172
	Efeito total	r_{01}	0,87804246
$R^2_{0,1234}$			0,9548
Efeito Residual (pε)			0,2126

Nota: $R^2_{0,1234}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis, IFN- γ ; 0 (variável dependente); 1: expressão gênica de VDR; 2: expressão gênica de CAMP; 3: níveis séricos de IFN- γ . Interpreta-se: p_{01} (efeito direto da expressão gênica de VDR sobre IFN- γ); $p_{02} r_{12}$: efeito indireto da expressão gênica de VDR via IL-2 sobre IFN- γ ,

obtido multiplicando-se o efeito direto de IL-2 sobre IFN- γ (P_{02}) pela correlação entre VDR e IL-2 (r_{12}); r_{01} : correlação entre VDR e IFN- γ , Utiliza-se a mesma regra para as demais combinações do modelo.

Fonte: dados da pesquisa.

Na **tabela 12**, estão apresentadas as análises das estimativas dos coeficientes de trilha, com destaque para os efeitos diretos das citocinas do perfil Th17: IL-17A (0,6173) e IL-17F (0,4265), e efeitos indiretos de IL-21 (0,5006) e IL-6 (0,3689), sobre os níveis séricos de IL-2, maior que o efeito residual de (0,1678).

Tabela 12. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-6 sobre a variável dependente IL-2 no grupo multibacilar após seis meses de tratamento PQT.

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimador	Estimativa
IL-17A	Efeito direto sobre IL-2	p_{01}	0,61738899
	Efeito indireto via IL-17F	$p_{02} r_{12}$	0,41513013
	Efeito indireto via IL-21	$p_{03} r_{13}$	0,41513013
	Efeito indireto via IL-6	$p_{04} r_{14}$	0,03740041
	Efeito total	r_{01}	0,97602383
IL-17F	Efeito direto sobre IL-2	p_{02}	0,42658686
	Efeito indireto via IL-17A	$p_{01} r_{12}$	0,60080794
	Efeito indireto via IL-21	$p_{03} r_{23}$	-0,08817399
	Efeito indireto via IL-6	$p_{04} r_{14}$	0,03479003
	Efeito total	r_{02}	0,97401083
IL-21	Efeito direto sobre IL-2	p_{03}	-0,11578944
	Efeito indireto via IL-17A	$p_{01} r_{13}$	0,50065157
	Efeito indireto via IL-17F	$p_{02} r_{23}$	0,32484713
	Efeito indireto via IL-6	$p_{04} r_{14}$	0,02563394
	Efeito total	r_{03}	0,73534321
IL-6	Efeito direto sobre IL-2	p_{03}	0,06259094
	Efeito indireto via IL-17A	$p_{01} r_{13}$	0,36891278
	Efeito indireto via IL-17F	$p_{02} r_{23}$	0,23711048
	Efeito indireto via IL-21	$p_{04} r_{14}$	-0,04742124
	Efeito total	r_{03}	0,62119296
$R^2_{0,1234}$			0,9718
Efeito Residual ($p\epsilon$)			0,1678

Nota: $R^2_{0,1234}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; VIF: Fatores de inflação da variância, IL-2; 0 (variável dependente); 1: Níveis séricos de IL-17A; 2: Níveis séricos de IL-17F; 3: Níveis séricos de IL-21; 4: Níveis séricos de IL-6, Interpreta-se: p_{01} (efeito direto dos níveis séricos de IL-17A sobre a IL-2); $p_{02}r_{12}$: efeito indireto Dos níveis séricos de IL-17A via IL-17F sobre IL-2, obtido multiplicando-se o efeito direto de IL-17F sobre IL-2 (P_{02}) pela correlação entre IL-17A e IL-17F (r_{12}); r_{01} : correlação entre IL-17A e IL-2, Utiliza-se a mesma regra para as demais combinações do modelo.

Fonte: dados da pesquisa.

Na **tabela 13**, estão apresentadas as análises das estimativas dos coeficientes de trilha, com destaque para os efeitos diretos das citocinas IL-17F (0,4563) e IL-21 (0,6461), e efeitos

indiretos de IL-17A (0,4441) e IL-6 (0,2537), sobre os níveis séricos de IFN- γ , maior que o efeito residual de (0,2393).

Tabela 13. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-6 sobre a variável dependente IFN- γ no grupo multibacilar após seis meses de tratamento PQT.

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimador	Estimativa
IL-17A	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{01}	-0,1907
	Efeito indireto via IL-17F	$p_{02} r_{12}$	0,4441
	Efeito indireto via IL-21	$p_{03} r_{13}$	0,5239
	Efeito indireto via IL-6	$p_{04} r_{14}$	0,1191
	Efeito total	r_{01}	0,89638852
IL-17F	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{02}	0,4563
	Efeito indireto via IL-17A	$p_{01} r_{12}$	-0,1856
	Efeito indireto via IL-21	$p_{03} r_{23}$	0,3475
	Efeito indireto via IL-6	$p_{04} r_{14}$	0,0816
	Efeito total	r_{02}	0,87352722
IL-21	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{03}	0,6461
	Efeito indireto via IL-17A	$p_{01} r_{13}$	-0,1547
	Efeito indireto via IL-17F	$p_{02} r_{23}$	0,3475
	Efeito indireto via IL-6	$p_{04} r_{14}$	0,0816
	Efeito total	r_{03}	0,92055595
IL-6	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{03}	0,1994
	Efeito indireto via IL-17A	$p_{01} r_{13}$	-0,114
	Efeito indireto via IL-17F	$p_{02} r_{23}$	0,2537
	Efeito indireto via IL-21	$p_{04} r_{14}$	0,2646
	Efeito total	r_{03}	0,60363648
R²_{0,1234}			0,9427
Efeito Residual (pϵ)			0,2393

Nota: R²_{0,1234}: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; VIF: Fatores de inflação da variância, IFN- γ ; 0 (variável dependente); 1: Níveis séricos de IL-17A; 2: Níveis séricos de IL-17F; 3: Níveis séricos de IL-21; 4: Níveis séricos de IL-6, Interpreta-se: p_{02} (efeito direto dos níveis séricos de IL-17F sobre a IFN- γ); $p_{02}r_{12}$: efeito indireto dos níveis séricos de IL-17A via IL-17F sobre IFN- γ , obtido multiplicando-se o efeito direto de IL-17F sobre IFN- γ (p_{02}) pela correlação entre IL-17A e IL-17F (r_{12}); r_{02} : correlação entre IL-17F e IFN- γ , Utiliza-se a mesma regra para as demais combinações do modelo.

Fonte: dados da pesquisa.

A **Figura 12** esboça o diagrama causal da relação direta da expressão dos genes VDR (0,4263), CAMP (0,2627), IL-2 circulante (0,4786), IL-17F (0,4563) e IL-21 (0,66461) sobre a citocina circulante IFN- γ , assim como, outras associações indiretas como dos níveis séricos de IL-17A (0,4441) e IL-6 (0,2646) sobre IL-17F. Destacam-se também, a relação direta entre as citocinas IL-17A (0,6173) e IL-17F (0,4266), e indireta de IL-21 (0,5006) e IL-6 (0,3689) sobre os níveis séricos de IL-2, sistematizando a combinação das interações entre os biomarcadores para os pacientes multibacilares após seis meses de tratamento.

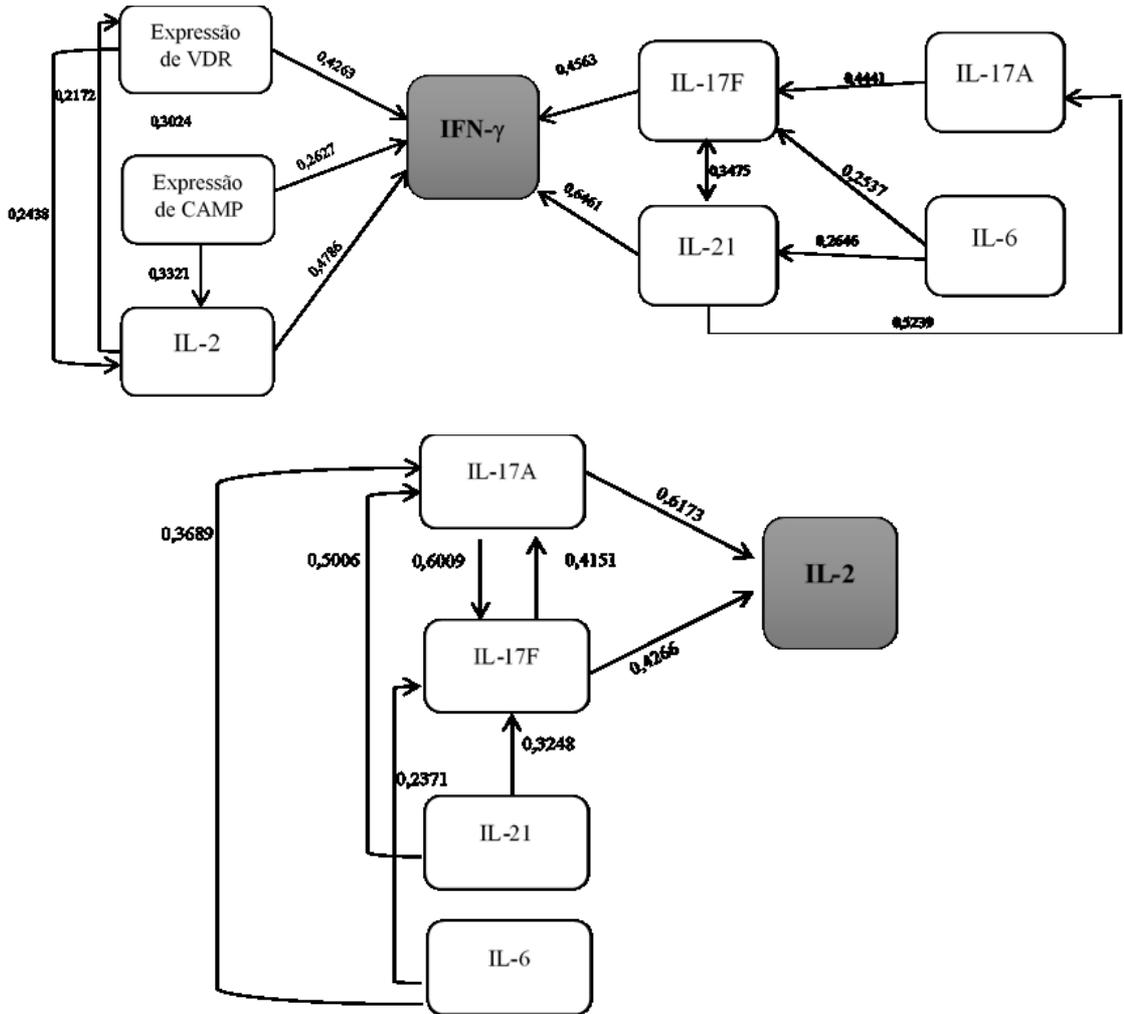


Figura 12. Diagrama causal da análise de trilha explorando como a variável dependente o nível sérico de IFN- γ , sob influência direta da expressão gênica de VDR e CAMP e das citocinas IL-17F e IL-21, assim como, para IL-2 sob a influência direta de IL-17A e IL-17F, para o grupo hanseníase multibacilar após seis meses da PQT.

Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\rightarrow) direcionadas às variáveis dependentes (IL-2 e IFN- γ) e seus respectivos valores será igual ao efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, há relação causal, como pode ser notado nas setas indicadas entre expressão de VDR e CAMP e, IL-17F e IL-21 sobre IFN- γ ; setas reversíveis (\leftrightarrow) e seus respectivos valores representam a correlação de duas variáveis independentes; a combinação de setas bidirecionais e unidirecionais (\rightarrow e \leftrightarrow), isto é, o produto de seus valores será igual ao efeito indireto de uma determinada variável independente, atuando em conjunto com outra variável independente e influenciando no desfecho da variável principal, neste caso a IFN- γ .

Tabela 14. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes IL-17F e expressão gênica de CAMP sobre a variável dependente IFN- γ no grupo controle saudável.

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimador	Estimativa
IL-17F	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{01}	-0,239
	Efeito indireto via CAMP	$p_{02} r_{12}$	0,7756
	Efeito total	r_{01}	0,53665879
CAMP	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{02}	0,9883
	Efeito indireto via IL-17	$p_{01} r_{12}$	-0,1875
	Efeito total	r_{02}	0,800771127
$R^2_{0,1234}$			0,6631
Efeito Residual (pϵ)			0,5803

Nota: $R^2_{0,1234}$: Coeficiente de determinação ajustado do conjunto de variáveis; IFN- γ ; 0 (variável dependente); 1: Níveis séricos de IL-17F; 2: Expressão gênica de CAMP, Interpreta-se: p_{02} (efeito direto dos níveis séricos de IL-17F sobre a IFN- γ , não relacionados); $p_{02}r_{12}$: efeito indireto dos níveis séricos de IL-17F via CAMP sobre IFN- γ , Utiliza-se a mesma regra para as demais combinações do modelo.

Fonte: dados da pesquisa.

Para o grupo controle saudável (**Tabela 14**), observa-se que, mesmo que a correlação direta entre a expressão gênica de CAMP e indireta de IL-17F via CAMP sobre o IFN- γ tenha se configurado na análise de trilha, essas relações não se apresentam como circunstâncias específicas de infecção quando comparadas às demais relações de causa-efeito evidenciadas anteriormente nos grupos hanseníase antes ou após seis meses de tratamento (**Figura 13**).

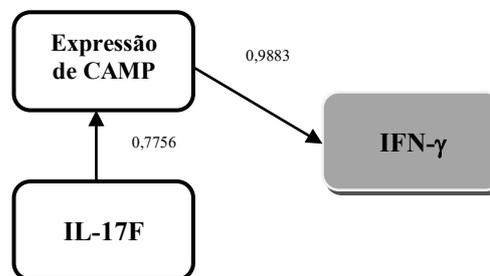


Figura 13. Diagrama causal da análise de trilha explorando como a variável dependente o nível sérico de IFN- γ , sob influência direta da expressão gênica de CAMP e, indireta da citocina IL-17F para o grupo controle.

Nota: interpreta-se: setas unidirecionais (\rightarrow) direcionadas à variável dependente (IFN- γ) e seu respectivo valor será igual ao efeito direto da variável independente sobre a variável dependente, e se a estimativa do efeito direto for maior que a estimativa do efeito residual, há relação causal, como pode ser notado nas setas indicadas entre expressão de CAMP e IL-17F sobre IFN- γ .

Para o grupo contatos (**Tabela 15**), não foram observadas vias de associação para as variáveis que se destacaram anteriormente na correlação de *Pearson*, pois, na análise de trilha, os valores das estimativas foram menores que o valor do efeito residual (0,6554), não configurando, portanto, relações de causa-efeito nesse grupo.

Tabela 15. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos (análise de trilha) entre as variáveis independentes expressão gênica de VDR, TNF- α e IL-21 sobre a variável dependente IFN- γ no grupo contatos.

Variáveis independentes	Vias de associação	Estimadores	Estimativas
VDR	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{01}	0,3727
	Efeito indireto via TNF- α	$p_{02} r_{12}$	-0,1153
	Efeito indireto via IL-21	$p_{03} r_{13}$	0,4003
	Efeito total	r_{01}	0,6578
TNF-α	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{02}	-0,1976
	Efeito indireto via VDR	$p_{01} r_{12}$	0,2174
	Efeito indireto via IL-21	$p_{03} r_{23}$	0,479
	Efeito total	r_{02}	0,4987
IL-21	Efeito direto sobre IFN- γ	p_{03}	0,6076
	Efeito indireto via VDR	$p_{01} r_{13}$	0,2456
	Efeito indireto via TNF- α	$p_{02} r_{23}$	-0,1558
	Efeito total	r_{03}	0,6973
R²_{0,1234}			0,5703
Efeito Residual (pε)			0,6554

Nota: As estimativas de efeitos direto ou indireto foram menores que a estimativa do efeito residual, portanto, não há relação causal entre as variáveis testadas e nenhuma via de associação foi evidenciada para o grupo contatos.

Fonte: dados da pesquisa.

7. DISCUSSÃO

A forma de apresentação dos resultados desta tese é uma tendência atual dos estudos biológicos utilizando a análise de trilha para o entendimento de vias metabólicas e imunológicas relacionadas às doenças infecciosas. Nesse sentido, esta tese inclui análises estatísticas que auxiliam a visualização de interação entre marcadores biológicos envolvidos no processo inflamatório da hanseníase.

Nessa linha de investigação, um estudo recente correlacionou os antígenos de *M. leprae* (LAM e PGL-1), o receptor *Toll-like 2* da imunidade inata e a citocina IL-10 ao surgimento de episódios reacionais em pessoas com hanseníase (Antunes *et al.*, 2019). Nessa perspectiva, os resultados obtidos nesta tese, evidenciam potenciais mecanismos imunológicos implicados nas relações causais da análise de trilha, entre as expressões gênicas do receptor de vitamina D e do peptídeo antimicrobiano catelicidina e os marcadores séricos: 25(OH)VD₃, catelicidina, IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-17A, IL-17F e IL-21, antes e após seis meses de tratamento para hanseníase.

Inicialmente, os resultados destacaram as fortes interações e a interdependência dos níveis séricos de vitamina D e do peptídeo antimicrobiano catelicidina para as pessoas com hanseníase antes ($r=0,86$), e mesmo após seis meses de tratamento ($r=0,79$), situação não observada para os indivíduos controles e contatos (**Gráfico 1C**). Essa condição vem de encontro ao descrito anteriormente para hanseníase e tuberculose, destacando a vitamina D como molécula fundamental para ativação de vias antimicrobianas que envolvem importantes elementos como a catelicidina nas doenças infecciosas (Dixon *et al.*, 2012; Passos-Vázquez *et al.*, 2014; Selvaraj, 2011; Zavala *et al.*, 2018).

Nessa linha de investigação, Matzner e colaboradores (2011), avaliaram pessoas com hanseníase no Iêmen, antes e após tratamento, evidenciando como nesta tese, redução expressiva de vitamina D e catelicidina nos doentes quando comparados ao grupo controle. Lyrio e colaboradores (2015) estudaram a interação *in vitro* de *M. leprae* com os queratinócitos humanos e observaram que após exposição à bactéria, as células aumentavam a expressão de catelicidina no sítio da infecção. Esse mecanismo imunológico dependente de vitamina D, foi estudado por Kim e colaboradores, demonstrando que a adição de 25(OH)VD₃ durante a diferenciação de monócitos em macrófagos induzida por IL-15, aumentou a expressão do peptídeo antimicrobiano catelicidina, melhorando assim, a resposta antimicrobiana contra o *M. leprae*.

Com relação à deficiência de vitamina D, espera-se que a maior prevalência ocorra em países cuja baixa incidência solar ao longo do ano seja mais comum, o que não é o caso do Brasil. No entanto, a hipovitaminose D foi evidenciada para a maioria dos indivíduos avaliados neste estudo, mesmo para os pacientes que relataram trabalhar em profissões com exposição

solar diária (32,4%); condição necessária para manter a síntese cutânea da vitamina D. Além disso, é importante considerar que a deficiência de vitamina D é fortemente influenciada pela cor da pele que se constitui numa barreira natural à penetração menor da radiação UVB (Correia *et al.*, 2014; Kechichian e Ezzedine, 2018). Talvez este fato reflita uma condição importante a ser considerada nos pacientes com hanseníase, já que neste estudo, quase 73% da população se autodeclarou afrodescendente.

Em seguida, ao analisar as citocinas séricas, foram observadas importantes interações entre as interleucinas pró- e anti-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, IL-17A, IL-17F e IL-21), para pacientes com hanseníase PB e MB, especialmente após seis meses do tratamento. Pressupõem-se que a coexistência entre a expressão e a circulação de citocinas de diferentes padrões Th1, Th2 e Th17 (Gráficos 3A-3F), revele a estratégia do organismo em se reorganizar para melhorar a resposta de multiplicação, diferenciação, quimiotaxia e envolvimento de células de defesa e seus componentes para o controle da infecção pelo *M. leprae* (Chaves *et al.*, 2018; Geluk, 2018; Madan, Agarwal e Chander, 2011; Sadhu *et al.*, 2016). Apesar dessas evidências, as interações observadas sinalizam a modulação da resposta imunológica como uma estrutura cooperativa na imunoproteção, por muitas vezes no ambiente restrito de vitamina D, de catelicidina e com a resposta imune inata não mais competente para eliminar o bacilo. Nesse cenário, alguns estudos apontam para a influência dos medicamentos utilizados no tratamento da hanseníase, assim como, o destaque para fatores nutricionais na manutenção do bom estado de saúde durante a evolução da doença (Cassirer-Costa *et al.*, 2017; Feenstra *et al.*, 2011; Jeffery *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2017; Wagenaar *et al.*, 2015).

Por outro lado, os resultados observados para os indivíduos do grupo controle sugerem outras formas de correlação entre os biomarcadores, com destaque para a expressão de VDR e os níveis séricos de vitamina D e, da expressão de CAMP com as citocinas IL-17A e IL-17F (Gráfico 3E), sugerindo alguma forma de estado de alerta inicial da resposta imune. Da mesma forma, outras modestas interações foram observadas no grupo de contatos como IL-6 e IL-13, TNF- α -e IL-21, além da correlação forte entre a expressão gênica de CAMP e vitamina D sérica (Gráfico 3F). Neste grupo, considera-se que os achados sejam importantes sinais de controle imunológico para indivíduos que estão expostos ao *M. leprae* no ambiente familiar e que podem alertar para o início de evidências de doença. Nessa perspectiva, Cassirer-Costa e colaboradores (2017) verificaram que pacientes multibacilares antes do tratamento já exibiam níveis séricos importantes de citocinas inflamatórias e regulatórias como TNF- α e IL-6 em relação aos indivíduos, sugerindo que a avaliação dessas citocinas poderia auxiliar na identificação de novos casos entre contatos, na classificação de novos pacientes e para monitoramento da doença.

Em consonância com os demais resultados e objetivando esclarecer sobre a influência da expressão dos genes do receptor da vitamina D e do peptídeo antimicrobiano catelicidina, observou-se, para o grupo hanseníase, independentemente do tempo de tratamento, reduções significativas de 1 a 3 vezes (*N-fold change*) na expressão de ambos os genes quando comparados aos indivíduos do grupo controle (Gráficos 2A e 2B). Esses resultados refletem observações anteriores que mostraram que em doenças infecciosas, como tuberculose e a hanseníase, o componente genético, especialmente os polimorfismos, podem estar associados à transcrição reduzida, por alterar a estabilidade do mRNA (Araújo *et al.*, 2018), de genes de citocinas, peptídeos antimicrobianos e de importantes proteínas envolvidas no mecanismo de modulação da resposta imune (Dixon *et al.*, 2012; Kechichian e Ezzedine, 2018; Mandal *et al.*, 2015; Matzner *et al.*, 2011).

Assim, acredita-se que a expressão reduzida dos genes VDR e CAMP, em pacientes com hanseníase antes e após seis meses de PQT, sugere evidências adicionais para a proposição de que os eventos imunológicos, anteriormente descritos nesta pesquisa, não ocorrem isoladamente e podem ter forte implicação durante a progressão da doença (Oca, 2011), sinalizando, portanto, a proteção ou a suscetibilidade à hanseníase. Considera-se que expressões gênicas reduzidas e as fortes interações entre os marcadores sorológicos testados possam ter contribuído efetivamente para que quase 50% dos pacientes desenvolvessem reações inflamatórias hanseníase durante o primeiro ano de tratamento. Expressões reduzidas dos genes de VDR e CAMP, bem como polimorfismos ligados a eles, foram também previamente descritos na infecção por *M. tuberculosis* (Larcombe *et al.*, 2012; Panda *et al.*, 2019; Selvaraj *et al.*, 2004; Yamshchikov *et al.*, 2010) e, pelo *M. leprae* (Araújo *et al.*, 2018; Matzner *et al.*, 2011; Neela *et al.*, 2015; Pepineli *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2018).

Diante desses resultados, uma análise de trilha fundamentada em regressão linear estimou os efeitos diretos e indiretos das expressões gênicas de VDR e CAMP sobre os níveis séricos de vitamina D, catelicidina e de citocinas. Utilizando-se de correlações cruciais entre as variáveis supracitadas e o peso de cada uma delas determinado pelos coeficientes de trilha nos grupos hanseníase, controle e contatos, os resultados mais relevantes apresentados nos diagramas causais, ressaltaram a influência da expressão gênica de VDR e CAMP sobre os níveis circulantes de IL-2 antes do tratamento para ambos pacientes PB e MB e, após seis meses de tratamento IL-17F sérica para PB e de IFN- γ sérica para MB. Além disso, destaca-se a associação entre IL-6, IL-17A, IL-17F e IL-21 induzindo a síntese de IL-2, para os pacientes multibacilares após seis meses de tratamento.

Anteriormente, Davidson e colaboradores (2007), destacaram a importância da IL-2 para a ativação e diferenciação de vários tipos de células imunes, como as células T, correlacionando

seu potencial clínico com o aumento das respostas imunes a doenças infecciosas. Em pacientes PB, a IL-2 é particularmente importante porque faz a mediação de linfócitos TCD4⁺ que, por estimulação, se diferenciam em linfócitos Th1 ou Th17 (Davidson *et al.*, 2007; Geluk, 2018). Além disso, essa citocina desempenha papel crucial na indução da expressão de FoxP3⁺ e a produção de células Tregs (Chaves *et al.*, 2018), importantes elementos a serem considerados para controle das exacerbações dos processos inflamatórios decorrentes da eliminação do bacilo na hanseníase.

Entretanto, após os seis meses de tratamento, a citocina IL-17F eleva-se como parte da via imunológica regulada pela expressão de VDR e CAMP para os indivíduos paucibacilares. Esses resultados estão em consonância com os que foram observados por Almeida-Neto e colaboradores (2015), na hanseníase após tratamento, demonstrando a mediação imunorreguladora das citocinas da células Th17. Nesse contexto, o estudo de Sadhu e colaboradores (2016) reportou que a citocina IL-17, e suas isoformas, estão envolvidas em processos de remodelamento e reparo tecidual, eventos importantes no processo de regeneração da hanseníase.

Contudo, altas concentrações dessas citocinas também foram percebidas como sinal de processos inflamatórios nas formas mais graves da doença (Costa *et al.*, 2018; Saini *et al.*, 2017), associadas à reação hansênica do tipo 1 (Chaitanya *et al.*, 2012), assim como, superexpressão em lesões de pele e culturas celulares induzidas pelo *M. leprae* de indivíduos na forma tuberculoide (Saini, Ramesh e Nath, 2013). Entende-se, portanto, que a citocina IL-17F, induzida pela expressão gênica de VDR e CAMP, nos pacientes paucibacilares após seis meses de tratamento, esteja envolvida no processo de modificação da resposta imune, regulando e modificando o ambiente inflamatório desencadeado antes da PQT. Destaca-se, no entanto, que a interação entre IL-6 e catelicidina sérica induzindo a citocina IL-2, ainda reflita um ambiente carente do controle da carga bacteriana, pois sabe-se que estas citocinas refletem um ambiente pró-inflamatório e propício ao recrutamento de células de defesa para os locais de infecção (Cortela *et al.*, 2015, 2018).

De forma mais complexa, para os pacientes multibacilares após seis meses de tratamento, verificou-se que a provável via imunológica envolvendo os níveis séricos de IFN- γ , é dependente não só da ativação dos genes do receptor da vitamina D e do peptídeo antimicrobiano catelicidina, mas também da combinação dos níveis séricos de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-6, assim como, a indução destas últimas sobre a IL-2. O IFN- γ é responsável por induzir as células Th2, Th17, *Natural Killer*, B assim como, os macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012), e acredita-se que, de certa forma, a indução desse mecanismo é favorecida pela própria disseminação e viabilidade do *M. leprae*, bem como, pelo efeito de

fragmentos dos bacilos que ainda permanecem no ambiente celular. Consequentemente, a interação entre IL-2 e IFN- γ parece ser o elo para manter a resposta inflamatória dos pacientes multibacilares, especialmente após seis meses de tratamento. Dessa maneira, salienta-se a importância da manutenção do tratamento poliquimioterápico por tempo superior a seis meses para pacientes multibacilares para que o organismo consiga então, estabelecer a homeostase.

Em suma, a análise de trilha permitiu enfatizar os fatores causais diretos e indiretos entre os genes VDR e CAMP sobre marcadores sorológicos no processo de monitoramento e estruturação da resposta imunológica frente ao bacilo, antes e após seis meses de PQT. Esses resultados alertam que seis meses de poliquimioterapia, possam não ser suficientes para o tratamento de pacientes MB e, que pacientes PB possam merecer vigilância após esse período, pois, o padrão de resposta imunológica ainda permanece transitório. Evidencia-se com esse trabalho, que a modulação da resposta imune é induzida por mecanismos genéticos que podem influenciar na grande variação no espectro imunológico na hanseníase. Contudo, os achados são observacionais e, portanto, são necessárias investigações experimentais para elucidar o intrigante mecanismo imunológico dependente de vitamina D na hanseníase.

8. CONCLUSÕES

O estudo em questão contribuiu para identificar pela primeira vez, as relações de causa e efeito envolvendo variáveis associadas à provável via imunológica dependente da expressão gênica do receptor de vitamina D e do peptídeo antimicrobiano catelicidina em pessoas com hanseníase antes e após seis meses de poliquimioterapia. A partir dos resultados obtidos concluiu-se que:

1. existiram fortes e estreitas correlações entre os níveis séricos de 25(OH) vitamina D₃ e catelicidina tanto para pacientes paucibacilares como multibacilares em comparação aos indivíduos dos grupos controle e contatos;

2. evidenciaram-se ricas e complexas correlações entre os níveis séricos de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 para pacientes paucibacilares e, mais intensamente para os multibacilares antes e após a poliquimioterapia;

3. verificaram-se expressões reduzidas de VDR e CAMP para ambos pacientes paucibacilares e multibacilares, independentemente do tempo de tratamento, e de contatos, quando comparados aos indivíduos do grupo controle;

4. as relações causais envolvendo a expressão gênica de VDR e CAMP, destacaram possíveis mecanismos imunológicos de indução da citocina IL-2 antes do tratamento para paucibacilares e multibacilares, e de citocinas do perfil Th1 e Th17 após seis meses de tratamento, na tentativa de eliminação do bacilo e controle da hanseníase.

5. para o grupo controle, o efeito total das variáveis CAMP e IL-17F foi capaz de induzir a citocina IFN- γ , a indução de estado de alerta imunológico como mecanismo de imunoproteção para esses indivíduos.

6. no grupo contatos, as discretas interações entre as citocinas inflamatórias e a correlação forte entre a expressão gênica de CAMP e vitamina D sejam importantes sinais de controle imunológico para indivíduos que estão expostos ao *M. leprae* no ambiente familiar e que podem alertar para o início de evidências sobre a doença, mesmo que na análise de trilha não fora evidenciada relação causal entre as variáveis testadas.

7. a ferramenta de análise de trilha apresentou-se estratégia tangível de investigação das relações de causais e de exposição dos efeitos diretos e indiretos existentes entre a expressão dos genes de VDR e CAMP e demais marcadores sorológicos para o entendimento dos mecanismos de resposta imunológica da hanseníase.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na hanseníase, este é um trabalho pioneiro que aplica análise de trilha ao estudo das inter-relações entre as expressões gênicas do receptor de vitamina D e do peptídeo antimicrobiano e demais marcadores sorológicos. Cientificamente, este estudo oferece robustas contribuições no conhecimento da hanseníase, explorando a relação entre vários componentes da resposta imune e a integração entre eles. Metodologicamente, integra procedimentos padronizados de laboratório e métodos estatísticos, como a análise de trilha, com o objetivo de discutir sobre as relações de causa e efeito entre componentes da resposta imune e assim, compreender sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na doença. Traz novas ideias que fornecem recursos sobre a evolução da doença e identifica etapas limitantes nas vias investigadas, seja de padrão genético ou fenotípico.

Deste modo, tendo em vista os resultados obtidos nesta tese, e como sugestão do trabalho, acredita-se que incorporar a suplementação de vitamina D ao esquema terapêutico desde o início do tratamento medicamentoso para pacientes com hanseníase, possa auxiliar na indução de vias imunológicas por ativar o processo de transcrição dos genes do receptor de vitamina D e do peptídeo antimicrobiano catelicidina, bem como as que levam à síntese de citocinas de células Th1, Th2 e Th17, moléculas que participam da ativação de macrófagos, recrutamento de células T, remodelação e reparo tecidual e, na produção de proteínas antimicrobianas, com vistas à resolução da inflamação e cura na hanseníase.

10. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAFEZ, H.; MOHAMED, E.-E.; ABD-ELGHANY, A. Tissue and blood superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in leprosy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 6, p. 704–708, 19 nov. 2009.
- ABREU, M. A. M. M. DE *et al.* Mycobacterium leprae is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 1, p. 59–64, jan. 2014.
- ADORINI, L.; PENNA, G. Induction of tolerogenic dendritic cells by vitamin D receptor agonists. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 188, p. 251–273, 2009.
- ALTER, A. *et al.* Leprosy as a genetic disease. p. 19–31, 2011.
- ALWIN, D. F.; HAUSER, R. M. The Decomposition of Effects in Path Analysis. **American Sociological Review**, v. 40, n. 1, p. 37, fev. 1975.
- ANTAL, A. S. *et al.* Impact of vitamin D3 on cutaneous immunity and antimicrobial peptide expression. Impact of vitamin D3 on cutaneous immunity and antimicrobial peptide expression. v. 1980, 2011.
- ANTUNES, D. E. *et al.* Differential Expression of IFN- γ , IL-10, TLR1, and TLR2 and Their Potential Effects on Downgrading Leprosy Reaction and Erythema Nodosum Leprosum. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1–14, 7 nov. 2019.
- ARAÚJO, M. G. Leprosy in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373–82, jun. 2003.
- ARAÚJO, S. *et al.* Molecular Evidence for the Aerial Route of Infection of Mycobacterium leprae and the Role of Asymptomatic Carriers in the Persistence of Leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1412–1420, 1 dez. 2016.
- ARAÚJO, T. G. *et al.* A novel vitamin D receptor polymorphism associated with leprosy. **Journal of Dermatological Science**, v. 89, n. 3, p. 304–307, 2018.
- ARBISER, J. L.; MOSCHELLA, S. L.; BOSTON, M. Clofazimine : A review of its medical uses and. p. 241–247, 1995.
- ARRAES, M. L. B. DE M. *et al.* Natural environmental water sources in endemic regions of northeastern Brazil are potential reservoirs of viable Mycobacterium leprae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 12, p. 805–811, dez. 2017.
- BAEKE, F. *et al.* **Vitamin D: Modulator of the immune system** *Current Opinion in Pharmacology*, 2010.
- BALAMAYOORAN, G. *et al.* The armadillo as an animal model and reservoir host for Mycobacterium leprae. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 108–115, jan. 2015.
- BARRETO, J. G. *et al.* Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. **BMC Infectious Diseases**, p. 1–9, 2015.
- BECHELLI, L. M.; SOUZA, P. R. D. E.; QUAGLIATO, R. Correlação entre os resultados da leitura clínica e do exame histopatológico da reação de Mitsuda. **Rev Bras Leprol**, v. 25, n. 1, p. 21–58, 1957.
- BEERS, S.; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among school children as an indicator of leprosy endemicity. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 67, n. 3, p. 243–9, set. 1999.
- BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 117–128, 2002.
- BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: An overview of pathophysiology. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, 2012.

BIKLE, D. D. **Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications** *Chemistry and Biology*, 2014.

BRASIL. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. A. Normas e Manuais Técnicos. [recurso eletrônico]**. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf>

_____. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública 2016**. Brasília: Ministério da Saúde.: [s.n.]. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/323388710/Diretrizes-para-vigilancia-atencao-e-eliminacao-da-hanseniase-como-problema-de-saude-publica-2016>>.

_____. **Guia prático sobre a hanseníase [recurso eletrônico]**. Brasília: Ministério da Saúde: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis., 2017.

_____. **DATASUS. Informação em Saúde. Situação Epidemiológica. Hanseníase. [Internet]**. Brasília: Ministério da Saúde; [s.n.]. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/>>.

_____. **Estratégia Nacional para o Enfrentamento da Hanseníase - 2019-2022. [versão preliminar]**. Brasília: Ministério da Saúde.: [s.n.]. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/27/Estrategia-Nacional-CGHDE-Consulta-Publica-27mar.pdf>>.

_____. **Hanseníase em Minas Gerais. Dados preliminares. DATASUS. 2018**. Brasília: Ministério da Saúde.: [s.n.]. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/dhdat.exe?hanseniase/hantfmg18.def>>.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **The Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209–1219, abr. 2004.

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. 1991–1995, 1 maio 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S. *et al.* The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Leprosy review**, v. 78, n. 1, p. 70–9, mar. 2007.

BULLOCK, W. E. Rifampin in the treatment of leprosy. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, n. August, p. S606–S613, 1983.

BURGESS, P. J. *et al.* Serological tests in leprosy. The sensitivity, specificity and predictive value of ELISA tests based on phenolic glycolipid antigens, and the implications for their use in epidemiological studies. **Epidemiology and Infection**, v. 101, n. 1, p. 159–171, 1988.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CABRAL, P. B. E *et al.* Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal Mycobacterium leprae DNA in individuals with household contact with leprosy. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. e1005–e1010, nov. 2013.

CAMARGO, R. M. DE *et al.* Polymorphisms in the TGFB1 and IL2RA genes are associated with clinical forms of leprosy in Brazilian population. v. 113, n. 12, p. 1–7, 2018.

CANNELL, J. J. *et al.* Epidemic influenza and vitamin D. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 6, p. 1129–1140, 2006.

CANTORNA, M. T. Vitamin D and its role in immunology: Multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 92, n. 1, p. 60–64, 2006.

CARLBERG, C.; CAMPBELL, M. J. Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor. **Steroids**, v. 78, n. 2, p. 127–136, 2013.

CASANOVA, J.; ABEL, L. Human genetics of infectious diseases: Unique insights into immunological redundancy. **Seminars in Immunology**, v. 36, n. 1, p. 1–12, abr. 2018.

- CASSIRER-COSTA, F. *et al.* Cytokines as biomarkers to monitoring the impact of multidrug therapy in immune response of leprosy patients. **Cytokine**, v. 97, n. May, p. 42–48, 2017.
- CEMERSKI, S. *et al.* Reactive Oxygen Species Differentially Affect T Cell Receptor-signaling Pathways *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19585–19593, 31 maio 2002.
- CHAITANYA, S. *et al.* Increased Serum Circulatory Levels of Interleukin 17F in Type 1 Reactions of Leprosy. **Journal of Clinical Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1415–1420, 31 dez. 2012.
- CHATTREE, V.; KHANNA, N.; RAO, D. N. Alterations in T cell signal transduction by *M. leprae* antigens is associated with downregulation of second messengers PKC, calcium, calcineurin, MAPK and various transcription factors in leprosy patients. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 8, p. 2066–2077, mar. 2007.
- CHAVES, A. T. *et al.* Regulatory T cells: Friends or foe in human *Mycobacterium leprae* infection? **Immunobiology**, v. 223, n. 4–5, p. 397–404, abr. 2018.
- CHEN, X. *et al.* Antimicrobial peptides human β -defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 2, p. 434–444, 2007.
- CHO, S. N. *et al.* Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 1, p. 138–42, jan. 2001.
- COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, fev. 2001.
- CORREIA, A. *et al.* Ethnic aspects of vitamin D deficiency. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 540–544, 2014.
- CORTELA, D. C. B. *et al.* Inflammatory Mediators of Leprosy Reactional Episodes and Dental Infections: A Systematic Review. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–15, 2015.
- CORTELA, D. C. B. *et al.* Inflammatory cytokines in leprosy reactions and periodontal diseases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 60, n. II, p. e68, 2018.
- CORTES, T. R.; FAERSTEIN, E.; STRUCHINER, C. J. Utilização de diagramas causais em epidemiologia: um exemplo de aplicação em situação de confusão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 8, p. 1–13, 2016.
- COSTA, M. B. *et al.* In situ T regulatory cells and Th17 cytokines in paired samples of leprosy type 1 and type 2 reactions. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0196853, 8 jun. 2018.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics - doi: 10.4025/actasciagrion.v35i3.21251. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 35, n. 3, 11 jul. 2013.
- CUNHA, C. *et al.* A historical overview of leprosy epidemiology and control activities in amazonas, brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. September 2014, p. 55–62, 2015.
- CURTISS III, R. *et al.* Leprosy research in the post-genome era. **Leprosy Review**, v. 72, n. 1, 2001.
- DAVIDSON, T. S. *et al.* Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 178, n. 7, p. 4022–6, 2007.
- DIXON, B. M. *et al.* Positive correlation between circulating and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults. 2012.
- DÜRR, U. H. N.; SUDHEENDRA, U. S.; RAMAMOORTHY, A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1758, n. 9, p. 1408–25, set. 2006.
- DWIVEDI, V. P. *et al.* Diet and nutrition: An important risk factor in leprosy. **Microbial Pathogenesis**, p. 103714, 2019.

- EICHELMANN, K. *et al.* Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 104, n. 7, p. 554–563, 2013.
- EIDT, L. M. Breve história da hanseníase : sua expansão do mundo para as Américas , o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira Trajectory in the Brazilian Public Health. **Saude soc.**, v. 13, n. 2, p. 76–88, 2004.
- EIGLMEIER, K. *et al.* The integrated genome map of Mycobacterium leprae. **Leprosy review**, v. 72, n. 4, p. 462–9, dez. 2001.
- FEENSTRA, S. G. *et al.* Recent Food Shortage Is Associated with Leprosy Disease in Bangladesh: A Case-Control Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. e1029, 10 maio 2011.
- FERNANDO, S. L.; BRITTON, W. J. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. **Immunology and Cell Biology**, v. 84, n. 2, p. 125–137, 2006.
- FERREIRA, C.E.S.; MAEDA, S.S.; BATISTA, M.C.; LAZARETTI-CASTRO, M.; VASCONCELLOS, L.S.; MADEIRA, M.; SOARES, L.M.; BORBA, V.Z.C.; SILVA, B.C.C.; MOREIRA, C. A. **Intervalos de Referência da Vitamina D - 25(OH)D. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial e da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia.**[recurso eletrônico]. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <http://bibliotecasbpc.org.br/arcs/pdf/PosicionamentoOficial_SBPCML_SBEM_2018.pdf>.
- FITNESS, J. *et al.* Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 3, p. 330–40, set. 2004.
- FITNESS, J.; TOSH, K.; HILL, A. V. S. Genetics of susceptibility to leprosy. p. 441–453, 2002.
- FONSECA, A. B. DE L. *et al.* The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2017.
- FONTELLES, M. J. **Bioestatística aplicada à pesquisa experimental**. São Paulo: Livraria da Física, 2012.
- FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **An Bras Dermatol.**, v. 74, n. 2, p. 113–9, 1999.
- FOSS, N. T.; MOTTA, A. C. F. Leprosy, a neglected disease that causes a wide variety of clinical conditions in tropical countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 28–33, 2012.
- FRANCO-PAREDES, C.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Unsolved matters in leprosy: A descriptive review and call for further research. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2016.
- GARBINO, J. A. *et al.* Primary neural leprosy: systematic review. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 71, n. 6, p. 397–404, jun. 2013.
- GASCHIGNARD, J. *et al.* Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004345, 24 maio 2016.
- GELUK, A. Correlates of immune exacerbations in leprosy. **Seminars in Immunology**, v. 39, n. June, p. 111–118, 2018.
- GOMBART, A. F.; BORREGAARD, N.; KOEFFLER, H. P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D 3. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 9, p. 1067–1077, jul. 2005.
- GOMEZ-VALERO, L. *et al.* Reconstructing the ancestor of Mycobacterium leprae: The dynamics of gene loss and genome reduction. **Genome Research**, v. 17, n. 8, p. 1178–1185, 10 jul. 2007.
- GONÇALVES, A. Realities of leprosy control: updating scenarios. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 3, p. 611–621, set. 2013.

- GONÇALVES, A.; MANTELLINI, G. G.; PADOVANI, C. R. Leprosy control: perspectives; epidemiological and operational aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 6, p. 311–315, dez. 2010.
- GONÇALVES CASTRO, L. C. O sistema endocrinológico vitamina D. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 8, p. 566–575, 2011.
- GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: Diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, n. 6, p. 269–290, 2008.
- GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 363–375, ago. 2002.
- GOULART, L. R.; FERREIRA, F. R.; GOULART, I. M. B. Interaction of TaqI polymorphism at exon 9 of the vitamin D receptor gene with the negative lepromin response may favor the occurrence of leprosy. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 91–98, 2006.
- GRIGAT, J. *et al.* Chemoattraction of Macrophages, T Lymphocytes, and Mast Cells Is Evolutionarily Conserved within the Human α -Defensin Family. 2019.
- GROSSI, M. A. D. F. *et al.* A influência do teste sorológico ML Flow na classificação da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. suppl 2, p. 34–38, 2008.
- GROSSI, M. A. F. Episódios Reacionais. In: LYON, S.; GROSSI, M. A. F. (Ed.). **Hanseníase**. Rio de Janeiro: Medbook, 2013. p. 191–196.
- HACKER, M. DE A. *et al.* Characteristics of leprosy diagnosed through the surveillance of contacts: a comparison with index cases in Rio de Janeiro, 1987-2010. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. suppl 1, p. 49–54, dez. 2012.
- HUNTER; BRENNAN. Further specific extracellular phenolic glycolipid antigens and a related diacylphthiocerol from Mycobacterium leprae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 12, p. 7556–7562, 1983.
- HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 16, p. 9272–9, 5 jun. 1990.
- HUNTER, S. W.; GAYLOR, H.; BRENNAN, P. J. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 26, p. 12345–12351, 1986.
- HYMØLLER, L.; JENSEN, S. K. Vitamin D analysis in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) with C30 reversed phase column and UV detection - Easy and acetonitrile-free. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 14, p. 1835–1841, 2011.
- JEFFERY, L. E. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 Combine to Inhibit T Cell Production of Inflammatory Cytokines and Promote Development of Regulatory T Cells Expressing CTLA-4 and FoxP3. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 9, p. 5458–5467, 2009.
- JOB, C. K. *et al.* Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518–21, mar. 2008.
- JOLY, S. *et al.* Human α -Defensins 2 and 3 Demonstrate Strain-Selective Activity against Oral Microorganisms. v. 42, n. 3, p. 1024–1029, 2004.
- KAHLENBERG, J. M.; KAPLAN, M. J. Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 10, p. 4895–4901, 15 nov. 2013.
- KEARNS, M. D. *et al.* Impact of Vitamin D on Infectious Disease : A Systematic Review of Controlled Trials. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 349, n. 3, p. 245–62, 2015.
- KECHICHIAN, E.; EZZEDINE, K. Vitamin D and the Skin: An Update for Dermatologists. **American**

Journal of Clinical Dermatology, v. 19, n. 2, p. 223–235, 2018.

KIM, E. W. *et al.* Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium leprae*. p. 1–15, 2018.

KIM, H. *et al.* DNA gyrase could be a crucial regulatory factor for growth and survival of *Mycobacterium leprae*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

KOHAMA, K. *et al.* Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Renal Osteodystrophy in Patients on Maintenance Hemodialysis Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Renal Osteodystrophy in Patients on Maintenance Hemodialysis. n. May, 2000.

KOSGEI, B. K.; YUN-PENG, L. Progress in research on immunological mechanism of leprosy. **Asian Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 1–5, 28 ago. 2015.

KRUTZIK, S. R. *et al.* Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 525–532, 14 maio 2003.

KRUTZIK, S. R. *et al.* TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 11, n. 6, p. 653–660, 8 jun. 2005.

KUMAR, A.; PARKASH, O.; GIRDHAR, B. K. Analysis of Antigens of *Mycobacterium leprae* by Interaction to Sera IgG, IgM, and IgA Response to Improve Diagnosis of Leprosy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

KUMAR, B.; DOGRA, S.; KAUR, I. Epidemiological Characteristics of Leprosy Reactions: 15 Years Experience from North India. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 72, n. 2, p. 125, 2004.

LAGISHETTY, V.; LIU, N. Q.; HEWISON, M. Molecular and Cellular Endocrinology Vitamin D metabolism and innate immunity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 347, n. 1–2, p. 97–105, 2011.

LARCOMBE, L. *et al.* **Vitamin D in a Northern Canadian First Nation Population: Dietary Intake, Serum Concentrations and Functional Gene Polymorphisms** PLoS ONE, 2012.

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

LEE, C. C. *et al.* Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. **Biophysical Journal**, v. 100, n. 7, p. 1688–1696, 2011.

LESTER, W. Rifampin: a semisynthetic derivative of rifamycin--a prototype for the future. **Annual review of microbiology**, v. 26, p. 85–102, 1972.

LEVIS, W. R. *et al.* Serodiagnosis of leprosy: relationships between antibodies to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I and protein antigens. **Journal of clinical microbiology**, v. 24, n. 6, p. 917–21, 1986.

LIMA, P. O. D. P. *et al.* Correlation between clinical tests and electroneuromyography for the diagnosis of leprosy neuropathy. **Leprosy review**, v. 87, n. 1, p. 60–70, mar. 2016.

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

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

LYON-MOURA, A. C.; PEDROSA, M. S. Histopatologia da Hanseníase. In: LYON, S.; GROSSI, M. A. F. (Ed.). **Hanseníase**. 1. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2013. p. 95–103.

LYON, S. Classificação e Formas Clínicas da Hanseníase. In: LYON, S.; GROSSI, M. A. F. (Ed.). **Hanseníase**. 1. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2013. p. 57–66.

LYRIO, E. C. D. *et al.* Interaction of *Mycobacterium leprae* with the HaCaT human keratinocyte cell line: New frontiers in the cellular immunology of leprosy. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 7, p.

536–542, 2015.

MACEDO, A. C. DE *et al.* Serum anti-phenolic glycolipid-1 IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys? **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 32, n. 3, p. e22276, mar. 2018.

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

MADRID. **Memoria del VI Congreso Internacional de Leprología**. Memoria del VI Congreso Internacional de Leprología. **Anais...**Madrid: Asociacion Internacional de La Lepra, 1953

MAGGINI, S. *et al.* Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. SUPPL. 1, p. 29–35, 2007.

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

MARÇAL, P. H. F. *et al.* Utility of immunoglobulin isotypes against LID-1 and NDO-LID for, particularly igG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p. 1–8, 2018.

MARQUES, C. D. L. *et al.* A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 1, p. 67–80, 2010.

MARQUES, L. É. C. *et al.* Evaluation of 16S rRNA qPCR for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal secretion and skin biopsy samples from multibacillary and paucibacillary leprosy cases. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 2, p. 72–78, 17 fev. 2018.

MARRI, P. R.; BANNANTINE, J. P.; GOLDING, G. B. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 6, p. 906–925, nov. 2006.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Evaluation of Real-Time and Conventional PCR Targeting Complex 85 Genes for Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Skin Biopsy Samples from Patients Diagnosed with Leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3154–3159, 1 set. 2006.

_____. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2124–2130, 1 jul. 2009.

MARTINEZ, A. N. *et al.* PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2655, 10 abr. 2014.

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

MARTINIUK, F. *et al.* Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **Journal of drugs in dermatology : JDD**, v. 11, n. 5, p. 626–30, maio 2012.

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

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

MCDONALD, R. P. Path Analysis with Composite Variables. **Multivariate Behavioral Research**, v. 31, n. 2, p. 239–270, abr. 1996.

MODDERMAN, E. S. *et al.* Dapsone levels after oral therapy and weekly oily injections in Ethiopian leprosy patients. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 51, n. 2, p. 191–6, jun. 1983.

- MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 828–832, 1994.
- MOET, F. J. *et al.* A study on transmission and a trial of chemoprophylaxis in contacts of leprosy patients: design, methodology and recruitment findings of COLEP. **Leprosy review**, v. 75, n. 4, p. 376–88, dez. 2004.
- MOET, F. J. *et al.* Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Leprosy review**, v. 75, n. 4, p. 310–26, dez. 2004.
- MONOT, M. *et al.* On the origin of leprosy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5724, p. 1040–2, 13 maio 2005.
- MORA, J. R.; IWATA, M.; ANDRIAN, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 685–698, set. 2008.
- MORAES, M. O. *et al.* Genetics of host response in leprosy. **Leprosy review**, v. 77, n. 3, p. 189–202, set. 2006.
- MORAN-AUTH, Y. *et al.* **Vitamin D status and gene transcription in immune cells** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2013.
- MOUBASHER, A. E. A. *et al.* Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 10, p. 733–740, 5 out. 1998.
- NEELA, V. S. K. *et al.* Association of Taq I, Fok I and Apa I polymorphisms in Vitamin D Receptor (VDR) gene with leprosy. **Human Immunology**, v. 76, n. 6, p. 402–405, 2015.
- NETER, J.; KUTER, M. H.; NACHTSHEIM, C. J.; WASSERMAN, W. **Applied Linear Regression Models**. 3. ed. [s.l.] Irwin, 1996.
- OCA, E. P. M. Human polymorphisms as clinical predictors in leprosy. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2011, 2011.
- OKTARIA, S. *et al.* Dietary diversity and poverty as risk factors for leprosy in Indonesia: A case-control study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006317, 13 mar. 2018.
- OLIVEIRA, A. L. G. *et al.* Vitamin D receptor expression and hepcidin levels in the protection or severity of leprosy: a systematic review. **Microbes and infection**, v. 19, n. 6, p. 311–322, 2017.
- OLIVEIRA, I. V. P. DE M.; DEPS, P. D.; ANTUNES, J. M. A. DE P. Armadillos and leprosy: from infection to biological model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, n. August, p. 1–7, 2019.
- OLIVEIRA JUNIOR, L. R. DE *et al.* Association of vitamin D3, VDR gene polymorphisms, and LL-37 with a clinical form of Chagas Disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–10, 2019.
- OMS. **Estratégia global para hanseníase 2016–2020: aceleração rumo a um mundo sem hanseníase**. Nova Deli: Escritório Regional para o Sudeste Asiático, 2017.
- OSKAM, L.; SLIM, E.; BÜHRER-SÉKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. **Leprosy review**, v. 74, n. 3, p. 196–205, set. 2003.
- PANDA, S. *et al.* Association of Fok1 VDR polymorphism with Vitamin D and its associated molecules in pulmonary tuberculosis patients and their household contacts. **Scientific Reports**, p. 1–10, 2019.
- PASSOS-VÁZQUEZ, C. M. *et al.* Micronutrients influencing the immune response in leprosy. **Nutricion hospitalaria**, v. 29, n. 1, p. 26–36, 1 jan. 2014.
- PATROCÍNIO, L. G. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 311–316, jun. 2005.
- PEPINELI, A. C. *et al.* Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated With Leprosy in Southern Brazil. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. October, p. 1–6, 4 out. 2019.

- PEREIRA, A. C. *et al.* Genetic , epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for A 819C / T in leprosy susceptibility. p. 174–180, 2009.
- PINHEIRO, R. O. *et al.* Innate Immune Responses in Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, p. 1–15, 28 mar. 2018.
- PINTO, A. C. V. D. *et al.* Profile of leprosy in children under 15 years of age monitored in a Brazilian referral center (2004-2012). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 4, p. 580–582, ago. 2017.
- PIRIS, A.; LOBO, A. Z. C.; MOSCHELLA, S. L. Global dermatopathology: Hansen's disease - current concepts and challenges. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 37, p. 125–136, abr. 2010.
- POLYCARPOU, A.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. A Systematic Review of Immunological Studies of Erythema Nodosum Leprosum. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 13 mar. 2017.
- PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Leprosy : a genetic disease ? *. **An Bras Dermatol.**, v. 82, n. 5, p. 451–9, 2007.
- PRIETL, B. *et al.* Vitamin D and Immune Function. v. 25, p. 2502–2521, 2013.
- QUARESMA, J. A. S. *et al.* T-helper 17 cytokines expression in leprosy skin lesions. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 565–567, ago. 2015.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. A classification of leprosy for research purposes. **Leprosy review**, v. 33, p. 119–128, 1962.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 34, n. 3, p. 255–73, 12 jul. 1966.
- ROBBINS, G. *et al.* Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B . C .). v. 4, n. 5, p. 1–8, 2009.
- ROY, S. *et al.* Association of Vitamin D Receptor Genotype with Leprosy Type. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 1, p. 187–191, 1999.
- SADHU, S. *et al.* Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004338, 11 jan. 2016.
- SAINI, C. *et al.* Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004592, 1 abr. 2016.
- _____. T helper cells in leprosy: An update. **Immunology Letters**, v. 184, p. 61–66, abr. 2017.
- _____. Regulatory T cells antagonize proinflammatory response of IL-17 during cutaneous tuberculosis. **Journal of Inflammation Research**, v. Volume 11, p. 377–388, set. 2018.
- SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, 2013.
- SANTOS, D. F. *et al.* Revisiting primary neural leprosy: Clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006086, 27 nov. 2017.
- SANTOS, D. F. DOS *et al.* Molecular, immunological and neurophysiological evaluations for early diagnosis of neural impairment in seropositive leprosy household contacts. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006494, 21 maio 2018.
- SANTOS, M. B. *et al.* Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 1, p. 40–49, jul. 2017.
- SANTOS, M. B. *et al.* Clinical and epidemiological indicators and spatial analysis of leprosy cases in

- patients under 15 years old in an endemic area of Northeast Brazil: an ecological and time series study. **BMJ Open**, v. 9, n. 7, p. e023420, 27 jul. 2019.
- SANTOS, V. S. *et al.* Leprosy and Disability in Children Younger Than 15 Years in an Endemic Area of Northeast Brazil. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 3, p. e44–e47, mar. 2015.
- SARKAR, S. *et al.* Role of Vitamin D in cytotoxic T lymphocyte immunity to pathogens and cancer. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 53, n. 2, p. 132–145, 2016.
- SARNO, E. N. *et al.* Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1054–1059, dez. 2012.
- SCHAUBER, J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 122, n. 2, p. 261–266, ago. 2008.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 5 jun. 2008.
- SCHRÖDER, J.-M. The role of keratinocytes in defense against infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 106–110, abr. 2010.
- SCOLLARD, D. M. *et al.* The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, 1 abr. 2006.
- SELVARAJ, P. *et al.* Regulatory Role of Vitamin D Receptor Gene Variants of BsmI, ApaI, TaqI, and FokI Polymorphisms on Macrophage Phagocytosis and Lymphoproliferative Response to Mycobacterium tuberculosis Antigen in Pulmonary Tuberculosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 24, n. 5, p. 523–532, 2004.
- SELVARAJ, P. **Vitamin D, Vitamin D Receptor, and Cathelicidin in the Treatment of Tuberculosis**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 86
- SHARMA, R. *et al.* Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2127–2134, dez. 2015.
- SIELING, P. A. *et al.* Conserved Mycobacterial Lipoglycoproteins Activate TLR2 but Also Require Glycosylation for MHC Class II-Restricted T Cell Activation. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5833–5842, 1 maio 2008.
- SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine Patterns at the Site of Mycobacterial Infection. **Immunobiology**, v. 191, n. 4–5, p. 378–387, jan. 1994.
- SILVA, C. A. M. *et al.* Interaction of Mycobacterium leprae with Human Airway Epithelial Cells: Adherence, Entry, Survival, and Identification of Potential Adhesins by Surface Proteome Analysis. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 7, p. 2645–2659, jul. 2013.
- SILVA, L. M. *et al.* Immunohistochemical analysis of the expression of cellular transcription NFκB (p65), AP-1 (c-Fos and c-Jun), and JAK/STAT in leprosy. **Human Pathology**, v. 46, n. 5, p. 746–752, maio 2015.
- SILVA, M. B. DA *et al.* Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006532, 28 jun. 2018.
- SILVA, O. N. *et al.* Host-defense peptides and their potential use as biomarkers in human diseases. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 9, p. 1666–1671, 2018.
- SINGH, R.K.; CHAUDHARY, B. D. **Biometrical methods in quantitative genetic analysis**. Nova Delhi: [s.n.].
- SINGH, I. *et al.* VDR polymorphism, gene expression and vitamin D levels in leprosy patients from North Indian population. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006823, 27 nov. 2018.
- SINGH, P.; COLE, S. T. Mycobacterium leprae : genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57–71, jan. 2011.

- SOEBONO, H.; KLATSER, P. R. A seroepidemiological study of leprosy in high- and low-endemic Indonesian villages. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 59, n. 3, p. 416–25, set. 1991.
- SOUSA, J. R. DE; SOTTO, M. N.; SIMÕES QUARESMA, J. A. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 18–21, 28 nov. 2017.
- SPENCER, J. S. *et al.* Analysis of Antibody Responses to Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins To Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 2, p. 260–267, fev. 2011.
- STEFANI, M. M. A. *et al.* Leprosy survey among rural communities and wild armadillos from Amazonas state, Northern Brazil. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0209491, 10 jan. 2019.
- TABOURET, G. *et al.* Mycobacterium leprae Phenoglycolipid-1 Expressed by Engineered M. bovis BCG Modulates Early Interaction with Human Phagocytes. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001159, 21 out. 2010.
- TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 26–37, 2015.
- TAYLOR, G. M. *et al.* Mycobacterium leprae genotype amplified from an archaeological case of lepromatous leprosy in Central Asia. **Journal of Archaeological Science**, v. 36, n. 10, p. 2408–2414, 2009.
- TECLE, T.; TRIPATHI, S.; HARTSHORN, K. L. Defensins and cathelicidins in lung immunity. **Innate Immunity**, v. 16, n. 3, p. 151–159, 2010.
- TEIXEIRA, M. A. G.; SILVEIRA, V. M. DA; FRANÇA, E. R. DE. Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares, atendidos em dois centros de referência para hanseníase, na Cidade de Recife, Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 287–292, jun. 2010.
- TELES, R. M. B. *et al.* Interleukin-4 Regulates the Expression of CD209 and Subsequent Uptake of Mycobacterium leprae by Schwann Cells in Human Leprosy. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4634–4643, 1 nov. 2010.
- _____. Type I Interferon Suppresses Type II Interferon-Triggered Human Anti-Mycobacterial Responses. **Science**, v. 339, n. 6126, p. 1448–1453, 22 mar. 2013.
- TIÓ-COMA, M. *et al.* Detection of Mycobacterium leprae DNA in soil: multiple needles in the haystack. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3165, 28 dez. 2019.
- TJABRINGA, G. S. *et al.* The Antimicrobial Peptide LL-37 Activates Innate Immunity at the Airway Epithelial Surface by Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6690–6696, 15 dez. 2003.
- TRUMAN, R. W. *et al.* Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 17, p. 1626–1633, 28 abr. 2011.
- TRUMAN, R. W.; KRAHENBUHL, J. L. Viable M. leprae as a research reagent. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 69, n. 1, p. 1–12, mar. 2001.
- TURANKAR, R. P. *et al.* Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP , 16S rRNA , rpoT and Sod A gene targets for detection of M . leprae DNA from clinical and environmental samples. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 54–59, 2015.
- TURNER, D.; MCGUINNESS, S.; LEDER, K. Leprosy: diagnosis and management in a developed setting. **Internal Medicine Journal**, v. 45, n. 1, p. 109–112, jan. 2015.
- TURNER, J. *et al.* Activities of LL-37, a Cathelin-Associated Antimicrobial Peptide of Human Neutrophils. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 9, p. 2206–2214, 1 set. 1998.

- VANDAMME, D. *et al.* A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 1, p. 22–35, 2012.
- VEEN, V. VAN *et al.* Anterior Cingulate Cortex, Conflict Monitoring, and Levels of Processing. **NeuroImage**, v. 14, n. 6, p. 1302–1308, dez. 2001.
- VELARDE FÉLIX, J. S. *et al.* Relación del polimorfismo TaqI del gen del receptor de la vitamina D con la lepra lepromatosa en población mexicana. **Salud Pública de México**, v. 51, n. 1, p. 59–61, 2009.
- VELDMAN, C. M.; CANTORNA, M. T.; DELUCA, H. F. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in the immune system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 374, n. 2, p. 334–338, 2000.
- VIDAL PESSOLANI, M. C. *et al.* Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? **Microbes and Infection**, v. 5, n. 7, p. 677–684, jun. 2003.
- VIEIRA, M. C. A. *et al.* Leprosy in children under 15 years of age in Brazil: A systematic review of the literature. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, p. e0006788, 2 out. 2018.
- WAGENAAR, I. *et al.* Diet-Related Risk Factors for Leprosy: A Case-Control Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1–15, 2015.
- WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, v. 77–78, n. 1, p. 103–121, 11 set. 2006.
- WANG, T.-T. *et al.* Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 2909–2912, 2004.
- WANG, T. *et al.* Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression 1. **J Immunol**, v. 173, p. 2909–2912, 2013.
- WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 39–62, jan. 2011.
- WHITE, J. H. Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 3837–3843, 2008.
- _____. Vitamin D and human health: More than just bone. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 10, p. 623, 2013.
- WHO. **Weekly epidemiological record. global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world**. Nova Deli: World Health Organisation. 2019: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/wer>>.
- WINTERGERST, E. S.; MAGGINI, S.; HORNIG, D. H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 51, n. 4, p. 301–323, 2007.
- YAMAMURA, M. *et al.* Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277–279, 11 out. 1991.
- YAMSHCHIKOV, A. V *et al.* Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 603–611, 1 set. 2010.
- YANG, L. *et al.* Protective role of the vitamin D receptor. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 160–166, 2012.
- YEHUDA, S.; ELI, T. The Role of Vitamin D in Regulating Immune Responses. **Israel Medical Association Journal**, v. 12, n. march, p. 2–3, 2010.
- ZAVALA, K. *et al.* Intrinsic activation of the vitamin D antimicrobial pathway by *M. leprae* infection is inhibited by type I IFN. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 10, p. e0006815, 2018.
- ŻELECHOWSKA, P.; AGIER, J.; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, E. Endogenous antimicrobial factors in the treatment of infectious diseases. **Central European Journal of Immunology**, v. 4, n. 4, p. 419–425, 2016.

ZHANG, F.-R. *et al.* Genomewide association study of leprosy. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 27, p. 2609–18, 2009.

ZHENG, Y. *et al.* Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human α -defensins from neutrophils. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 6, p. 1124–1131, 2007.

ZUIDEMA, J.; HILBERS-MODDERMAN, E. S. M.; MERKUS, F. W. H. M. Clinical Pharmacokinetics of Dapsone. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 11, n. 4, p. 299–315, 1986.

11. ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do estudo com pacientes de hanseníase pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 14887414.0.0000.5149

Interessado(a): Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 12 de março de 2014, o projeto de pesquisa intitulado **"Caracterização dos mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo Mycobacterium leprae e a sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B – Aprovação do estudo com contatos de casos-índice pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFMG



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 54988016.0.0000.5149

**Interessado(a): Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina- UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 20 de abril de 2016, o projeto de pesquisa intitulado “ **Avaliação de contatos de casos-índice de hanseníase em um Centro de Referência em Belo Horizonte- Minas Gerais**” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

**Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO C - Parecer Consubstanciado do CEP – Plataforma Brasil

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização dos mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo *Mycobacterium leprae* e a sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase.

Pesquisador: Manoel Otávio da Costa Rocha

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 14887414.0.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Faculdade de Medicina da UFMG

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 552.857

Data da Relatoria: 14/03/2014

Apresentação do Projeto:

A hanseníase se manifesta em diferentes formas clínicas, que são determinadas pelo delineamento da resposta imune do indivíduo infectado. Os pacientes com a forma clínica tuberculóide (TT) exibem uma vigorosa resposta celular, controlando a proliferação dos bacilos, e, assim, apresentando lesões limitadas. Os pacientes com a forma clínica lepromatosa (LL), apresentam resposta humoral potente, mas com proliferação disseminada do bacilo, o que resulta em lesões difusamente distribuídas na pele. Nos pacientes borderlines, borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatoso (BL), a progressiva redução da resposta imune mediada por célula é acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosas, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos. As formas borderline são clinicamente instáveis, e os pacientes demonstram mudanças lentas em direção a forma clínica lepromatosa. Pacientes com a forma clínica tuberculóide possuem uma vigorosa resposta imune celular contra o *M. leprae*, o que limita a doença a lesões na pele bem definidas e reduzidas. As lesões apresentam poucas bactérias e são infiltradas por linfócitos CD4+ produtores de interferon que formam granulomas próximos aos nervos da derme. A intensa resposta celular é confirmada por linfócitos T proliferativos e citocinas presentes no meio. Os pacientes com a forma clínica lepromatosa têm uma resposta imune caracterizada por ausência de resposta celular específica, o que leva à proliferação

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

Continuação do Parecer: 552.857

descontrolada do bacilo e, com isso, muitas lesões e uma intensa infiltração da pele e nervos. A pele contém macrófagos cheios de bactéria, poucos linfócitos T CD4+ e CD8+ e não possui granulomas organizados; além disso, o paciente possui altos títulos de anticorpos específicos contra antígenos do *M. leprae*, porém esses anticorpos não conferem a proteção da doença. Nesses pacientes, verifica-se, ainda, aumento dos níveis de IgG e IgE e de linfócitos B no sangue periférico. A imunidade celular exerce papel chave, uma vez que, ela protege contra a disseminação do bacilo, como acontece na forma tuberculóide. Por razões não entendidas, essa imunidade não somente não protege os indivíduos que desenvolvem a forma tuberculóide, como é exacerbada e está diretamente envolvida em causar a patologia do nervo e pele. Vários estudos buscam compreender os mecanismos envolvidos no controle e/ou desenvolvimento das formas graves da hanseníase, na tentativa de encontrarem marcadores de evolução da morbidade, prognóstico e resposta terapêutica, permitindo, assim, a estratificação de risco, identificação de pacientes que devam ser acompanhados e que mereçam tratamento de forma diferenciada. A seguinte hipótese será investigada: existe associação entre mecanismos imunológicos com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica na hanseníase. O projeto apresentado refere-se ao estudo imunológico de pacientes com hanseníase do Serviço de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar os mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo *M. leprae* e a sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase.

Objetivos Secundários:

a) Identificar marcadores fenotípicos dos leucócitos do sangue periférico de pacientes com diferentes formas da doença; b) Avaliar a presença de quimiocinas e citocinas plasmáticas dos pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase; c) Avaliar a presença das células reguladoras CD4+CD25+ nas diferentes formas clínicas da hanseníase; d) Avaliar a presença de polimorfismo de genes associados à imunorregulação e correlacioná-los com as formas clínicas da hanseníase; e) Avaliar a expressão gênica de moléculas de sinalização intracelular e fatores de transcrição associados aos inflamassomos em células da imunidade inata (neutrófilos e monócitos/macrófagos) dos pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase; f) Avaliar a presença de células e moléculas imunomoduladoras em fragmentos de pele dos pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase; g) Avaliar a associação entre o índice baciloscópico e a presença de bacilos no exame histopatológico em relação ao déficit do teste de sensibilidade

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

Continuação do Parecer: 552.857

térmica em lesões cutâneas; h) Correlacionar o estado imunológico com dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase; i) Associar o padrão imunológico do paciente com o tempo da resposta terapêutica, evidenciado pela melhora das manifestações dermato neurológicas, e o ritmo de decaimento do índice baciloscópico; j) Correlacionar a patogenia, expressão clínica e resposta terapêutica dos surtos reacionais tipos 1 e 2 da hanseníase com o estado imunológico do paciente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

De acordo com o projeto a grande maioria dos pequenos procedimentos de biópsia de pele são muito seguros, tendo baixo risco de sangramento ou infecção no local da biópsia. Todos os pacientes serão orientados a procurar o nosso Serviço caso ocorra febre ou dor, edema, rubor ou sangramento no local da biópsia. A coleta de sangue será realizada por profissional de Enfermagem altamente capacitado para a execução do procedimento. O riscos são mínimos e incluem edema, dor e hematoma no local de punção. Todos os pacientes serão orientados quanto às condutas a serem tomadas diante desses eventos adversos.

Benefícios:

O estudo contribuirá para melhor entendimento da imunopatogenia da hanseníase. A melhor compreensão deste processo auxiliará no manejo e acompanhamento de novos casos de hanseníase, uma vez que pacientes que apresentem fatores preditivos de incapacidade física poderão ser acompanhados mais de perto e serem orientados desde o início sobre medidas para prevenção de incapacidades.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para realizar a pesquisa serão coletadas amostras 5 mL de sangue periférico em EDTA para realização da contagem global e diferencial de leucócitos. Para as demais avaliações serão coletados 30 mL de sangue periférico em tubos Vacutainer® Sodium Heparin. Os níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas serão quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA), conforme sugerido pelo fabricante. Análise de marcadores de superfície e intracitoplasmáticos será realizada por reações de imunofluorescência através da citometria de fluxo. As moléculas de superfície a serem analisadas serão: CD4, CD8, CD14, CD80, CD86, CD28, CD25, PD-1, LAG-3, TIM-3, ICOS, CTLA-4, HLA-DR, CD27, CCR6, VPAC1 e VPAC2. As moléculas intracitoplasmáticas a serem analisadas serão: IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN-gama, TGF-G, TNF-alfa. A biópsia será realizada pelos médicos do Ambulatório de Dermatologia conforme rotina já estabelecida no Serviço. O procedimento é habitualmente realizado através de punch descartável

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

Continuação do Parecer: 552.857

de 3 mm de diâmetro, sob antissepsia e com anestesia local com lidocaína a 2%. A imunofluorescência direta para os marcadores intra e extracelulares será realizada utilizando-se cortes de 5 micrometros de espessura em lâminas siliconadas. Após a realização dos cortes em criostato e montagem das lâminas, serão realizadas as reações de imunofluorescência. Em uma das lâminas de cada paciente, serão adicionados controles de isotipos para descartarmos a ocorrência de marcação inespecífica. As imagens serão obtidas por microscopia confocal. Os pacientes receberão informações básicas sobre o procedimento antes de seu início, sendo submetidos a demonstrações preliminares, para familiarização com os estímulos aplicados, em seguida realiza-se o exame na lesão suspeita e logo após a pele contralateral. Pelo método dos limites, já configurado no equipamento permitindo determinar os limiares de sensibilidade térmica através de um estímulo contínuo e progressivo a partir da temperatura de base do aparelho, que é interrompido quando o paciente anuncia sua percepção. Serão utilizados os dados dos prontuários e das fichas de notificação/ investigação de Hanseníase do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Serão incluídos no estudo 300 pacientes de hanseníase diagnosticados e acompanhados no Serviço de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, ou referenciados ao mesmo, no período compreendido entre 2013 e 2014.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados: Projeto de Pesquisa; Folha de Rosto Assinada pelo Diretor da Faculdade de Medicina da UFMG; Parecer Consubstanciado Aprovado pelo Programa de Pós-Graduação da Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG; Carta de Aprovação da Câmara do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG; Carta de Anuência do Hospital Eduardo Menezes; Parecer Consubstanciado do Hospital Eduardo Menezes; Carta de Anuência do Núcleo de Ensino e pesquisa do Hospital Eduardo de Menezes; Carta de Anuência do Centro de Pesquisa Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ; TCLE.

Entre os documentos apresentados consta aprovação do Comitê de Ética do Hospital Eduardo de Menezes 20/02/2013 (CAAE. 09805912.5.0000.5149). Esta aprovação refere-se ao estudo de avaliação de fatores associados a incapacidade física em casos novos de hanseníase, notificados em serviço de referência de Belo Horizonte, no período de 2005-2010.

Considerações sobre o TCLE: redigido em forma de convite, linguagem acessível, explicita os objetivos e procedimentos, garante confidencialidade dos dados, direito a recusa, descreve os possíveis riscos e benefícios.

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

Continuação do Parecer: 552.857

Recomendações:

Observação: O projeto descreve que serão coletadas amostras de 5 mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA para realização de contagem global e diferencial de leucócitos. Para as avaliações imunológicas, serão coletadas amostras de 30 mL de sangue periférico em tubos Vacutainer® Sodium Heparina. No TCLE consta: Será colhida uma pequena amostra de sangue (10 mL) em tubos estéreis. Foi devidamente atendida a solicitação de que no TCLE conste que serão coletadas 35 mL de sangue para as dosagens bioquímicas e imunológicas. Informar no TCLE que serão assinadas duas vias e que uma delas, ficará será entregue ao voluntário da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos pela aprovação do projeto "Caracterização dos mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo Mycobacterium leprae e a sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase" do pesquisador Manoel Otávio da Costa Rocha.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 12 de Março de 2014

Assinador por:

Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

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

ANEXO D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pessoas com hanseníase

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa

TÍTULO: "Caracterização dos mecanismos imunológicos de pacientes infectados pelo *Mycobacterium leprae* e sua correlação com a expressão clínica, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase".

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica, e antes de aceitar é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Você está sendo convidado a participar desta pesquisa científica como voluntário (você pode escolher se quer participar ou não). Para isso, deverá ler este documento todo e perguntar aos pesquisadores tudo o que não entendeu antes de aceitar participar da pesquisa. Esta pesquisa irá estudar a Hanseníase, uma doença que acomete pele e nervos e que pode causar grandes deformidades. O objetivo da pesquisa é entender melhor essa doença, podendo ajudar na prevenção, no tratamento das deformidades provocadas pela doença e melhora da qualidade de vida do paciente. **Será colhida uma pequena amostra de sangue (35 mL) em tubos estéreis para as dosagens bioquímicas e imunológicas.** Os exames de sangue têm como propósito a realização do hemograma e caracterização das células de defesa do organismo para auxiliar no entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença. Se você concordar em participar, você estará ajudando diversos pesquisadores a entender melhor a hanseníase e como se pode melhorar seu tratamento e a cura dos doentes. Assim, poderá ajudar muitas pessoas que, como você, hoje estão com essa doença ou que podem vir a ficar doentes no futuro. Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento nenhum para participar da pesquisa; a qualquer momento, você poderá desistir de fazer parte dela, sem qualquer prejuízo.

"Depois de ter lido este documento todo e ter resolvido minhas dúvidas com um dos pesquisadores, eu declaro que concordo com seus termos e aceito participar desta pesquisa."

O TCLE será assinado em duas vias e uma delas, será entregue ao voluntário da pesquisa.

BENEFÍCIOS: Os participantes terão seu estado imunológico avaliado através do hemograma e de outros exames a serem realizados. Além disso, a participação nesse estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na Hanseníase, podendo colaborar para a melhoria do tratamento desta doença. Os resultados das avaliações clínicas e laboratoriais serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os indivíduos saudáveis que constituirão o grupo controle.

RISCOS EM POTENCIAL: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da retirada do sangue; no entanto, a coleta será realizada por profissional enfermeiro treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE): Todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário do paciente e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

CONFIDENCIALIDADE: Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, supervisor da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do CPqRR-FIOCRUZ.

DESLIGAMENTO: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

EQUIPE RESPONSÁVEL:

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG) – (31) 3409-9547
Coordenadora_supervisão clínica: Dra. Sandra Lyon (Médica Coordenadora do Serviço de Dermatologia no Hospital Eduardo de Menezes)
Pós-doutoranda: Dra. Ana Thereza Chaves (UFMG/FIOCRUZ) _ (31) 3349-7778

Colaboradores:

Profa. Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (UFMG) –
(31) 3409-3006
Dra. Silvia Helena Lyon (Hospital Eduardo de Menezes) _ (31) 9202-9920

Dra. Ana Cláudia Lyon (Hospital Eduardo de Menezes)_ (31) 9113-7776
Giovane Rodrigo de Sousa – (31) 9208-1702

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil 31.270-901 ou pelo telefone (31) 3409 4592, ou no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ) pelo telefone (31) 3349-7825. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

CONSENTIMENTO: Com base no exposto, estou ciente que a minha participação é voluntária e será restrita à doação de amostras de sangue. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em doença de Chagas do CTR-DIP.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____

Ass. do paciente ou responsável: _____

Ass. da testemunha: _____

Ass. do orientando _____

Ass. do pesquisador responsável (orientador) _____

ANEXO E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para contatos de casos-índice de hanseníase

TÍTULO: “Avaliação de aspectos clínicos, epidemiológicos e sociais em contatos de casos-índice de hanseníase em um Centro de Referência em Minas Gerais, Brasil”.

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa clínica, e antes de aceitar é necessário que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre o que se propõe a ser feito. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos e desconfortos do estudo.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO: Você está sendo convidado a participar desta pesquisa científica como voluntário (você pode escolher se quer participar ou não). Para isso, deverá ler este documento todo e perguntar aos pesquisadores tudo o que não entendeu antes de aceitar participar da pesquisa.

Esta pesquisa irá estudar a hanseníase, uma doença que acomete pele e nervos e que pode causar grandes deformidades. O objetivo da pesquisa é entender melhor essa doença, podendo ajudar na no controle, prevenção e, identificação precoce bem como evitar as deformidades provocadas pela doença. Para isso, será realizado o exame clínico e testes que auxiliam no monitoramento da doença. Estes testes são chamados ML Flow e Mitsuda, permitem avaliar condições imunológicas e são usados como exames complementares na detecção precoce de casos novos e na confirmação diagnóstica. Também será colhida uma pequena amostra de sangue (35 mL) em tubos estéreis para as dosagens bioquímicas e imunológicas.

Se você concordar em participar, você estará ajudando diversos pesquisadores a entender melhor como diminuir a transmissão a hanseníase. Assim, poderá ajudar muitas pessoas.

Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento nenhum para participar da pesquisa; a qualquer momento, você poderá desistir de fazer parte dela, sem qualquer prejuízo.

“Depois de ter lido este documento todo e ter resolvido minhas dúvidas com um dos pesquisadores, eu declaro que concordo com seus termos e aceito participar desta pesquisa.”

O TCLE será assinado em duas vias e uma delas, será entregue ao voluntário da pesquisa.

BENEFÍCIOS: A participação nesse estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na hanseníase, podendo colaborar para a prevenção e detecção precoce. Os resultados das avaliações clínicas, dos testes sorológicos e cutâneos serão fornecidos e explicados para cada participante do estudo, incluindo os indivíduos saudáveis que constituirão o grupo controle.

RISCOS EM POTENCIAL: Os riscos para os participantes são mínimos. Existe a possibilidade de ocorrer desconforto pela picada da agulha no momento da coleta de sangue e no teste de Mitsuda; no entanto, a coleta será realizada por profissional enfermeiro treinado e experiente, que poderá auxiliar o participante no caso de ocorrência de algum desconforto.

PERMISSÃO PARA A REVISÃO DOS DADOS (CONFIDENCIALIDADE): Todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário do paciente e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso, ficando restritas aos pesquisadores e ao participante, se assim desejar.

CONFIDENCIALIDADE: Os resultados de seus exames serão analisados em sigilo até onde é permitido pela lei. No entanto, o pesquisador, supervisor da pesquisa e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG poderá ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros para o orientador e para o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

DESLIGAMENTO: A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar do estudo não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

EQUIPE RESPONSÁVEL:

Coordenador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha (UFMG) – (31) 3409-9547

Coordenadora_supervisão clínica: Dra. Sandra Lyon (Médica Coordenadora do Serviço de Dermatologia no Hospital Eduardo de Menezes)

Pós-doutoranda: Dra. Ana Thereza Chaves (UFMG/FIOCRUZ) _ (31) 3349-7778

Mestranda: Edilamar Silva de Alecrim (UFMG/Hospital Eduardo de Menezes) (31) 3328-5057

Se precisar de mais informações sobre o trabalho que está sendo realizado, você deverá entrar em contato com Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha no CTR-DIP Orestes Diniz, às terças e sextas feiras pela manhã, ou pelo telefone (31) 3409-9547. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, informações podem ser obtidas no Comitê de Ética em Pesquisa (Coep) na Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 Campus Pampulha Belo Horizonte, MG - Brasil 31.270-901 ou pelo telefone (31) 3409 4592 ou no Comitê de Ética em pesquisa na Av Dr Cristiano Rezende, 2213, Bom Sucesso Belo Horizonte, MG- Brasil. CEP 30.622-020 ou pelo telefone (31) 3328 5084. Caso haja necessidade, poderá ser solicitada cópia do projeto.

CONSENTIMENTO: Com base no exposto, estou ciente que a minha participação é voluntária e será restrita aos exames realizados no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes.

Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Fui informado de que poderei, a qualquer momento, me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete qualquer

prejuízo ao prosseguimento de meu acompanhamento médico no Ambulatório de Referência em dermatologia sanitária do Hospital Eduardo de Menezes.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

Ass. do paciente ou responsável:

Ass. do orientando:

Ass. do pesquisador responsável (orientador):

ANEXO F - Manuscrito: Vitamin D receptor expression and hepcidin levels in the protection or severity of leprosy: a systematic review



www.elsevier.com/locate/micinf

Review

Vitamin D receptor expression and hepcidin levels in the protection or severity of leprosy: a systematic review

Ana Laura Grossi de Oliveira ^{a,*}, Ana Thereza Chaves ^a, Cristiane Alves Silva Menezes ^b,
Nathalia Sernizon Guimarães ^a, Lilian Lacerda Bueno ^c, Ricardo Toshio Fujiwara ^a,
Manoel Otávio da Costa Rocha ^a

^a Post-graduate Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmacy, UFMG, Brazil

^c Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, UFMG, Brazil

Received 17 November 2016; accepted 3 March 2017

Available online ■ ■ ■

Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease whose disequilibrium in the host's genetic, immunological and clinical mechanisms leads to distinct manifestations defining the type of immunological response. This review focuses its attention on the influence of the Vitamin D Receptor and hepcidin expressions that can suggest the protection or severity of leprosy.

© 2017 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Leprosy; Vitamin D receptor; Polymorphism; Hepcidin; Protection; Severity

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.03.001>

12. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Resultados de Ct (*cicle treshold*), ΔCt , $2^{-\Delta Ct}$ e Log_{10} obtidos pela expressão gênica de VDR e CAMP em RT-qPCR.

Grupo Controle - calibrador

N	β -microglobulina (normalizador)	VDR			CAMP		
	Ct	Ct	$2^{-\Delta Ct}$	Log_{10}	Ct	$2^{-\Delta Ct}$	Log_{10}
1	27,2273	28,2449	2,9807	0,4743	29,03379	2,24984	0,35215
2	34,6686	36,8499	1,3305	0,1240	40,00000	0,19546	-0,70894
3	30,8455	33,5688	0,9138	-0,0391	32,30500	2,86153	0,45660
4	27,2273	30,2372	0,7492	-0,1254	29,60742	1,51172	0,17947
5	35,5026	38,5879	0,7110	-0,1481	37,68305	1,73611	0,23958
6	27,2273	29,2883	1,4462	0,1602	30,84546	0,64090	-0,19321
7	27,2273	28,6657	2,2267	0,3477	29,30500	1,86427	0,27051
8	30,8455	32,1367	2,4658	0,3920	34,68305	0,55047	-0,25927
9	32,7917	37,4190	0,2442	-0,6123	36,68305	0,53035	-0,27543
10	35,5026	40,0000	0,2672	-0,5732	38,68305	0,86805	-0,06145
Média	30,90655479	33,49984	1,0000	0	33,8829	1,0000	0
Sendo, $\text{Log}_{10}1=0$							

Grupo HANS PB/MB antes do tratamento

Formas clínicas	β -microglobulina (normalizador)	VDR			CAMP		
	Ct	Ct	$2^{-\Delta Ct}$	Log_{10}	Ct	$2^{-\Delta Ct}$	Log_{10}
DT	23,463	35,858	0,00112	-2,95042	31,988	0,02136	-1,67030
VV	25,883	33,939	0,02268	-1,64431	33,188	0,04978	-1,30295
VV	21,852	31,217	0,00916	-2,03833	32,2	0,00604	-2,21905
VV	24,109	34,410	0,00478	-2,32037	35,091	0,00389	-2,41004
DD	20,777	29,797	0,01162	-1,93463	29,008	0,02619	-1,58187
DT	21,375	32,986	0,00193	-2,71456	34,066	0,00119	-2,92442
DT	26,544	35,782	0,00999	-2,00035	36,657	0,00711	-2,14842
TT	22,406	35,547	0,00067	-3,17538	34,371	0,00197	-2,70598
DD	27,176	37,206	0,00577	-2,23881	33,908	0,07402	-1,13067
DV	37,124	37,802	3,77106	0,57646	40	1,07208	0,03023
TT	23,329	33,207	0,00641	-2,19293	33,156	0,00867	-2,06207
DT	21,898	32,602	0,00362	-2,44151	34,976	0,00091	-3,04093
DT	24,568	34,519	0,00609	-2,21512	33,51	0,01600	-1,79595
DT	23,063	32,634	0,00793	-2,10059	32,006	0,01598	-1,79633
DD	25,080	29,759	0,23551	-0,62799	31,304	0,10526	-0,97776
DD	21,992	31,766	0,00689	-2,16161	32,871	0,00418	-2,37893
DD	35,958	37,139	2,66224	0,42525	37,653	2,43075	0,38574
DT	31,484	34,762	0,62194	-0,20625	33,139	2,49836	0,39765
DT	24,579	34,429	0,00654	-2,18429	31,442	0,06761	-1,17002
TT	25,317	34,260	0,01226	-1,91143	35,751	0,00569	-2,24497
DD	23,914	32,033	0,02171	-1,66336	29,315	0,18618	-0,73006
DD	21,919	31,116	0,01028	-1,98790	30,139	0,02639	-1,57857
DV	21,103	30,994	0,00635	-2,19692	31,435	0,00611	-2,21426

VV	28,524	35,973	0,03454	-1,46172	40	0,00276	-2,55876
VV	29,948	34,638	0,23372	-0,63130	36,523	0,08252	-1,08343
DT	22,954	30,277	0,03769	-1,42377	27,723	0,28869	-0,53957
DD	26,180	31,886	0,11567	-0,93678	33,014	0,06898	-1,16128
DT	23,485	32,193	0,01442	-1,84093	31,456	0,03135	-1,50374
TT	23,399	32,405	0,01174	-1,93042	32,217	0,01744	-1,75852
DD	22,227	32,788	0,00400	-2,39846	39,129	0,00006	-4,19196
DT	26,206	35,500	0,00962	-2,01689	36,546	0,00607	-2,21660
TT	27,982	31,400	0,56475	-0,24815	31,873	0,53061	-0,27523
TT	21,762	30,371	0,01546	-1,81092	29,776	0,03043	-1,51666

Grupo HANS PB/MB após seis meses de tratamento

Formas clínicas	β -microglobulina (normalizador)	VDR			CAMP		
	Ct	Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Log ₁₀	Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Log ₁₀
DT	37,043	40,000	0,777	0,109	40,000	1,014	-0,006
VV	29,981	35,122	0,171	0,767	40,000	0,008	2,120
TT	31,650	34,679	0,739	0,131	40,000	0,024	1,618
DD	35,801	37,324	2,100	-0,322	40,000	0,428	0,368
TT	30,188	39,566	0,009	2,042	40,000	0,009	2,058
DT	39,566	40,000	4,466	-0,650	40,000	5,824	-0,765
DT	37,238	40,000	0,890	0,051	40,000	1,160	-0,064
DT	32,341	40,000	0,030	1,525	40,000	0,039	1,410
DD	35,567	40,000	0,279	0,554	40,000	0,364	0,438
DD	28,428	37,002	0,016	1,800	33,880	0,180	0,745
DD	30,244	33,650	0,570	0,244	38,115	0,034	1,473
DT	30,314	35,067	0,224	0,650	38,401	0,029	1,539
DD	34,156	38,062	0,403	0,395	40,000	0,137	0,863
DV	32,739	40,000	0,039	1,405	40,000	0,051	1,290
VV	33,890	34,925	2,946	-0,469	40,000	0,114	0,943
DV	31,658	35,950	0,308	0,511	40,000	0,024	1,615
DT	29,619	35,345	0,114	0,943	40,000	0,006	2,229
DD	29,359	34,997	0,121	0,917	35,197	0,138	0,861
DD	32,017	37,183	0,168	0,774	39,251	0,052	1,282
DD	32,341	40,000	0,030	1,525	40,000	0,039	1,410
DT	24,025	30,805	0,055	1,260	32,877	0,017	1,769
DD	25,505	30,864	0,147	0,833	30,128	0,319	0,496
DT	22,814	30,477	0,030	1,526	31,254	0,023	1,645
TT	24,171	31,110	0,049	1,308	30,984	0,070	1,155
DD	22,952	30,205	0,040	1,403	30,127	0,054	1,264
TT	22,144	29,721	0,032	1,500	29,156	0,061	1,215
DD	24,114	33,214	0,011	1,959	32,096	0,031	1,507

Grupo Contatos

N	β -microglobulina (normalizador)	VDR			CAMP		
	Ct	Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Log ₁₀	Ct	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Log ₁₀
C1	23,797	40,000	0,000	4,097	31,851	0,030	1,529
C2	22,845	30,910	0,023	1,647	30,518	0,039	1,414
C3	24,559	35,356	0,003	2,469	35,187	0,005	2,303
C4	25,224	35,638	0,004	2,354	32,295	0,059	1,233
C5	32,790	39,774	0,048	1,322	40,000	0,053	1,275
C6	21,396	33,199	0,002	2,772	29,187	0,036	1,450
C7	26,320	33,499	0,042	1,381	32,114	0,142	0,848
C8	25,837	32,640	0,054	1,267	36,726	0,004	2,382
C9	20,657	28,848	0,021	1,685	31,528	0,004	2,377
C10	25,215	32,382	0,042	1,377	33,524	0,025	1,605
C11	20,212	27,062	0,052	1,281	40,000	0,000	5,061
C12	22,454	37,036	0,000	3,609	35,263	0,001	2,960
C13	19,102	28,472	0,009	2,040	28,327	0,013	1,881
C14	29,721	31,173	2,207	-0,344	40,000	0,006	2,198
C15	22,173	29,102	0,050	1,305	33,320	0,003	2,460
C16	22,741	33,139	0,004	2,349	30,427	0,038	1,418
C17	24,336	28,757	0,282	0,550	40,000	0,000	3,819
C18	25,047	37,158	0,001	2,865	40,000	0,000	3,605
C20	26,826	34,956	0,022	1,667	40,000	0,001	3,070
C21	24,661	33,694	0,012	1,939	34,562	0,008	2,084
C22	27,211	34,202	0,047	1,324	35,262	0,030	1,528
C23	22,733	33,758	0,003	2,538	40,000	0,000	4,302
C24	30,095	40,000	0,006	2,201	40,000	0,008	2,086
C25	28,623	40,000	0,002	2,644	38,597	0,008	2,107
C26	30,531	40,000	0,009	2,070	34,029	0,697	0,157
C29	29,806	32,383	1,011	-0,005	40,000	0,007	2,173
C30	22,070	28,234	0,084	1,075	28,171	0,115	0,940
C32	24,897	33,025	0,022	1,666	31,635	0,074	1,133
C34	31,185	40,000	0,013	1,873	40,000	0,017	1,758
C35	23,244	33,061	0,007	2,174	31,754	0,022	1,666
C37	24,661	32,490	0,027	1,576	34,867	0,007	2,176

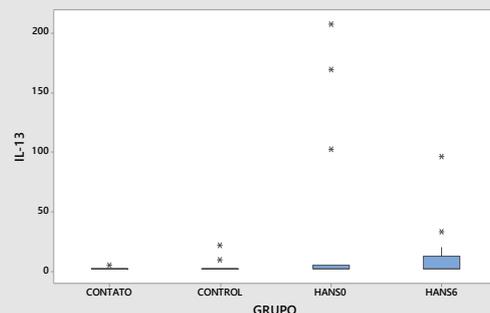
APÊNDICE 2. Consolidado da análise estatística dos resultados de leitura dos marcadores sorológicos dos grupos de indivíduos controles, hanseníase antes e após seis meses de tratamento poliquimioterápico e contatos atendidos no Hospital Eduardo de Menezes/FHEMIG, entre os anos 2014 e 2016.

*Para as variáveis com valor-p < 0.05, fazer comparação entre pares de grupos

Variable	GRUPO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
IL-13	CONTATO	25	0	2.198	0.640	2.070	2.070	2.070	2.070	5.270
	CONTROL	18	0	3.55	4.81	2.07	2.07	2.07	2.07	21.61
	HANS0	15	0	34.3	68.0	2.1	2.1	2.1	5.0	207.4
	HANS6	19	0	11.07	22.28	2.07	2.07	2.07	12.50	96.67

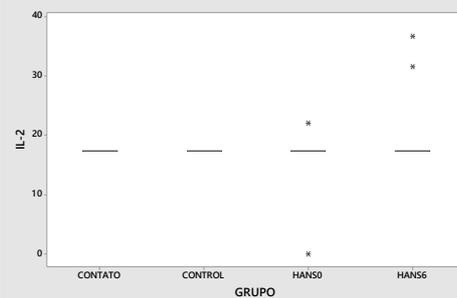
Kruskal-Wallis Test on IL-13
H = 13.35 DF = 3 P = 0.004
(adjusted for ties)

GRUPO	N	Median	Ave Rank	Z
CONTATO	25	2.070	31.9	-1.93
CONTROL	18	2.070	34.9	-0.89
HANS0	15	2.070	48.4	1.81
HANS6	19	2.070	44.8	1.30



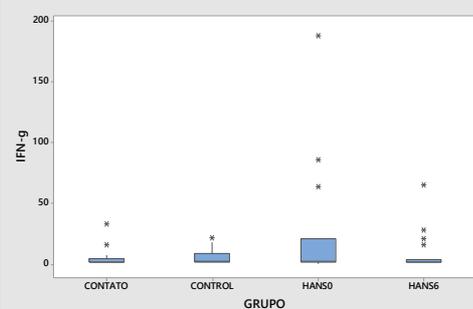
IL-2	CONTATO	25	0	17.390	0.000000	17.390	17.390	17.390	17.390	17.390
	CONTROL	18	0	17.390	0.000000	17.390	17.390	17.390	17.390	17.390
	HANS0	15	0	16.54	4.73	0.00	17.39	17.39	17.39	22.04
	HANS6	19	0	19.16	5.38	17.39	17.39	17.39	17.39	36.81

Kruskal-Wallis Test on IL-2
H = 3.18 DF = 3 P = 0.365
(adjusted for ties)



IFN-γ	CONTATO	25	0	4.51	6.74	1.88	1.88	1.88	4.66	33.36
	CONTROL	18	0	5.83	6.09	1.88	1.88	2.44	8.50	21.31
	HANS0	15	0	27.3	51.1	0.0	1.9	2.4	20.6	187.8
	HANS6	19	0	8.61	15.72	1.88	1.88	1.88	3.48	65.49

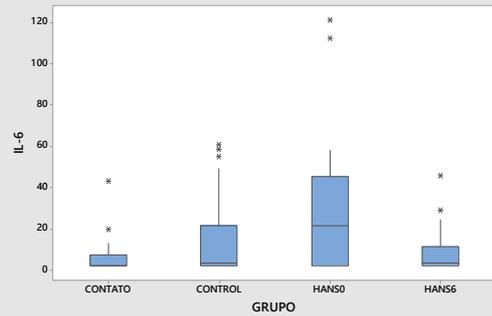
Kruskal-Wallis Test on IFN-γ
H = 2.48 DF = 3 P = 0.479
(adjusted for ties)



IL-6	CONTATO	25	0	5.80	8.91	2.06	2.06	2.06	7.08	43.01
	CONTROL	18	0	15.78	22.40	2.06	2.06	3.41	21.24	60.92
	HANS0	15	0	32.7	38.8	2.1	2.1	21.6	45.2	121.1
	HANS6	19	0	9.70	12.11	2.06	2.06	3.24	11.12	45.76

Kruskal-Wallis Test on IL-6
H = 10.63 DF = 3 P = 0.014
(adjusted for ties)

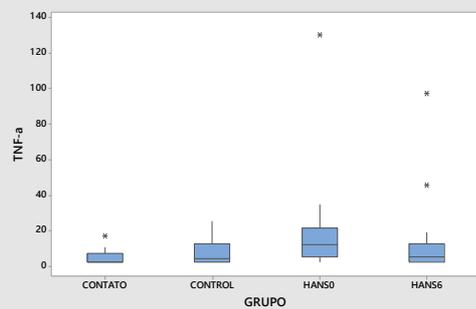
GRUPO	N	Median	Ave Rank	Z
CONTATO	25	2.060	29.2	-2.65
CONTROL	18	3.405	40.9	0.42
HANS0	15	21.570	51.2	2.36
HANS6	19	3.240	40.3	0.30
Overall	77		39.0	



TNF-α	CONTATO	25	0	4.227	3.803	2.170	2.170	2.170	7.230	17.240
	CONTROL	18	0	8.19	7.50	2.17	2.24	4.36	12.73	25.34
	HANS0	15	0	21.17	31.88	2.17	5.47	12.21	21.70	130.44
	HANS6	19	0	13.23	22.76	2.17	2.17	5.16	12.55	97.15

Kruskal-Wallis Test on TNF-α
H = 17.15 DF = 3 P = 0.001
(adjusted for ties)

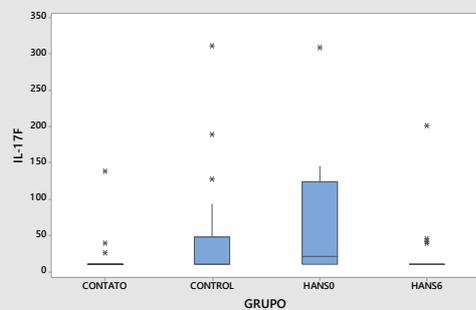
GRUPO	N	Median	Ave Rank	Z
CONTATO	25	2.170	25.8	-3.59
CONTROL	18	4.355	42.1	0.67
HANS0	15	12.210	54.4	2.96
HANS6	19	5.160	41.3	0.51
Overall	77		39.0	



IL-17F	CONTATO	25	0	16.72	26.04	9.83	9.83	9.83	9.83	137.83
	CONTROL	18	0	51.1	82.0	9.8	9.8	9.8	47.0	311.7
	HANS0	15	0	67.1	84.1	9.8	9.8	20.4	124.0	308.4
	HANS6	19	0	25.0	44.4	9.8	9.8	9.8	9.9	201.6

Kruskal-Wallis Test on IL-17F
H = 11.59 DF = 3 P = 0.009
(adjusted for ties)

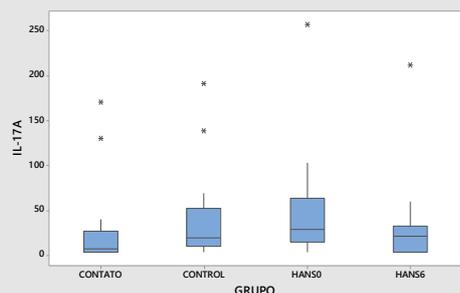
GRUPO	N	Median	Ave Rank	Z
CONTATO	25	9.830	31.0	-2.18
CONTROL	18	9.830	43.6	0.99
HANS0	15	20.430	50.3	2.17
HANS6	19	9.830	36.3	-0.60
Overall	77		39.0	



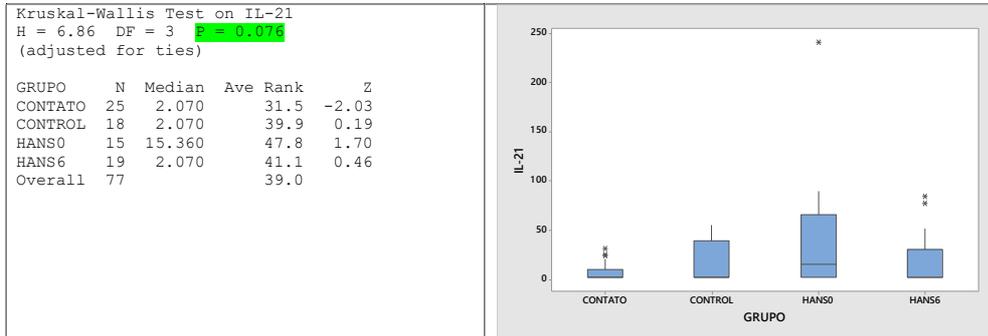
IL-17A	CONTATO	25	0	22.53	40.40	3.37	3.37	6.59	26.38	170.91
	CONTROL	18	0	40.2	50.1	3.4	9.7	19.6	52.1	191.5
	HANS0	15	0	49.3	63.9	3.4	14.8	28.3	63.2	256.9
	HANS6	19	0	29.6	47.1	3.4	3.4	21.1	32.3	212.3

Kruskal-Wallis Test on IL-17A
H = 8.40 DF = 3 P = 0.038
(adjusted for ties)

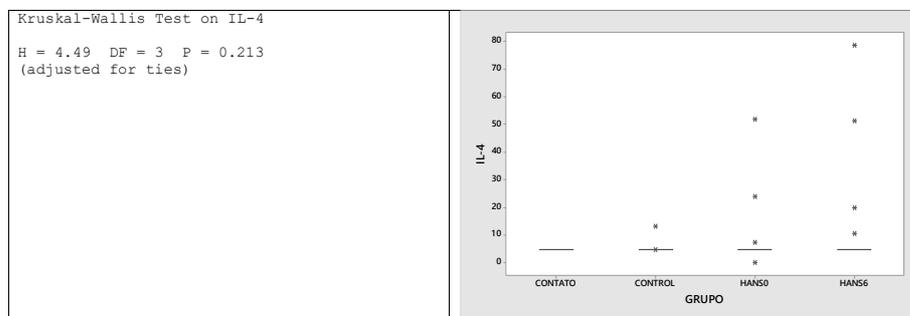
GRUPO	N	Median	Ave Rank	Z
CONTATO	25	6.590	30.0	-2.44
CONTROL	18	19.600	44.6	1.22
HANS0	15	28.320	49.1	1.94
HANS6	19	21.150	37.6	-0.32
Overall	77		39.0	



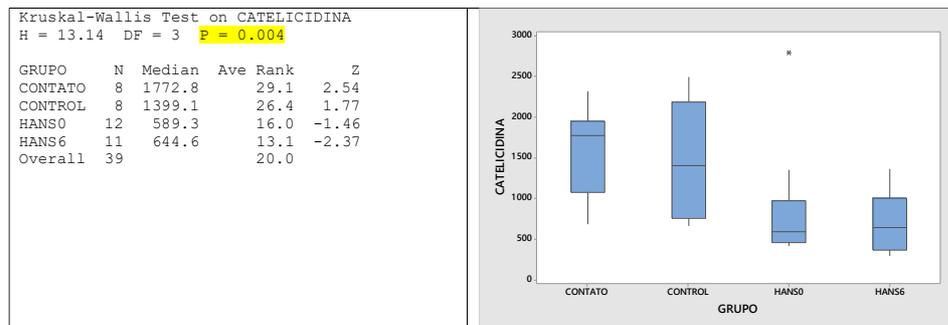
IL-21	CONTATO	25	0	6.97	9.22	2.07	2.07	2.07	9.57	31.19
	CONTROL	18	0	17.36	20.27	2.07	2.07	2.07	39.26	55.31
	HANS0	15	0	42.3	62.8	2.1	2.1	15.4	65.5	240.3
	HANS6	19	0	18.47	26.24	2.07	2.07	2.07	30.36	84.40



IL-4	CONTATO	25	0	4.5100	0.000000	4.5100	4.5100	4.5100	4.5100	4.5100
	CONTROL	18	0	4.994	2.008	4.510	4.510	4.510	4.510	13.040
	HANS0	15	0	8.84	12.96	0.00	4.51	4.51	4.51	51.70
	HANS6	19	0	11.99	19.56	4.51	4.51	4.51	4.51	78.60



CATELICIDINA	CONTATO	8	17	1615	557	681	1071	1773	1945	2322
	CONTROL	8	10	1462	709	664	756	1399	2180	2490
	HANS0	12	3	867	669	417	455	589	972	2790
	HANS6	11	8	688	354	285	362	645	1005	1356



APÊNDICE 3. Matrizes das correlações de *Pearson* para os grupos hanseníase paucibacilar e multibacilar antes e após seis meses de tratamento, grupos controles e contatos.

1. Matriz de correlação de *Pearson* para o grupo hanseníase paucibacilar antes do tratamento.

PB tempo 0 (Correlação de Pearson) - dados Normalizados													
	IFN-g	TNF-a	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP	IL-2
IFN-g	0,0000	-0,1051	0,9312	-0,2987	-0,2390	0,8470	-0,1836	-0,2958	-0,2218	-0,4882	-0,2767	-0,2229	-0,2267
TNF-a	-0,1051	0,0000	-0,0466	0,0464	-0,2556	0,1784	-0,3409	0,5158	0,3299	-0,6667	0,2352	0,2105	0,2633
IL-4	0,9312	-0,0466	0,0000	-0,4426	-0,3618	0,9122	-0,3029	-0,3996	-0,2557	-0,2830	-0,1385	-0,1657	-0,1036
IL-6	-0,2987	0,0464	-0,4426	0,0000	0,8953	-0,1329	0,2383	0,8246	-0,1190	-0,4476	-0,2638	-0,3702	-0,2307
IL-13	-0,2390	-0,2556	-0,3618	0,8953	0,0000	-0,1820	0,1508	0,5266	-0,1288	-0,3360	-0,1281	-0,1782	-0,1181
IL-17A	0,8470	0,1784	0,9122	-0,1329	-0,1820	0,0000	-0,2123	-0,0284	-0,3287	-0,5017	-0,2372	-0,3447	-0,1931
IL-17F	-0,1836	-0,3409	-0,3029	0,2383	0,1508	-0,2123	0,0000	0,0302	-0,1072	-0,3282	-0,2689	-0,3208	-0,2869
IL-21	-0,2958	0,5158	-0,3996	0,8246	0,5266	-0,0284	0,0302	0,0000	-0,1232	-0,4984	-0,3648	-0,4407	-0,2980
Catelicidina	-0,2218	0,3299	-0,2557	-0,1190	-0,1288	-0,3287	-0,1072	-0,1232	0,0000	-0,3853	0,8862	0,8801	0,8848
Vit D serica	-0,4882	-0,6667	-0,2830	-0,4476	-0,3360	-0,5017	-0,3282	-0,4984	-0,3853	0,0000	-0,0285	0,0335	
VDR	-0,2767	0,2352	-0,1385	-0,2638	-0,1281	-0,2372	-0,2689	-0,3648	0,8862	-0,0285	0,0000	0,8942	0,9979
CAMP	-0,2229	0,2105	-0,1657	-0,3702	-0,1782	-0,3447	-0,3208	-0,4407	0,8801	0,0335	0,8942	0,0000	0,8649
IL-2	-0,2267	0,2633	-0,1036	-0,2307	-0,1181	-0,1931	-0,2869	-0,2980	0,8848		0,9979	0,8649	0,0000
p valores													
	IFN-g	TNF-a	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP	IL-2
IFN-g		0,8043	0,000772	0,4723	0,5686	0,0080	0,6634	0,4769	0,6326	0,3259	0,5480	0,6310	0,5893
TNF-a	0,8043		0,912745	0,9131	0,5413	0,6726	0,4086	0,1907	0,4699	0,1481	0,6117	0,6505	0,5287
IL-4	0,0008	0,9127		0,2721	0,3785	0,0016	0,4659	0,3267	0,5800	0,5869	0,7670	0,7225	0,8072
IL-6	0,4723	0,9131	0,272096		0,0026	0,7537	0,5699	0,0118	0,7994	0,3734	0,5676	0,4137	0,5826
IL-13	0,5686	0,5413	0,378499	0,0026		0,6661	0,7215	0,1800	0,7832	0,5150	0,7844	0,7022	0,7806
IL-17A	0,0080	0,6726	0,001585	0,7537	0,6661		0,6138	0,9468	0,4717	0,3106	0,6085	0,4489	0,6468
IL-17F	0,6634	0,4086	0,465880	0,5699	0,7215	0,6138		0,9434	0,8190	0,5254	0,5598	0,4830	0,4908
IL-21	0,4769	0,1907	0,326701	0,0118	0,1800	0,9468	0,9434		0,7924	0,3143	0,4211	0,3223	0,4734
Catelicidina	0,6326	0,4699	0,580015	0,7994	0,7832	0,4717	0,8190	0,7924		0,5219	0,0187	0,0207	0,0081
Vit D serica	0,3259	0,1481	0,586855	0,3734	0,5150	0,3106	0,5254	0,3143	0,5219		0,9637	0,9574	
VDR	0,5480	0,6117	0,767050	0,5676	0,7844	0,6085	0,5598	0,4211	0,0187	0,9637		0,0066	0,0000
CAMP	0,6310	0,6505	0,722472	0,4137	0,7022	0,4489	0,4830	0,3223	0,0207	0,9574	0,0066		0,0120
IL-2	0,5893	0,5287	0,807163	0,5826	0,7806	0,6468	0,4908	0,4734	0,0081		0,0000	0,0120	

2. Matriz de correlação de *Pearson* para o grupo hanseníase paucibacilar após seis meses de tratamento.

PB tempo 6 (Correlação de Pearson) - dados Normalizados													
	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP	IL-2
IFN- γ		-0,4161	-0,2687	-0,2560	-0,2687	-0,4331	-0,2687	-0,2687	-0,5241	-0,1495	-0,3174	-0,3067	-0,2687
TNF- α	-0,4161		0,7750	0,4377	0,4635	0,9937	0,7750	0,7750	0,2684	-0,4620	0,7348	0,7675	0,4635
IL-4	-0,2687	0,7750		-0,2203	-0,2000	0,8228	1,0000	1,0000	-0,4755		0,9943	0,9985	-0,2000
IL-6	-0,2560	0,4377	-0,2203		0,9791	0,3538	-0,2203	-0,2203	1,0000	-0,4620	-0,3090	-0,2873	0,9791
IL-13	-0,2687	0,4635	-0,2000	0,9791		0,3890	-0,2000	-0,2000	0,9996	-0,4620	-0,2931	-0,2438	1,0000
IL-17A	-0,4331	0,9937	0,8228	0,3538	0,3890		0,8228	0,8228	0,1663	-0,5182	0,7827	0,8190	0,3890
IL-17F	-0,2687	0,7750	1,0000	-0,2203	-0,2000	0,8228		1,0000	-0,4755		0,9943	0,9985	-0,2000
IL-21	-0,2687	0,7750	1,0000	-0,2203	-0,2000	0,8228	1,0000		-0,4755		0,9943	0,9985	-0,2000
Catelicidina	-0,5241	0,2684	-0,4755	1,0000	0,9996	0,1663	-0,4755	-0,4755			-0,4953	-0,4999	0,9996
Vit D serica	-0,1495	-0,4620		-0,4620	-0,4620	-0,5182					0,9563	0,8025	-0,4620
VDR	-0,3174	0,7348	0,9943	-0,3090	-0,2931	0,7827	0,9943	0,9943	-0,4953	0,9563		0,9899	-0,2931
CAMP	-0,3067	0,7675	0,9985	-0,2873	-0,2438	0,8190	0,9985	0,9985	-0,4999	0,8025	0,9899		-0,2438
IL-2	-0,2687	0,4635	-0,2000	0,9791	1,0000	0,3890	-0,2000	-0,2000	0,9996	-0,4620	-0,2931	-0,2438	
p valores													
	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP	IL-2
IFN- γ		0,4118	0,6067	0,6244	0,6067	0,3910	0,6067	0,6067	0,6488	0,8505	0,6027	0,6157	0,6067
TNF- α	0,4118		0,0702	0,3853	0,3545	0,0001	0,0702	0,0702	0,8270	0,5380	0,1573	0,1298	0,3545

IL-4	0,6067	0,0702		0,6749	0,7040	0,0443	0,0000	0,0000	0,6845		0,0005	0,0001	0,7040
IL-6	0,6244	0,3853	0,6749		0,0007	0,4915	0,6749	0,6749	0,0028	0,5380	0,6129	0,6393	0,0007
IL-13	0,6067	0,3545	0,7040	0,0007		0,4459	0,7040	0,7040	0,0179	0,5380	0,6322	0,6927	0,0000
IL-17A	0,3910	0,0001	0,0443	0,4915	0,4459		0,0443	0,0443	0,8936	0,4818	0,1176	0,0899	0,4459
IL-17F	0,6067	0,0702	0,0000	0,6749	0,7040	0,0443		0,0000	0,6845		0,0005	0,0001	0,7040
IL-21	0,6067	0,0702	0,0000	0,6749	0,7040	0,0443	0,0000		0,6845		0,0005	0,0001	0,7040
Catelicidina	0,6488	0,8270	0,6845	0,0028	0,0179	0,8936	0,6845	0,6845			0,6701	0,6667	0,0179
Vit D serica	0,8505	0,5380		0,5380	0,5380	0,4818					0,1889	0,4070	0,5380
VDR	0,6027	0,1573	0,0005	0,6129	0,6322	0,1176	0,0005	0,0005	0,6701	0,1889		0,0012	0,6322
CAMP	0,6157	0,1298	0,0001	0,6393	0,6927	0,0899	0,0001	0,0001	0,6667	0,4070	0,0012		0,6927
IL-2	0,6067	0,3545	0,7040	0,0007	0,0000	0,4459	0,7040	0,7040	0,0179	0,5380	0,6322	0,6927	

3. Matriz de correlação de *Pearson* para o grupo hanseníase multibacilar antes do tratamento.

MB tempo 0 (Correlação de Pearson) - dados Normalizados													
	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP	IL-2
IFN- γ		-0,0207	0,3265	-0,0829	0,0421	0,4271	0,1860	-0,0032	0,3452		0,4512	0,5161	0,2219
TNF- α	-0,0207		-0,0807	0,8654	0,5965	0,7370	0,9684	0,9955	-0,3118		0,7402	0,7880	0,2701
IL-4	0,3265	-0,0807		-0,0495	0,7226	-0,2277	0,0345	-0,0463	0,9833		0,4236	0,4896	0,1780
IL-6	-0,0829	0,8654	-0,0495		0,5673	0,5138	0,8847	0,8401	-0,3822		-0,8474	-0,8057	-0,1972
IL-13	0,0421	0,5965	0,7226	0,5673		0,1887	0,6340	0,6159	0,5795		-0,4586	-0,5232	0,2476
IL-17A	0,4271	0,7370	-0,2277	0,5138	0,1887		0,7625	0,7652	-0,3038		0,8603	0,8957	0,2738
IL-17F	0,1860	0,9684	0,0345	0,8847	0,6340	0,7625		0,9616	-0,2122		0,2976	0,3676	0,2156
IL-21	-0,0032	0,9955	-0,0463	0,8401	0,6159	0,7652	0,9616		-0,2585		0,9083	0,9368	0,2900
Catelicidina	0,3452	-0,3118	0,9833	-0,3822	0,5795	-0,3038	-0,2122	-0,2585					0,1546
Vit D serica													
VDR	0,4512	0,7402	0,4236	-0,8474	-0,4586	0,8603	0,2976	0,9083			0,0000	0,9972	0,9963
CAMP	0,5161	0,7880	0,4896	-0,8057	-0,5232	0,8957	0,3676	0,9368			0,9972		0,9999
IL-2	0,2219	0,2701	0,1780	-0,1972	0,2476	0,2738	0,2156	0,2900	0,1546		0,9963	0,9999	
p valores													
	IFN-g	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP	IL-2
IFN-g		0,9649	0,4748	0,8597	0,9286	0,3392	0,6896	0,9946	0,5694		0,7020	0,6547	0,6324
TNF- α	0,9649		0,8634	0,0119	0,1574	0,0588	0,0003	0,0000	0,6095		0,4695	0,4223	0,5580
IL-4	0,4748	0,8634		0,9161	0,0666	0,6234	0,9415	0,9214	0,0026		0,7215	0,6743	0,7026
IL-6	0,8597	0,0119	0,9161		0,1841	0,2381	0,0081	0,0180	0,5254		0,3563	0,4035	0,6716
IL-13	0,9286	0,1574	0,0666	0,1841		0,6854	0,1262	0,1409	0,3059		0,6967	0,6495	0,5924
IL-17A	0,3392	0,0588	0,6234	0,2381	0,6854		0,0463	0,0450	0,6192		0,3406	0,2933	0,5524
IL-17F	0,6896	0,0003	0,9415	0,0081	0,1262	0,0463		0,0005	0,7319		0,8076	0,7604	0,6425
IL-21	0,9946	0,0000	0,9214	0,0180	0,1409	0,0450	0,0005		0,6746		0,2748	0,2276	0,5282
Catelicidina	0,5694	0,6095	0,0026	0,5254	0,3059	0,6192	0,7319	0,6746					0,8039
Vit D serica													
VDR	0,7020	0,4695	0,7215	0,3563	0,6967	0,3406	0,8076	0,2748				0,0472	0,0549
CAMP	0,6547	0,4223	0,6743	0,4035	0,6495	0,2933	0,7604	0,2276			0,0472		0,0076
IL-2	0,6324	0,5580	0,7026	0,6716	0,5924	0,5524	0,6425	0,5282	0,8039		0,0549	0,0076	

4. Matriz de correlação de *Pearson* para o grupo hanseníase multibacilar após seis meses de tratamento.

MB tempo 6 (Correlação de Pearson) - dados Normalizados													
	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP	IL-2
IFN- γ	0,0000	0,4522	0,8906	0,6036	0,5070	0,8964	0,8735	0,9206	-0,3632	-0,3366	0,7788	0,7712	0,8780
TNF- α	0,4522	0,0000	0,2863	0,7062	0,0312	0,2964	0,3047	0,3537	-0,1966	-0,3888	0,1549	0,8201	0,3326
IL-4	0,8906	0,2863	0,0000	0,5889	0,1696	0,9452	0,9576	0,7685	-0,1787	-0,1976	0,4890	0,6662	0,9440
IL-6	0,6036	0,7062	0,5889	0,0000	0,2044	0,5975	0,5558	0,4095	-0,0830	-0,1001	0,2679	0,7676	0,6212
IL-13	0,5070	0,0312	0,1696	0,2044	0,0000	0,2892	0,1634	0,5735	-0,4575	-0,1555	0,9043	0,1595	0,2099
IL-17A	0,8964	0,2964	0,9452	0,5975	0,2892	0,0000	0,9731	0,8109	-0,0657	-0,3641	0,5600	0,6786	0,9760
IL-17F	0,8735	0,3047	0,9576	0,5558	0,1634	0,9731	0,0000	0,7615	-0,1271	-0,3170	0,4765	0,6647	0,9740
IL-21	0,9206	0,3537	0,7685	0,4095	0,5735	0,8109	0,7615	0,0000	-0,4536	-0,3896	0,8468	0,6927	0,7353
Catelicidina	-0,3632	-0,1966	-0,1787	-0,0830	-0,4575	-0,0657	-0,1271	-0,4536	0,0000	-0,7594	-0,7014	-0,1974	-0,0800
Vit D serica	-0,3366	-0,3888	-0,1976	-0,1001	-0,1555	-0,3641	-0,3170	-0,3896	-0,7594	0,0000	-0,3463	-0,4700	-0,3545

VDR	0,7788	0,1549	0,4890	0,2679	0,9043	0,5600	0,4765	0,8468	-0,7014	-0,3463	0,0000	0,4137	0,5094
CAMP	0,7712	0,8201	0,6662	0,7676	0,1595	0,6786	0,6647	0,6927	-0,1974	-0,4700	0,4137	0,0000	0,6939
IL-2	0,8780	0,3326	0,9440	0,6212	0,2099	0,9760	0,9740	0,7353	-0,0800	-0,3545	0,5094	0,6939	0,0000
p valores													
	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP	IL-2
IFN- γ		0,1208	4,46E-05	0,0289	0,0770	3,34E-05	9,57E-05	8,14E-06	0,4232	0,3416	0,0028	0,0033	7,91E-05
TNF- α	0,1208		3,43E-01	0,0070	0,9193	3,25E-01	3,11E-01	2,36E-01	0,6726	0,2668	0,6308	0,0011	2,67E-01
IL-4	0,0000	0,3430		0,0342	0,5797	1,11E-06	2,79E-07	2,15E-03	0,7014	0,5843	0,1067	0,0180	1,25E-06
IL-6	0,0289	0,0070	3,42E-02		0,5030	3,10E-02	4,86E-02	1,65E-01	0,8596	0,7831	0,3999	0,0036	2,34E-02
IL-13	0,0770	0,9193	5,80E-01	0,5030		3,38E-01	5,94E-01	4,04E-02	0,3020	0,6679	0,0001	0,6204	4,91E-01
IL-17A	0,0000	0,3255	1,11E-06	0,0310	0,3379		2,31E-08	7,70E-04	0,8887	0,3009	0,0583	0,0152	1,25E-08
IL-17F	0,0001	0,3114	2,79E-07	0,0486	0,5938	2,31E-08		2,49E-03	0,7860	0,3722	0,1173	0,0184	1,94E-08
IL-21	0,0000	0,2358	2,15E-03	0,1646	0,0404	7,70E-04	2,49E-03		0,3066	0,2657	0,0005	0,0125	4,18E-03
Catelicidina	0,4232	0,6726	7,01E-01	0,8596	0,3020	8,89E-01	7,86E-01	3,07E-01		0,1365	0,1204	0,7077	8,65E-01
Vit D serica	0,3416	0,2668	5,84E-01	0,7831	0,6679	3,01E-01	3,72E-01	2,66E-01	0,1365		0,3613	0,2017	3,15E-01
VDR	0,0028	0,6308	1,07E-01	0,3999	0,0001	5,83E-02	1,17E-01	5,11E-04	0,1204	0,3613		0,1812	9,07E-02
CAMP	0,0033	0,0011	1,80E-02	0,0036	0,6204	1,52E-02	1,84E-02	1,25E-02	0,7077	0,2017	0,1812		1,23E-02
IL-2	0,0001	0,2668	1,25E-06	0,0234	0,4914	1,25E-08	1,94E-08	4,18E-03	0,8646	0,3149	0,0907	0,0123	

5. Matriz de correlação de *Pearson* para o grupo controle.

Grupo controle (Correlação de Pearson) - dados Normalizados												
	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP
IFN- γ		-0,0145	0,6403	0,4859	0,0658	0,3968	0,5367	0,4361	-0,0726	-0,1440	0,4086	0,8008
TNF- α	-0,0145		0,1203	0,3104	0,4871	0,2766	0,2418	0,5980	-0,1829	0,0727	-0,2813	-0,1986
IL-4	0,6403	0,1203		0,3720	0,2909	0,1432	0,2311	0,2973	0,4596	-0,1147	0,4167	0,1222
IL-6	0,4859	0,3104	0,3720		0,0665	0,7089	0,6324	0,6336	-0,4646	-0,2373	-0,2456	0,5849
IL-13	0,0658	0,4871	0,2909	0,0665		0,0139	0,4819	0,5496	-0,4548	0,3542	-0,2914	-0,1689
IL-17A	0,3968	0,2766	0,1432	0,7089	0,0139		0,6246	0,4790	-0,3183	-0,3359	0,0294	0,9698
IL-17F	0,5367	0,2418	0,2311	0,6324	0,4819	0,6246		0,6341	-0,6445	0,3790	-0,2254	0,7848
IL-21	0,4361	0,5980	0,2973	0,6336	0,5496	0,4790	0,6341		-0,2020	0,1327	-0,2566	0,3512
Catelicidina	-0,0726	-0,1829	0,4596	-0,4646	-0,4548	-0,3183	-0,6445	-0,2020			0,5085	-0,2424
Vit D serica	-0,1440	0,0727	-0,1147	-0,2373	0,3542	-0,3359	0,3790	0,1327			0,9063	-0,6351
VDR	0,4086	-0,2813	0,4167	-0,2456	-0,2914	0,0294	-0,2254	-0,2566	0,5085	0,9063		-0,0153
CAMP	0,8008	-0,1986	0,1222	0,5849	-0,1689	0,9698	0,7848	0,3512	-0,2424	-0,6351	-0,0153	
p valores												
	IFN- γ	TNF- α	IL-4	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP
IFN- γ		0,9543	0,0042	0,0409	0,7953	0,1030	0,0217	0,0704	0,8644	0,7338	0,3149	0,0169
TNF- α	0,9543		0,6345	0,2101	0,0403	0,2665	0,3336	0,0088	0,6645	0,8641	0,4997	0,6373
IL-4	0,0042	0,6345		0,1285	0,2415	0,5709	0,3563	0,2308	0,2519	0,7868	0,3044	0,7731
IL-6	0,0409	0,2101	0,1285		0,7932	0,0010	0,0049	0,0048	0,2461	0,5715	0,5577	0,1278
IL-13	0,7953	0,0403	0,2415	0,7932		0,9563	0,0429	0,0181	0,2575	0,3893	0,4837	0,6893
IL-17A	0,1030	0,2665	0,5709	0,0010	0,9563		0,0056	0,0443	0,4422	0,4159	0,9449	0,0001
IL-17F	0,0217	0,3336	0,3563	0,0049	0,0429	0,0056		0,0047	0,0845	0,3545	0,5915	0,0211
IL-21	0,0704	0,0088	0,2308	0,0048	0,0181	0,0443	0,0047		0,6314	0,7541	0,5396	0,3936
Catelicidina	0,8644	0,6645	0,2519	0,2461	0,2575	0,4422	0,0845	0,6314			0,2439	0,6004
Vit D serica	0,7338	0,8641	0,7868	0,5715	0,3893	0,4159	0,3545	0,7541			0,2778	0,5619
VDR	0,3149	0,4997	0,3044	0,5577	0,4837	0,9449	0,5915	0,5396	0,2439	0,2778		0,9714
CAMP	0,0169	0,6373	0,7731	0,1278	0,6893	0,0001	0,0211	0,3936	0,6004	0,5619	0,9714	

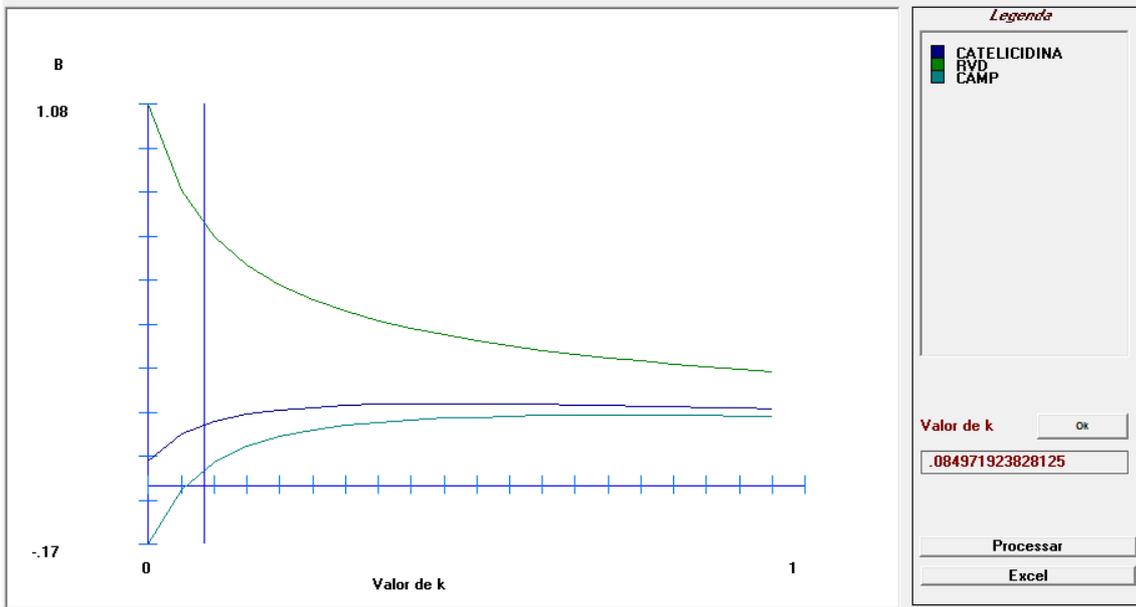
6. Matriz de correlação de *Pearson* para o grupo de contatos.

Contatos (Correlação de Pearson) - dados Normalizados											
	IFN- γ	TNF- α	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	VDR	CAMP
IFN- γ	0,0000	0,4988	0,6929	0,3546	0,3385	-0,0270	0,6974	-0,3548	0,3308	0,6578	-0,1724
TNF- α	0,4988	0,0000	0,4419	0,1854	0,2233	0,6627	0,7884	0,2889	0,6093	0,5833	-0,1432
IL-4											
IL-6	0,6929	0,4419	0,0000	0,8702	0,6252	0,0799	0,5288	0,5128	-0,1206	0,3046	-0,2199
IL-13	0,3546	0,1854	0,8702	0,0000	0,5551	-0,0551	0,2284		-0,3525	-0,1298	-0,1348
IL-17A	0,3385	0,2233	0,6252	0,5551	0,0000	0,1604	0,2310	0,1034	-0,1632	-0,0403	-0,1709
IL-17F	-0,0270	0,6627	0,0799	-0,0551	0,1604	0,0000	0,3607	0,5301		-0,1291	-0,0840
IL-21	0,6974	0,7884	0,5288	0,2284	0,2310	0,3607	0,0000	-0,3799	0,7160	0,6588	-0,0830
Catelicidina	-0,3548	0,2889	0,5128		0,1034	0,5301	-0,3799	0,0000	-0,6829		
Vit D serica	0,3308	0,6093	-0,1206	-0,3525	-0,1632		0,7160	-0,6829	0,0000	0,2307	0,7670
Rec Vit D	0,6578	0,5833	0,3046	-0,1298	-0,0403	-0,1291	0,6588		0,2307	0,0000	-0,1703
CAMP	-0,1724	-0,1432	-0,2199	-0,1348	-0,1709	-0,0840	-0,0830		0,7670	-0,1703	0,0000
p valores											
	IFN- γ	TNF- α	IL-6	IL-13	IL-17A	IL-17F	IL-21	Catelicidina	Vit D serica	Rec Vit D	CAMP
IFN- γ		0,0111	0,0001	0,0820	0,0979	0,8980	0,0001	0,3885	0,4687	0,0056	0,5232
TNF- α	0,0111		0,0270	0,3750	0,2833	0,0003	0,0000	0,4877	0,1464	0,0177	0,5967
IL-4											
IL-6	0,0001	0,0270		0,0000	0,0008	0,7041	0,0066	0,1938	0,7967	0,2514	0,4132
IL-13	0,0820	0,3750	0,0000		0,0040	0,7936	0,2720		0,4381	0,6318	0,6187
IL-17A	0,0979	0,2833	0,0008	0,0040		0,4437	0,2667	0,8075	0,7267	0,8822	0,5269
IL-17F	0,8980	0,0003	0,7041	0,7936	0,4437		0,0765	0,1766		0,6337	0,7572
IL-21	0,0001	0,0000	0,0066	0,2720	0,2667	0,0765		0,3532	0,0704	0,0055	0,7599
Catelicidina	0,3885	0,4877	0,1938		0,8075	0,1766	0,3532		0,3171		
Vit D serica	0,4687	0,1464	0,7967	0,4381	0,7267		0,0704	0,3171		0,7693	0,2330
VDR	0,0056	0,0177	0,2514	0,6318	0,8822	0,6337	0,0055		0,7693		0,5282
CAMP	0,5232	0,5967		0,4132	0,6187	0,5269	0,7572	0,7599		0,2330	0,5282

APÊNDICE 4. Gráficos do traço da crista, representando a variação nos valores dos coeficientes de regressão com diversos valores de k.

Fonte: Programa Genes - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística

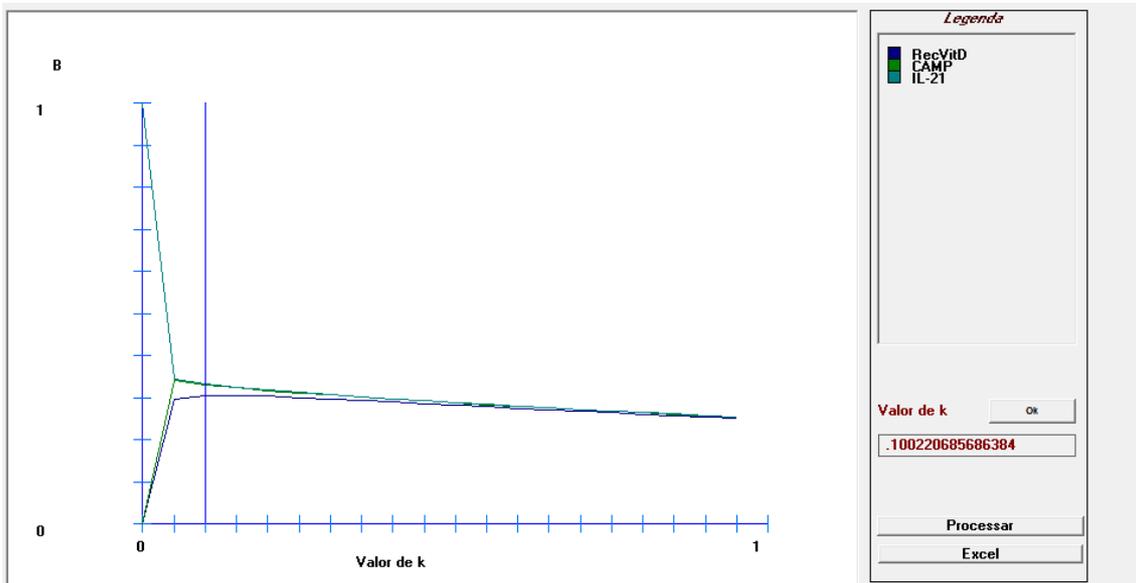
Grupo PB antes do tratamento PQT.



Análise de trilha com multicolinearidade valor de $k=0,084$

Fonte: Programa Genes - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística

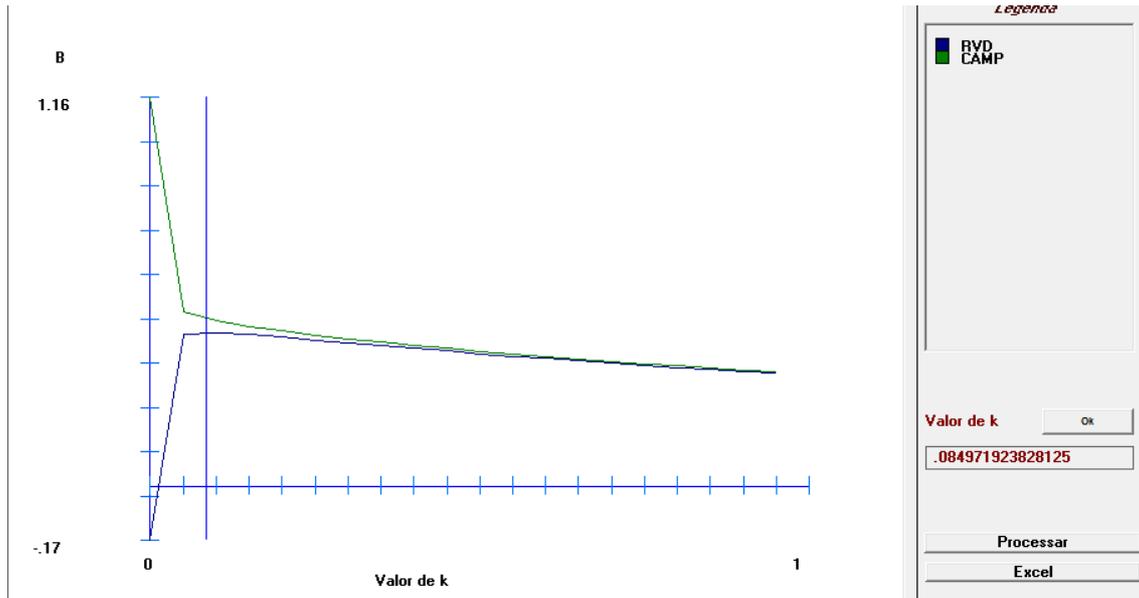
Grupo PB após seis meses do tratamento PQT.



Análise de trilha com multicolinearidade: valor de $k=0,1002$

Fonte: Programa Genes – Aplicativo Computacional em Genética e Estatística

Grupo MB antes do tratamento PQT.



Análise de trilha com multicolinearidade valor de $k=0,0849$

Fonte: Programa Genes - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística

Mensagem Final

*Pra que nossa esperança
Seja mais que vingança
Seja sempre um caminho
Que se deixa de herança
Ivan Lins*