

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Maria Júlia Lara Lamac Vieira Cunha

**ASSOCIAÇÃO DE BIOMARCADORES DO INFLAMASSOMA
COM REAÇÕES HANSÊNICAS TIPO 1**

Belo Horizonte
2017

Maria Júlia Lara Lamac Vieira Cunha

**ASSOCIAÇÃO DE BIOMARCADORES DO INFLAMASSOMA
COM REAÇÕES HANSÊNICAS TIPO 1**

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

Orientador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

Coorientadores: Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier

Prof^a. Dra. Ana Thereza Chaves

Belo Horizonte
2017

Cunha, Maria Júlia Lara Lamac Vieira.
C972a Associação de biomarcadores do inflamassoma com reações
hansênicas tipo 1[manuscrito]. / Maria Júlia Lara Lamac Vieira Cunha. - -
Belo Horizonte: 2017.
99f.: il.
Orientador: Manoel Otávio da Costa Rocha.
Coorientador: Marcelo Antônio Pascoal Xavier; Ana Thereza Chaves.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Hanseníase. 2. Imunidade Inata. 3. Imuno-Histoquímica. 4.
Biomarcadores. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Rocha, Manoel Otávio da
Costa. II. Xavier, Marcelo Antônio Pascoal. III. Chaves, Ana Thereza. IV.
Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.
NLM: WC 335

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

REITOR

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

VICE-REITORA

Prof^a. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

PRÓ-REITORA DE PESQUISA

Prof. Dr. Ado Jório de Vasconcelos

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA DIRETOR

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Prof. Dr. Humberto José Alves

COORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a. Dra. Ana Cristina Cortes Gama

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Prof^a. Dra. Valéria Maria Augusto

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL**

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

Prof. Dr. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. Dra. Denise Utsch Gonçalves

Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho

Prof. Dr. Unai Tupinambás

Representante discente

Beatriz Silveira Salles



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

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Associação de Biomarcadores do Inflamassoma com a reação Hansênica
Tipo 1"

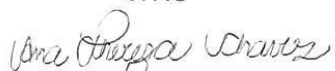
MARIA JÚLIA LARA LAMAC VIEIRA CUNHA

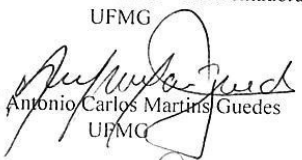
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

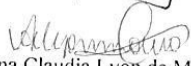
Aprovada em 28 de abril de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha - Orientador
UFMG


Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier - Coorientador
UFMG


Dra. Ana Thereza Chaves - Coorientadora
UFMG


Prof. Antonio Carlos Martins Guedes
UFMG


Dra. Ana Claudia Lyon de Moura
FHEMIG

Belo Horizonte, 28 de abril de 2017.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E
MEDICINA TROPICAL

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA MARIA JÚLIA LARA LAMAC VIEIRA CUNHA

Realizou-se, no dia 28 de abril de 2017, às 14:00 horas, sala 340, 3º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 317ª defesa de dissertação, intitulada "*Associação de Biomarcadores do Inflamassoma com a reação Hansênica Tipo 1*", apresentada por MARIA JÚLIA LARA LAMAC VIEIRA CUNHA, número de registro 2015657511, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha - Orientador (UFMG), Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier - Coorientador (UFMG), Dra. Ana Thereza Chaves - Coorientadora (UFMG), Prof. Antonio Carlos Martins Guedes (UFMG), Dra. Ana Claudia Lyon de Moura (FHEMIG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 28 de abril de 2017.

Prof. Manoel Otavio da Costa Rocha

Prof. Marcelo Antonio Pascoal Xavier

Dra. Ana Thereza Chaves

Prof. Antonio Carlos Martins Guedes

Dra. Ana Claudia Lyon de Moura

Às pessoas com hanseníase e seus familiares.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Manoel Otávio da Costa Rocha, por me aceitar como sua orientanda e por ter dedicado grande parte do seu tempo à minha formação nesses últimos anos. Obrigada por me acolher na disciplina “Prática Docente” e, a partir daquele momento, contribuir imensamente para meu aprendizado sobre a didática do ensino superior. Agradeço também por me proporcionar ensinamentos teóricos nas diversas áreas do conhecimento e por ser o meu maior exemplo de médico, que concilia a pesquisa básica com a pesquisa clínica, levando ao mais humilde dos pacientes a oportunidade do cuidado de excelência.

Ao Professor Doutor Marcelo Antônio Pascoal Xavier, por ter aceitado prontamente o convite para participar desse trabalho e pelas grandes contribuições feitas. Minha admiração pelo seu trabalho começou há alguns anos, quando a disciplina “Patologia Médica” foi o divisor de águas da minha formação acadêmica. A partir do seu exemplo de ética, profissionalismo, competência e amor pela docência dediquei-me a buscar, cada dia mais, o aprimoramento na arte médica.

À Doutora Ana Thereza Chaves, pela importante participação na minha formação como pós-graduanda e pelas diversas contribuições ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por me guiar nos primeiros passos pela imunologia e por ter a capacidade de me encantar com essa disciplina, hoje essencial e indispensável à minha prática clínica.

À Professora Doutora Sandra Lyon, por me acolher há sete anos na Liga Mineira de Dermatologia, quando eu ainda cursava o último ano da Faculdade de Medicina. Obrigada por acreditar em mim e por não medir esforços para me auxiliar na realização dos meus sonhos profissionais. Ela sempre será minha inspiração na arte de cuidar dos enfermos e de ensinar a Dermatologia, pois, foi com seu exemplo que aprendi a amar a assistência aos pacientes acometidos pela hanseníase. Que meus olhos e coração sejam incansáveis como os dela, para oferecer um diagnóstico preciso e uma assistência humanizada.

À Izabel Cristina Sad das Chagas, por gentilmente ceder a lista de notificação dos pacientes com hanseníase, diagnosticados no Hospital Eduardo de Menezes, nos últimos anos.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Hospital Eduardo de Menezes, por terem realizado a separação dos prontuários, com disposição e generosidade.

Aos laboratórios CEAP, Cytogenesis, Lupa, Analys, Tafuri, Cito-Diagnóstico e Instituto Moacyr Junqueira, por confiarem no meu trabalho e, cuidadosamente, cederem os blocos de parafina contendo as amostras de pele dos pacientes selecionados para esse estudo.

À Fernanda César e Silva Barros, técnica do Laboratório de Anatomia Patológica, pela participação essencial nesse trabalho durante a realização da técnica imuno-histoquímica. Obrigada pelos ensinamentos diários nesse período, pela paciência e sobretudo pela atenção aos detalhes para que os experimentos fossem contemplados por uma boa qualidade.

À Professora Doutora Paula Vieira Teixeira Vidigal e à Dra. Ana Luísa Gomes Mendes, por terem disponibilizado tempo à avaliação imuno-histoquímicas das amostras dessa pesquisa, juntamente com o Professor Doutor Marcelo Antônio Pascoal Xavier.

À Professora Doutora Mery Natali Silva Abreu, pelos ensinamentos sobre estatística e pelo grande auxílio nas análises.

À Dra. Bárbara Proença Nardi de Assis, pela atenção e tempo dedicados a mim e ao meu trabalho.

Aos membros da Banca Professora Doutora Ana Cláudia Lyon de Moura, Professor Doutor Antônio Carlos Martins Guedes, Cristiane Alves Silva Menezes e Professora Doutora Maria Aparecida de Faria Grossi, por aceitarem o meu convite para contribuição nesse trabalho.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Hanseníase Ana Laura Grossi de Oliveira, Edilamar Silva de Alecrim, Karina de Sousa Paula, Atvaldo Fernandes Ribeiro Junior, Fábio Cassirer Costa e Luciana Cardoso de Andrade, pela disponibilidade em contribuir das mais diversas formas para o meu desenvolvimento.

Aos professores e funcionários da pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial Jussara Magalhães e Luciene Vieira, por me possibilitarem um novo horizonte, com empenho para o meu aprendizado.

Aos colegas das disciplinas Prática Docente e Doenças Infectoparasitárias, Weverton Siqueira, Isabella Borges, Júlia Fonseca de Moraes Caporali, Paulo

Cavalcanti, Nathalia Sernizon, Betânia Pontelo, Carla Miranda, meu grande apreço por termos dividido bons momentos de aprendizado.

Aos funcionários do Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infectoparasitárias Orestes Diniz, em especial Cinthia Maria Gomes e Silva, Moisés José dos Santos, Danielle Valias Fernandes e João Carlos Martins, pela parceria e prazerosa convivência.

Aos órgãos de financiamento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – CBB - APQ-02332-13 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - nº 485891/2013-1, pelo financiamento do projeto.

À Luciana Paione de Carvalho e à Núbia de Souza Santos, minha admiração e agradecimento pelo gerenciamento ético, rigoroso e humano das instituições Hospital Eduardo de Menezes e Centro de Medicina Especializada, Pesquisa e Ensino, o que possibilita um ambiente acadêmico humanizado e prazeroso de se estudar e trabalhar.

Aos Professores da Residência Médica de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes e do Centro de Medicina Especializada, Pesquisa e Ensino, Dra. Maria Aparecida de Faria Grossi, Dra. Rozana Castorina da Silva, Dra. Ana Cláudia Lyon de Moura, Dr. Moises Salgado Pedrosa, Dra. Sílvia Helena Lyon de Moura, Dra. Jane Ventury Leal, Dra. Fabiany Sanglard da Silva, Dra. Juliana Cunha Sarubi Noviello, Dr. Anderson Gomes Pereira Magnago, Dr. Daniel Seixas Dourado, Dra. Rosa Jacqueline Garcia Macias e Hyllo Baeta Marcello Júnior, por me permitirem crescer e aprender com seus incansáveis ensinamentos.

Aos funcionários, residentes, estagiários e alunos do Hospital Eduardo de Menezes e do Centro de Medicina Especializada, Pesquisa e Ensino, pelo atendimento exemplar prestado aos pacientes participantes dessa pesquisa.

À Maria Helena Azevedo, minha admiração, por recepcionar com respeito e atenção os pacientes vindos de diversos lugares, culturas, condições socioeconômicas e emocionais ao longo desses anos.

Ao Dr. Ismael Alves Rodrigues Júnior, meu primeiro professor de Dermatologia na Graduação, minha admiração por ter sido exemplo de ética e competência e, especialmente, por ter me permitido conhecer a hanseníase e presenciar o diagnóstico clínico da doença pela primeira vez, durante o atendimento de uma criança, em uma de suas aulas práticas.

À Dra. Maria Aparecida Alves Ferreira, pela pronta disposição em ajudar sempre que solicitada.

Às minhas grandes amigas Helena Lyon Moreira, Maria Thereza Pace Capanema e Mariana Pace Boardman, meu carinho pelos incentivos, escuta e abraços, essenciais para a contemplação da chegada.

Ao meu esposo Thales, pelo incentivo e insistência para que eu realizasse o internato Hospitalar da Faculdade de Medicina do Vale do Aço, sete anos atrás, na cidade de Belo Horizonte. Isso me possibilitou enxergar novos horizontes e, a partir de então, ter a oportunidade de conhecer uma medicina de excelência e me apaixonar por ela. Minha gratidão pelo companheirismo ao longo dessa jornada e pela paciência nos últimos meses.

Aos meus amados pais, Rosália e Pedro, minha gratidão por zelarem, desde minha tenra infância, pela minha educação e por serem os maiores incentivadores da minha formação científica. Obrigada pelo exemplo de fraternidade e pelo exercício diário de amor ao próximo. Com eles, posso sentir a presença de Deus em minha vida, e encontrar a Sua luz, até mesmo nos momentos mais árduos, o que me proporciona paz, amor e a esperança de um mundo melhor.

À minha avó Irene, que partiu no início dessa etapa, por ter deixado em mim seu olhar de “dever cumprido”.

Ao meu afilhado Davi, que chegou em 2016, me presenteando com sinceros olhares e sorrisos, e ao meu afilhado Yan, por me fazer acreditar desde o seu recente ingresso na Faculdade de Medicina, que o futuro da Medicina está nos jovens que, como ele, amam a arte de cuidar e já o fazem naturalmente desde tão cedo.

À minha família e amigos, agradeço o amor, carinho, orações e palavras de incentivo.

Enfim, dedico meu amor e contemplação pela garra de enfrentamento dessa doença, ainda hoje tão estigmatizada, aos pacientes com hanseníase e aos seus familiares. Muito obrigada.

*“O senhor não daria banho a um leproso
nem por um milhão de dólares.
Eu também não. Só por amor se pode dar
banho a um leproso.”*

Madre Tereza de Calcutá

RESUMO

Introdução e objetivos: A hanseníase é uma doença crônica, negligenciada, causada pelo *Mycobacterium leprae*. Essa evolução crônica, pode ser interrompida por episódios de inflamação aguda, conhecidos por reações hansênicas tipos 1 e 2. O padrão de imunidade desenvolvido pelo hospedeiro, permite resistir à doença ou desenvolver manifestações clínicas espectrais da hanseníase. Esse padrão espectral, tem relação direta com a imunidade montada pelo hospedeiro, a partir do reconhecimento do *M. leprae* pela imunidade inata. A reação tipo 1 é a principal causa de incapacidade e deformidade na doença, e existe uma escassez de biomarcadores que possam predizê-la. Diante desse problema, este estudo objetivou avaliar a associação de biomarcadores do inflamassoma com reações tipo 1. **Pacientes e métodos:** Estudo observacional, transversal e comparativo da expressão de biomarcadores do inflamassoma em pacientes com hanseníase, diagnosticados entre 2012 e 2015, em centro de referência de Minas Gerais, Brasil. Foram considerados casos, os pacientes com hanseníase que desenvolveram reações tipo 1 ao longo do primeiro ano de tratamento e, controles, aqueles que não as apresentaram. A expressão dos biomarcadores foi analisada através de imuno-histoquímica da pele, biopsiada no diagnóstico da hanseníase. **Resultados:** Em relação à resposta celular inflamatória, foi observada forte expressão do biomarcador NLRP3, em 57,1% dos casos em comparação a 7,7% dos controles. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05\%$), além de medida de risco (OR = 16,00 [IC 95%: 1,61; 159,31]) significativamente maior nesses casos de forte expressão de NLRP3 nas células do infiltrado inflamatório dérmico. Não foram observadas diferenças nos biomarcadores caspases 1 e 4/5, IL-1 β e IL-6. **Conclusão:** Os resultados deste estudo indicam que NLRP3 pode ser um potencial biomarcador preditivo de reações hansênicas tipo 1 no momento do diagnóstico de hanseníase.

Palavras chaves: hanseníase; imunidade inata; inflamassoma; biomarcador; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Introduction and objectives: Leprosy is a chronic disease, neglected, caused by the *Mycobacterium leprae*. This chronic evolution can be interrupted by episodes of acute inflammation known as leprosy type 1 and 2 reaction. The immunity pattern developed by the host permits resisting to the disease or developing spectral clinic manifestation of leprosy. This spectral pattern has direct relation to the immunity assembled by the host, from the understanding of the *M. leprae* by the innate immunity. The leprosy type 1 reaction is the main cause of the incapacity and deformity in the disease, and there is a lack of biomarkers that can predict them. Up on this problem, this study intended to assess the association of inflammasome's biomarkers with leprosy type 1 reaction.

Patients and Methods: Observational study, transversal and comparative of the expression of inflammasome's biomarkers in patients with leprosy diagnosed between 2012 and 2015, in a center of reference in Minas Gerais, Brazil. The cases considered were patients with leprosy that developed leprosy type 1 reaction throughout the first year of treatment and, controls, those that did not presented them. The expression of biomarkers was analysed through immunohistochemistry of the skin, biopsied in diagnoses of leprosy.

Results: In relation to the inflammatory cellular response, it was observed strong expression of the biomarker NLRP3, in 57,1% of the cases in comparison to 7,7% of the controls. Difference statistically significant, along with the measure of risk significantly higher in this cases of strong expression of NLRP3 in cells of the infiltrated dermic inflammatory. Differences in the caspase-1 and 4/5, IL-1 β and IL-6 biomarkers were not observed.

Conclusion: The NLRP3 can be a potential predictive biomarker of leprosy type 1 reaction at the moment of leprosy diagnoses.

Key-words: leprosy; innate immunity; inflammasome; biomarker; immunohistochemistry.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase, no mundo, em 2015.	26
Figura 2 - Características histológicas e mecanismos imunológicos que podem estar envolvidos na patogênese da Reação Tipo 1.....	34
Figura 3 - Inflamassoma clássico e não clássico.....	38
Figura 4 - Fluxograma do estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina de Minas Gerais com dados referentes ao período entre 2012 e 2016.	45
Figura 5- Representação dos setores da distribuição dos pacientes por grupo de estudo.....	52
Figura 6 - Imunorreatividade dos biomarcadores NLRP3, caspase-1, caspases-4/5, IL-1 β e IL-6 no epitélio e no infiltrado inflamatório das amostras dos grupos casos (imagens à esquerda) e controles (imagens à direita).....	56
Figura 7 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador NLRP3 na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	58
Figura 8 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador caspase-1 na epiderme e derme entre casos e controles segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	58
Figura 9- Percentual da imunorreatividade do biomarcador Caspase-4/5 na epiderme e derme entre casos e controles segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	59
Figura 10 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL-1 β na epiderme e derme entre casos e controles segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	59
Figura 11 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL-6 na epiderme e derme entre casos e controles segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	59
Figura 12- Percentual da imunorreatividade do biomarcador NLRP3 (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	61
Figura 13 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador caspase-1 (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	62
Figura 14- Percentual da imunorreatividade do biomarcador caspase-4/5 (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles,	

segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	62
Figura 15 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL-1 β (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	62
Figura 16 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL-6 (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diferenças clínicas entre reação tipo 1 e recidiva de hanseníase.....	33
Quadro 2 - Dados sobre as diluições dos anticorpos primários em diaminobenzidina.	46
Quadro 3 - Escala para análise semi-quantitativa da reatividade imuno-histoquímica	47
Quadro 4 - Parâmetros para análise semiquantitativa da imuno-histoquímica.....	48
Quadro 5 - Variáveis analisadas no estudo, sua classificação e categorias utilizadas	49
Quadro 6 - Descrição das características da reação tipo 1 entre os casos (n = 14).....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios para definição de reação hansênica tipo 1.....	42
Tabela 2 - Caracterização das variáveis sociodemográficas na amostra total e por grupo (n = 27).....	53
Tabela 3 - Caracterização das variáveis clínicas na amostra total e por grupo (n = 23).....	54
Tabela 4 - Comparação do Índice Baciloscópico entre casos e controles.....	55
Tabela 5 - Comparação entre casos e controles dos resultados de intensidade da imunorreatividade dos biomarcadores na derme, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	57
Tabela 6 - Comparação entre casos e controles dos resultados de intensidade da imunorreatividade dos biomarcadores (recategorizados) na epiderme segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).	60
Tabela 7 - Comparação entre casos e controles dos resultados de intensidade da imunorreatividade dos biomarcadores (recategorizados) na derme segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).....	61
Tabela 8 - Modelo final de regressão logística binária considerando como variável resposta o grupo de estudo (caso versus controle), com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina de Minas Gerais, entre 2012 e 2015.	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µl	Microlitros
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD</i> [proteína puntiforme associada à apoptose com um domínio CARD]
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CCL	<i>Chemokine C-C motif ligand</i> [ligante C-C da quimiocina]
CD	<i>Cluster of differentiation</i> [grupo de diferenciação]
CEAP	Centro Especializado em Anatomia Patológica
CI	<i>Confidence interval</i> [intervalo de confiança]
CLR	<i>C-type lectin receptor</i> [receptor de lectina tipo C]
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CXCL	<i>Chemokine C-X-C motif ligand</i> [ligante C-X-C de quimiocina]
CXCR	<i>Chemokine receptor CXC</i> [receptor CXR de quimiocina]
DAB	Diaminobenzidina
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i> [padrões moleculares associados ao dano]
DD	dimorfa dimorfa
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> [ácido desoxirribonucleico]
DT	dimorfa tuberculoide
DV	dimorfa virchowiana
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> [ácido etilenodiamino tetra-acético]
ENH	Eritema nodoso hansênico
Epi	epiderme
FAMIN	Variações do nucleotídeo C13orf31 que codificam as proteínas C284R e I254V
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FOXP	<i>FOX family protein</i> [proteína da família FOX]
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> [estudo de associação ampla do genoma]
HE	hematoxilina-eosina
HEM	Hospital Eduardo de Menezes
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> [antígeno leucocitário humano]
I	indeterminada

IC	intervalo de confiança
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> [molécula de adesão intercelular]
IDO	<i>indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase</i> [indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase]
IFN	interferon
Ig	imunoglobulina
IGRA	<i>Interferon gamma release assays</i> [ensaios de produção de interferon gama]
IHQ	imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IL-1RA	<i>interleukin-1 receptor antagonist</i> [antagonista do receptor da interleucina-1]
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> [óxido nítrico sintase induzida]
Int	intensidade
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i> [proteína 10 induzida por interferon]
LPS	lipopolissacarídeo
LT	<i>lymphotoxin</i> [linfotoxina]
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MB	Multibacilar
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> [proteína quimiotática de monócitos-1]
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i> [fator estimulante de colônias de macrófagos]
mM	Milimolar
NAIP	<i>NLR family apoptosis inhibitory protein</i> [proteína inibitória da apoptose da família NLR]
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> [fator nuclear kappa B]
NLR	<i>NOD-like receptor</i> [receptor do tipo NOD]
NLRP	<i>NLR family pyrin domain</i> [família NLR com domínio de pirina]
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing</i> [domínio de oligomerização a nucleotídeos]
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> [razão de chances]

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> [padrões moleculares associados ao patógeno]
PB	Paucibacilar
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> [células mononucleares do sangue periférico]
PBS	<i>Peroxidase-Blocking Solution</i> [solução de bloqueio da peroxidase]
PCR [a]	<i>PolymeraseChainReaction</i> [reação em cadeia de polimerase]
PCR [b]	Proteína C reativa
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> [fator de crescimento derivado de plaquetas]
PGL	<i>Phenolic glycolipids</i> [glicopeptídeo fenólico]
pH	Potencial hidrogeniônico
PQT	poliquimioterapia
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i> [receptores de reconhecimento de padrão]
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i> [receptor do tipo RIG-I]
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> [ácido ribonucleico]
RR	Reação reversa
RT1	Reação tipo 1
RT2	Reação tipo 2
SMOC	<i>Supramolecular organizing centres</i> [centros de organização supramolecular]
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i> [polimorfismos de nucleotídeo único]
TGF	<i>Transforming growth factor</i> [fator transformador de crescimento]
Th	<i>T helper</i> [T auxiliar]
TLR	<i>Toll-like receptor</i> [receptor do tipo TOLL]
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> [fator de necrose tumoral] (referência à citocina e ao gene)
Treg	T regulador
TT	Tuberculoide tuberculoide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> [receptor de vitamina D]
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> [fator de crescimento endotelial vascular]
VV	Virchowiana virchowiana
µm	Micrômetros

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	22
2	INTRODUÇÃO	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	<i>Epidemiologia da hanseníase</i>	<i>25</i>
3.2	<i>Agente etiológico</i>	<i>26</i>
3.3	<i>Classificação da hanseníase.....</i>	<i>27</i>
3.4	<i>Reações hansênicas</i>	<i>28</i>
3.4.1	Reação hansênica tipo 1 ou reação reversa	29
3.4.1.1	Epidemiologia e fatores de risco	29
3.4.2	Patogenia: aspectos imunológicos	30
3.4.2.1	Imunidade inata.....	30
3.4.2.2	Imunidade adquirida na reação hansênica do tipo 1	31
3.4.3	Manifestações clínicas da reação do tipo 1	32
3.4.4	Diagnóstico e diagnóstico diferencial	32
3.4.4.1	Análise histopatológica.....	33
3.5	<i>Biomarcadores preditivos para a reação tipo 1.....</i>	<i>34</i>
3.6	<i>Componentes do inflamassoma como biomarcadores candidatos</i>	<i>36</i>
3.6.1	Inflamassoma e reação hansênica tipo 1	40
4	OBJETIVOS.....	41
4.1	<i>Objetivo geral</i>	<i>41</i>
4.2	<i>Objetivos específicos</i>	<i>41</i>
5	PACIENTES E MÉTODOS	42
5.1	<i>Considerações éticas</i>	<i>42</i>
5.2	<i>Participantes do estudo.....</i>	<i>42</i>
5.2.1	Critérios de seleção	43
5.2.2	Critérios de inclusão.....	43
5.2.3	Critérios de exclusão	43
5.3	<i>Delineamento do estudo e cenário da pesquisa</i>	<i>43</i>

5.3.1	Coloração com hematoxilina-eosina	45
5.3.2	Técnica de imuno-histoquímica	46
5.4	<i>Análises estatísticas</i>	48
5.4.1	Cálculo amostral	48
5.4.2	Variáveis analisadas dos grupos casos, controles e controles saudáveis/pele basal	49
5.4.3	Comparação dos biomarcadores entre casos e controles	49
5.4.4	Caracterização da amostra	50
5.4.4.1	Análise univariada	50
5.4.4.2	Análise multivariada	50
6	RESULTADOS	52
6.1	<i>Características demográficas, epidemiológicas e clínicas</i>	52
6.2	<i>Comparação dos biomarcadores entre casos e controles</i>	55
6.2.1	Análise univariada	55
6.2.2	Análise de regressão logística	63
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÃO	70
9	PROPOSIÇÕES	71
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A - Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov	80
	ANEXO A - Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFMG	81
	ANEXO B - Dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	82
	ANEXO C - Saídas das análises	83

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O projeto intitulado “Associação de biomarcadores do inflamassoma com reação hansênica tipo 1” foi desenvolvido dentro da linha de pesquisa “Epidemiologia e Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias” e está inserido no grupo de pesquisa “Hanseníase”, que desenvolve trabalhos na grande área do conhecimento das ciências biológicas e da saúde, como imunologia da hanseníase.

Os pacientes incluídos no estudo foram atendidos no Hospital Eduardo de Menezes entre os anos de 2012 e 2015, onde foram diagnosticados com hanseníase e classificados de acordo com os critérios de Ridley e Jopling. A classificação histopatológica foi posteriormente confirmada pelo Prof. Dr. Marcelo Pascoal, do Laboratório de Patologia Molecular do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Durante o desenvolvimento do estudo, a discente Maria Júlia Lara Lamac Vieira Cunha participou de todas as etapas: revisão de prontuários, solicitação e devolução dos blocos de parafina contendo material biológico dos pacientes selecionados, realização da técnica de imuno-histoquímica, análise da expressão dos biomarcadores nas lâminas preparadas por imuno-histoquímica e análise dos dados.

A presente dissertação teve como objetivo apresentar os resultados obtidos durante o mestrado, na qual foi avaliada a expressão dos biomarcadores do inflamassoma e da IL (IL)-6 em pacientes com hanseníase que desenvolveram reação hansênica tipo 1 (casos), e pacientes com hanseníase que não a desenvolveu (controles). Para tanto, foram avaliadas as características histológicas e o padrão imuno-histoquímico do receptor do tipo NOD com domínio de pirina (NLRP) 3, caspase-1, caspases-4/5, IL-1 β e IL-6. A dissertação foi estruturada em 13 partes principais: I) Considerações iniciais; II) Introdução; III) Revisão de literatura; IV) Objetivos; V) Pacientes e métodos; VI) Resultados; VII) Discussão; VIII) Conclusão; IX) Proposições; X) Considerações finais; XI) Referências bibliográficas; XII) Apêndice; XIII) Anexos (contendo parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

2 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica, granulomatosa, infectocontagiosa, causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular que apresenta tropismo para a pele e nervos periféricos. Pertence ao grupo das doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e é endêmica em diversos países, ou seja, com relato de um ou mais casos para cada 10.000 habitantes. Em 2015, a prevalência mundial foi de 0,2 casos por 10.000 pessoas, mas a prevalência no Brasil foi de 1,01, o que representa, em números absolutos, 28.761 casos novos nesse ano (OPROMOLLA, 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016a; BRASIL, 2015).

A evolução crônica da hanseníase pode cursar com fenômenos agudos, devido à hipersensibilidade aos antígenos do *M. leprae*, chamados episódios reacionais do tipo 1 (RT1) ou tipo 2 (RT2), que têm relação com a imunidade do indivíduo e, dependendo da intensidade e do órgão atingido, podem deixar sequelas, se não precocemente diagnosticados e tratados (RIDLEY; JOPLING, 1966; OPROMOLLA, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HANSENOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA, 2003; ANDRADE *et al.*, 2015).

Essa relação direta com a imunidade montada pelo hospedeiro ocorre a partir do reconhecimento do *M. leprae* pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que estabelecem as bases para a imunidade inata. Esses receptores são subdivididos em famílias, com base na homologia, localização e sinalização. O primeiro PRR identificado foi o TLR, com homologia ao receptor de *Drosophila* Toll. Posteriormente, foram descritos os NLR, CLR, RLR e ALR (GAY; KEITH, 1991; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Os PRRs detectam e respondem a padrões expressos por microorganismos, denominados padrões moleculares associados ao patógeno [pathogen-associated molecular patterns] (PAMP) e danos moleculares associados ao patógeno [damage-associated molecular patterns] (DAMP). TLRs e CLRs são localizados na membrana plasmática e monitoram o espaço extracelular, já no citoplasma encontram-se os RLR, ALR e NLR (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; ODETALL; KAGAN, 2017).

A interação entre PRR e adaptadores induz a montagem de grandes complexos, denominados centros de organização supramolecular (SMOC). Os NLR e outros receptores citosólicos induzem a formação do complexo conhecido por

inflamassoma (MARTINON, BURNS.; TSCHOPP, 2002; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; ODETALL; KAGAN, 2017).

Os NLR são subdivididos em duas famílias, NOD1 e NOD2 que reconhecem fragmentos de peptidoglicanos bacterianos derivados de bactérias gram-negativas ou gram-positivas, respectivamente. Originalmente foram descritos como receptores citosólicos, mas alguns trabalhos têm demonstrado sua localização também na membrana celular. Existem descritos outros NLRs como: NLRP1, NLRP3 e NLRC4 e NAIPs, também envolvidos na formação de inflamassomas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

A melhor função efetora do inflamassoma acontece pela via canônica através da ativação da caspase-1 e, subsequentes clivagens das pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas formas maduras (KAYAGAKI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2016). Os inflamassomas também podem ser ativados pela via não canônica por meio da ligação de seus receptores às pró-caspases-4/5, responsáveis por reconhecerem lipopolissacarídeos (LPS), e conseqüentemente processar a IL-1 β (KAYAGAKI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2016; BROZ; DIXIT, 2016).

Desde a descoberta do inflamassoma, em 2002, esse complexo inflamatório tem sido estudado em diversas doenças e já existem evidências quanto à sua associação com a tuberculose (FREMOND *et al.*, 2007; MISHRA *et al.*, 2010). Na hanseníase, poucos estudos demonstraram a participação do inflamassoma e, até o momento, nenhum estudo avaliou suas possíveis atuações na reação tipo 1. O inflamassoma NLRP3 é o mais estudado até o momento e por isso foi escolhido para verificação neste estudo (ZHONG; KINIO; SALEH, 2013).

A reação hansênica tipo 1 é a principal causa de incapacidades e deformidades na hanseníase, mas até o momento não conta com biomarcadores validados que possam predizê-la (SCOLLARD *et al.*, 1994; VAN BRAKELL *et al.*, 1994; ANDRADE *et al.*, 2015b). Diante desse problema, esse estudo se justifica e poderá auxiliar no desenvolvimento de marcadores da morbidade, prognóstico e até mesmo de novos alvos terapêuticos para a condição.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A hanseníase é uma doença infecciosa, granulomatosa, com manifestações polimorfas que necessitam ser diagnosticadas de maneira correta, com o objetivo de terapêutica apropriada, incluindo o manejo adequado das reações hansênicas, para que sequelas e deformidades sejam evitadas (GROSSI, 1987).

3.1 Epidemiologia da hanseníase

Desde a introdução da poliquimioterapia (PQT), há cerca de três décadas, diminuiu a prevalência de hanseníase no mundo, a qual passou a ser considerada como passível de ser tratada no âmbito da atenção primária à saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

Várias estratégias foram instituídas para eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, enfatizando-se a diminuição do número de novos casos com grau de incapacidade 2 e buscando promover a detecção precoce e a redução da transmissão da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

A eliminação da hanseníase como problema de saúde pública (ou seja, prevalência registrada abaixo de 1 por 10.000 habitantes) foi alcançada, em 2000, em escala mundial, e, até 2005, na maioria dos países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

De acordo com relatórios oficiais recebidos de 138 países de todas as regiões da OMS, a prevalência global registrada no final de 2015 foi de 176.176 casos (0,2 casos por 10.000 pessoas). O número de novos casos notificados no mundo, em 2015, foi de 211.973 (2,9 novos casos por 100.000 pessoas) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

As estatísticas globais mostram que 199.992 novos casos de hanseníase, correspondentes a 94% do total, foram notificados em 14 países sendo que três deles, com grandes populações – Índia, Brasil e Indonésia – notificam mais de 10.000 novos pacientes anualmente. Juntos, esses três países representam 81% dos pacientes recém-diagnosticados e notificados no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

A Figura 1, ilustra a distribuição geográfica mundial de novos casos de hanseníase, em 2015 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

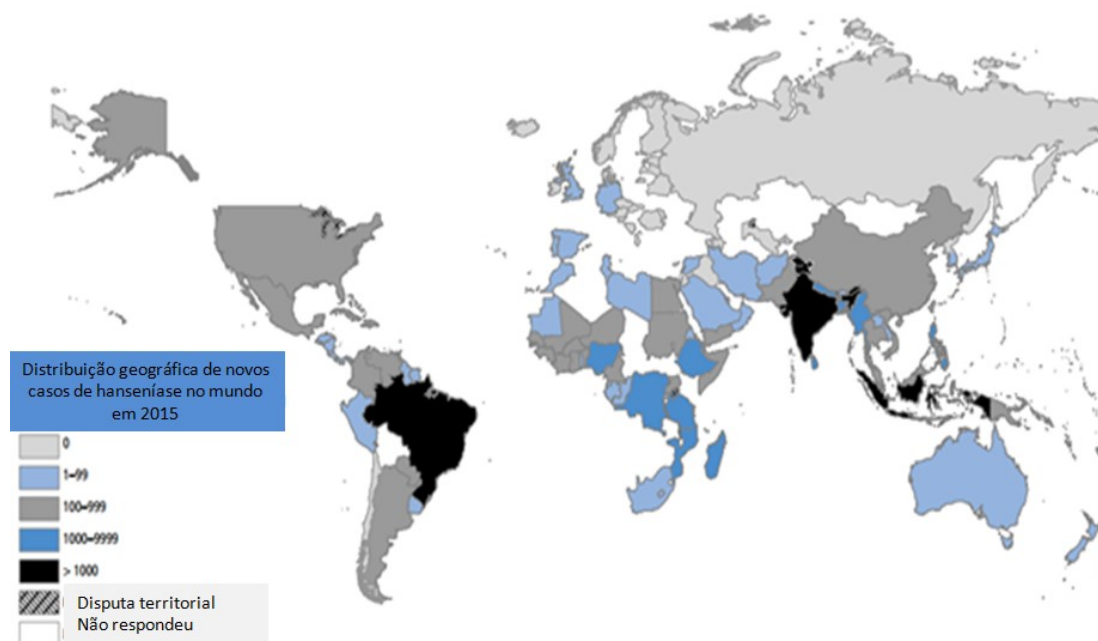


Figura 1 - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase, no mundo, em 2015.

Fonte: Organização Mundial da Saúde (2015).

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, em 2015, o coeficiente de detecção (por 100.000 habitantes) de novos casos no país foi de 14,07 e a prevalência pontual da doença (por 10.000 habitantes) de 1,01. Esses dados representam, em números absolutos, 28.761 casos novos diagnosticados em 2015 (BRASIL, 2016b).

A prevalência de hanseníase entre os diferentes estados do Brasil sofre grandes variações, secundárias a diversidades como nível socioeconômico, qualidade de assistência à saúde, entre outras. Minas Gerais, em 2015, apresentou prevalência de 0,42 (BRASIL, 2016c).

Nos últimos cinco anos houve apenas um pequeno declínio da detecção de novos casos de hanseníase no mundo, enquanto a taxa de grau de incapacidade 2 se manteve quase inalterada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

3.2 Agente etiológico

O *M. leprae*, descrito por Gerhard Armauer Hansen, em 1874, foi a primeira bactéria relacionada a uma doença humana. Não foi ainda cultivado *in vitro*, o que constitui um grande desafio para os microbiologistas. Nos tecidos humanos, apresenta-se como bacilos retos ou encurvados de dois a oito micra de comprimento por 0,3 micra de largura, aparecendo isolados ou dispostos em feixes paralelos,

formando as denominadas globias. A espécie é melhor identificada pela coloração de Fite-Faraco (GELBER, 1990; LYON; LYON, 2013).

A ultraestrutura do *M. leprae* assemelha-se à de outras micobactérias, embora apresente constituintes específicos como a espessa parede lipídica (20 micra), formada principalmente pelos PGL I, II e III (VISSA; BRENNAN, 2001).

É considerado um parasita específico do homem; no entanto, já foram encontrados tatus, macacos mangabei e chimpanzés doentes, porém não existem evidências de sua importância na cadeia de transmissão (VAN BEERS *et al.*, 1996; OPROMOLLA, 2000).

O bacilo apresenta tempo de multiplicação de 11 a 16 dias, permanecendo viável no meio ambiente por até nove dias, sendo que milhões deles permanecem viáveis por mais de três dias e somente 1% continua viável até sete dias. O *M. leprae* tem o mais lento tempo de multiplicação entre as micobactérias patogênicas, o que se reflete no tempo de incubação prolongado e na cronicidade da doença (OPROMOLLA, 2000; REES; YOUNG, 1985).

Embora ainda não se consiga cultivar o *M. leprae* em meios de cultura, pode-se obter a sua multiplicação pela inoculação de bactérias no coxim plantar de camundongos imunocompetentes, irradiados e timentomizados, ou em camundongos atímicos (SHEPARD, 1965; SHEPARD; MCRAE, 1965; REES, 1971).

O genoma de *M. leprae* já foi decodificado em 2001, sendo menor que o genoma do *M. tuberculosis*, e mostrando baixo número de genes com capacidade de expressar proteínas (COLE *et al.*, 2001).

3.3 Classificação da hanseníase

Ao longo da história, a hanseníase tem recebido diversas classificações. Em 1953, o VI Congresso Internacional de Leprologia, realizado em Madrid, estabeleceu a classificação da hanseníase segundo sua tendência de evoluir em direção a um dos seus polos, definindo-se duas formas polares e dois grupos: formas tuberculoide e virchowiana, e grupos indeterminado e dimorfo (MEMÓRIA, 1953; OPROMOLLA, 2000).

Baseando-se no espectro imunológico dos indivíduos, Ridley e Jopling, em 1962, apresentaram uma classificação que ampliou a de Madrid, dividindo o grupo dimorfo em três subgrupos – dimorfo tuberculoide (DT), dimorfo dimorfo (DD) e

dimorfo virchowiano (DV). Cada um destes subgrupos foi caracterizado por parâmetros clínicos, histopatológicos e imunológicos. Os autores ressaltaram a instabilidade dentro do grupo dimorfo, sendo que os pacientes dimorfo tuberculoides seriam estáveis, enquanto os pacientes dimorfo dimorfo e dimorfo virchowiano poderiam caminhar no espectro de maneira tórpida ou em surtos, em direção ao polo virchowiano. Ressaltaram, ainda, que pacientes situados no polo virchowiano poderiam, na vigência do tratamento, também apresentar surtos reacionais (RIDLEY; JOPLING, 1962; RIDLEY; JOPLING, 1966).

Do ponto de vista operacional, visando ao tratamento poliquimioterápico dos pacientes, a classificação adotada atualmente pela OMS, e seguida pelos países que possuem programas de controle para hanseníase, baseia-se no número de lesões cutâneas, sendo que **paucibacilares** seriam os pacientes com até cinco lesões de pele e, **multibacilares**, os pacientes com mais de cinco lesões de pele. Aqueles que apresentarem mais de um nervo comprometido (desde que devidamente documentado pela perda ou diminuição de sensibilidade nos respectivos territórios) deverão ser tratados como multibacilares, independentemente da situação de envolvimento cutâneo (BRASIL, 2016a).

O diagnóstico de hanseníase deve ser feito pelos critérios clínicos (história clínica e epidemiológica e exame dermatoneurológico). Quando disponível, a baciloscopia e o seu resultado positivo classificam o caso como multibacilar, embora um resultado negativo não exclua o diagnóstico clínico da hanseníase e também não classifique obrigatoriamente o doente como paucibacilar (BRASIL, 2016a).

3.4 Reações hansênicas

Os estados reacionais ou reações hansênicas (tipos 1 e 2) são alterações do sistema imunológico que se exteriorizam como manifestações inflamatórias agudas e subagudas, podendo ocorrer em qualquer paciente, embora mais frequentes nos pacientes multibacilares (GROSSI, 2013; BRASIL, 2016a).

As reações podem surgir antes, durante ou após o término do tratamento com a poliquimioterapia, sendo que cerca de 50% dos pacientes com hanseníase desenvolvem episódios reacionais durante o tratamento, ao passo que 30% apresentam reações imunológicas após a alta do tratamento específico, por período médio de até cinco anos (GROSSI, 2013; BRASIL, 2016a).

A reação tipo 1 (RT1) ou reação reversa (RR) caracteriza-se pelo aparecimento de novas lesões dermatológicas (manchas ou placas), infiltrações, alterações de cor e edema nas lesões antigas, com ou sem espessamento e dor de nervos periféricos (neurite). Já a reação tipo 2 (RT2), cuja manifestação clínica mais frequente é o eritema nodoso hansênico (ENH), caracteriza-se pelo aparecimento de nódulos subcutâneos dolorosos, acompanhados ou não de manifestações gerais como febre, dor articular, mal-estar, além de orquite e iridociclite, com ou sem espessamento e dor de nervos periféricos – neurite (BRASIL, 2016a).

O diagnóstico das reações, com ou sem neurite, é eminentemente clínico. As reações devem ser diagnosticadas por meio da investigação cuidadosa dos sinais e sintomas mais frequentes e exame físico geral, com ênfase na avaliação dermatoneurológica. Tais procedimentos são fundamentais para definir a terapêutica antirreacional e para monitorar o comprometimento dos nervos periféricos. Neurite isolada também pode ser a única manifestação de reação hansênica (BRASIL, 2016a).

3.4.1 Reação hansênica tipo 1 ou reação reversa

Os pacientes com hanseníase, mesmo após serem considerados curados e tratados, podem sofrer de episódios reacionais por longos períodos de tempo (SCOLLARD *et al.*, 1994; VAN BRAKEL *et al.*, 1994).

A RT1 ocorre, sobretudo, em pacientes imunologicamente instáveis (dimorfos), que apresentam mudanças no padrão de imunidade celular, correspondendo a uma hipersensibilidade do tipo IV na classificação de Gell e Coombs. A reação pode ocorrer no sentido de piora (reação descendente) ou melhora (reação ascendente ou reversa) da imunidade celular (SCOLLARD *et al.*, 1994; VAN BRAKEL *et al.*, 1994; LYON-MOURA; PEDROSA, 2013).

A RT1, ou reação reversa, é a principal causa de incapacidade física e deformidades na hanseníase (SCOLLARD *et al.*, 1994; VAN BRAKEL *et al.*, 1994).

3.4.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

É difícil o estabelecimento da incidência, prevalência, fatores de risco e tendências de eventos reacionais devido à grande heterogeneidade entre os relatos

publicados, não havendo consenso nem mesmo quanto definição de reação tipo 1. Os relatos de frequência dessa reação variam de 3,5 a 47,5% (ANDRADE *et al.*, 2015b).

Em geral são descritos como fatores de risco para RT1 o sexo, idade, doença generalizada, primeiro ano após introdução da poliquimioterapia, infecções crônicas, forma multibacilar, presença de antígenos micobacterianos nas lesões, embora alguns estudos tenham demonstrado que nenhum deles teve qualquer influência sobre o desenvolvimento da reação (VAN BRAKEL *et al.*, 1994; SCOLLARD *et al.*, 1994; MOTTA *et al.*, 2012).

Em elevada proporção de doentes coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana observam-se manifestações de RT1. O tratamento antiretroviral foi o único fator independente associado à presença da reação e tem sido associado a graves lesões reacionais (síndrome de reconstituição imune) (MENEZES *et al.*, 2014).

3.4.2 Patogenia: aspectos imunológicos

A resposta imunológica do hospedeiro à infecção pelo *M. leprae* é determinada pela composição genética do indivíduo. A maioria dos genes e regiões genômicas associadas com a suscetibilidade ou resistência à doença e a susceptibilidade às reações está relacionada a moléculas importantes das vias imunológicas.

A patogenia da reação hansênica do tipo 1 será apresentada em dois subtítulos, imunidade inata e imunidade adquirida.

3.4.2.1 Imunidade inata

A RT1 ocorre devido a mecanismo de hipersensibilidade tardia a antígenos de *M. leprae* (STEFANI; MACHADO, 2015), conquanto se acredite que a imunidade inata também pode ter importante participação na patogênese da mesma.

As primeiras evidências de associações entre reações hansênicas e polimorfismos vieram de estudos envolvendo TLR, receptores componentes da imunidade inata. Bochud e colaboradores (2010) observaram polimorfismo em TLR2

associado à proteção contra a hanseníase e a um risco aumentado de desenvolvimento de RT1 (BOCHUD *et al.*, 2008).

Stefani e colaboradores (2009) observaram associação entre maiores níveis plasmáticos da IL-6, uma citocina da imunidade inata, e, CXCL10 em pacientes com RT1 em comparação com os controles. Lockwood e colaboradores (2011) observaram TNF- α , iNOS e TGF- β detectadas por imuno-histoquímica mostraram associação significativa com a presença de reação cutânea (STEFANI *et al.*, 2009; LOCKWOOD *et al.*, 2011).

Cogen e colaboradores (2012) demonstraram que a beta defensina humana 3 é mais expressa em RT1 e que diminui essa expressão durante o tratamento com corticosteróides (COGEN *et al.*, 2012).

Pontillo e colaboradores (2013) observaram a combinação de halótipos no gene NLRP1 mais frequentes em controles e pacientes paucibacilares em relação aos multibacilares, sugerindo que o inflamassoma NLRP1 pode estar envolvido tanto no reconhecimento de *M. leprae* quanto na subsequente ativação inflamatória (estados reacionais) (PONTILLO *et al.*, 2013).

3.4.2.2 Imunidade adquirida na reação hansênica do tipo 1

A RT1 acontece devido à hipersensibilidade do tipo IV de Gell e Coombs, podendo resultar em melhora (*up-grading* ou reversa) ou piora (*down-grading*) da doença ao longo do seu espectro. A reação *down-grading* ocorre, em geral, quando o tratamento ainda não foi instituído, indicando evolução natural da progressão da doença em direção ao polo virchowiano. A reação de *up-grading* surge, em geral, após iniciada a terapêutica, indicando melhora na evolução da doença em direção ao polo tuberculoide (GROSSI, 2013).

Na RT1 observa-se aumento da infiltração de células T CD4⁺, responsáveis pela resposta imune mediada por células contra os antígenos de *M. leprae*. Pacientes com a forma multibacilar da doença que desenvolvem RT1 sofrem alterações drásticas exibindo diferentes populações celulares e formação de granuloma semelhante ao da forma tuberculoide, por meio de mudança no perfil de células T de Th2 para Th1 e produção de IFN- γ (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; STEFANI; MACHADO, 2015).

3.4.3 Manifestações clínicas da reação do tipo 1

Clinicamente, a RT1 caracteriza-se por exacerbação inflamatória de lesões cutâneas preexistentes – mais saliência, eritema, brilho, calor, podendo ocorrer ulceração e até necrose – ou pelo surgimento de novas lesões, associadas ou não ao comprometimento da função nervosa periférica (VAN BRAKEL *et al.*, 1994; GROSSI, 2013; BRASIL, 2016a).

As alterações sensoriais cutâneas variam de hiperestesia, parestesia ou alodinia, associadas ou não a comprometimento do nervo motor, com dor e espessamento do mesmo, o que constitui características clínicas clássicas das neurites na hanseníase. Contudo, as neurites podem ser silenciosas, quando o dano neural ocorre sem dor ou espessamento do nervo (VAN BRAKEL *et al.*, 1994; GROSSI, 2013; BRASIL, 2016a).

Devido à gravidade potencial dessas reações e seu impacto para o paciente, é importante distinguir as seguintes apresentações:

- **Reação tipo 1 crônica:** definida como uma série de lesões inflamatórias cutâneas consecutivas ou neurites que impedem a liberação do tratamento com corticosteroide;
- **Reação tipo 1 recorrente:** definida como o ressurgimento de sinais reacionais seis a doze semanas após a conclusão do tratamento com esteróides, anti-inflamatórios ou imunossupressores;
- **Reação tipo 1 tardia:** ocorre em qualquer momento posterior ao término da poliquimioterapia (ANDRADE *et al.*, 2015b).

3.4.4 Diagnóstico e diagnóstico diferencial

O diagnóstico da RT1 é eminentemente clínico, podendo-se lançar mão de alguns exames laboratoriais, como baciloscopia e histopatologia, quando indicados (BRASIL, 2016a).

Considerando que os quadros de reação reversa se caracterizam por reagudização das lesões antigas e surgimento de novas lesões em placas eritematosas e inflamatórias, é importante distingui-los das recidivas, geralmente insidiosas e pouco inflamatórias. O diagnóstico diferencial baseia-se na associação de exames clínicos e laboratoriais, especialmente a baciloscopia de raspado

intradérmico nos casos multibacilares. No Quadro 1 descrevem-se as diferenças clínicas que se aplicam à maioria dos casos (BRASIL, 2016a).

O diagnóstico precoce dessas reações é um grande desafio para efetivamente tratar e gerenciar RT1 e, por isso, há necessidade urgente de identificar biomarcadores mais significativos para preveni-las e diferenciar a reação tipo 1 tardia de recidiva da doença (BRASIL, 2016a).

Quadro 1 - Diferenças clínicas entre reação tipo 1 e recidiva de hanseníase

Características	RT1	Recidiva
Período de ocorrência	Frequente durante a PQT e/ou menos frequente no período de dois a três anos após término do tratamento	Em geral, período superior a cinco anos após término da PQT
Surgimento	Súbito e inesperado	Lento e insidioso
Lesões antigas	Algumas ou todas podem se tornar eritematosas, brilhantes, intumescidas e infiltradas	Geralmente imperceptíveis
Lesões recentes	Em geral, múltiplas	Poucas
Ulceração	Pode ocorrer	Raramente ocorre
Regressão	Presença de descamação	Ausência de descamação
Comprometimento neural	Muitos nervos podem ser rapidamente envolvidos, ocorrendo dor e alterações sensitivo-motoras	Poucos nervos podem ser envolvidos, com alterações sensitivo-motoras de evolução mais lenta
Resposta a medicamentos antirreacionais	Excelente	Não pronunciada

Fonte: Brasil (2016a).

3.4.4.1 Análise histopatológica

Na análise histopatológica da RT1, os granulomas podem se tornar mais coesos e ativados, com aumento de volume das células de Langhans. Pode haver erosão de granulomas para dentro da porção inferior da epiderme ou, ainda, necrose fibrinoide/caseosa dentro dos mesmos. Há diminuição ou desaparecimento dos bacilos íntegros (FIGURA 2) (LYON-MOURA; PEDROSA, 2013).

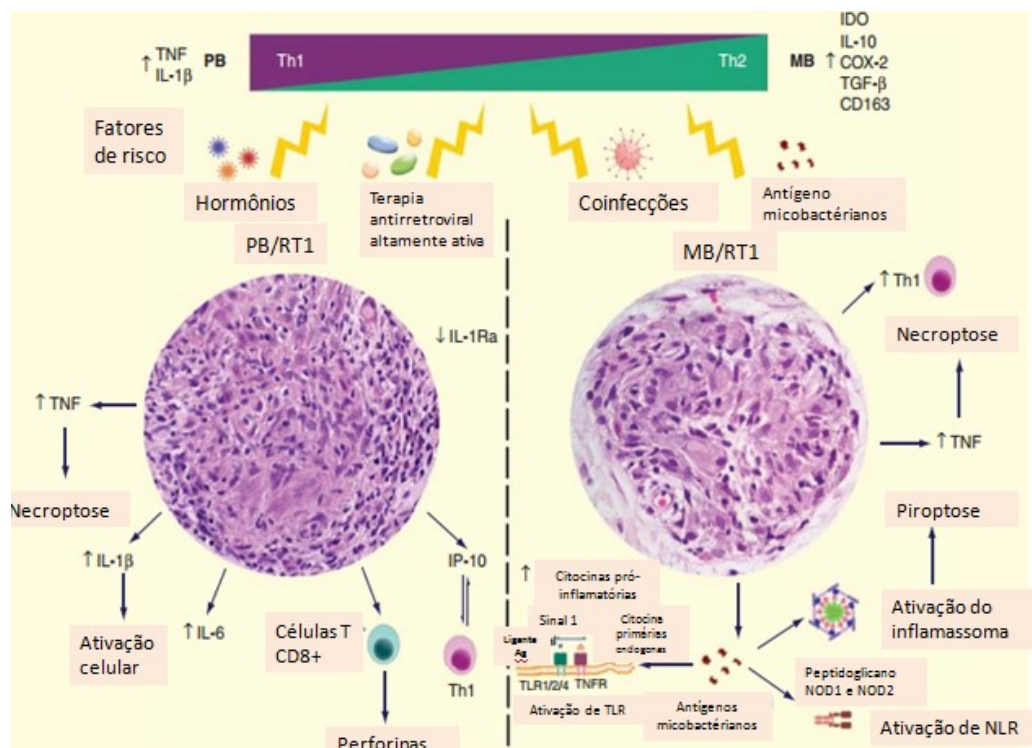


Figura 2 - Características histológicas e mecanismos imunológicos que podem estar envolvidos na patogênese da Reação Tipo 1.

Legenda: PB: paucibacilar; MB: multibacilar; Th: T helper; IDO: Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase [Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase]; IL: Inteleucina; COX-2: Ciclo-oxigenase-2; TGF- β : Transforming growth factor [fator transformador de crescimento]; CD: Cluster of differentiation [grupo de diferenciação]; RT1: reação tipo 1; TNF: Tumor necrosis factor [fator de necrose tumoral]; IP-10: Interferon gamma-induced protein 10 [proteína 10 induzida por interferon]; Ag: antígeno; TLR: TOLL like receptor [receptor do tipo TOLL]; NOD: nucleotide-binding oligomerization domain; NLR: *NOD like receptor* [receptor do tipo NOD].

Fonte: Andrade *et al.* (2015b) (modificado para fins didáticos).

Enquanto o granuloma observado na RT1 em indivíduos paucibacilares é uma estrutura altamente organizada, com células epitelióides rodeadas por linfócitos, o granuloma na RT1 em pacientes multibacilares é um aglomerado frouxo de células epitelióides, com poucos linfócitos. (ANDRADE *et al.*, 2015b).

3.5 Biomarcadores preditivos para a reação tipo 1

Alguns estudos nos últimos anos têm objetivado a investigação de biomarcadores preditivos das reações hansênicas e, em especial da RT1, devido aos seus potenciais incapacitantes.

Fator elementar nesses estudos de biomarcadores de predição das reações é a inclusão apropriada do grupo controle, para que se possa obter uma informação

precisa que reflita antecipadamente esse tipo de resposta, mas não necessariamente explique a resposta patogênica ao mesmo (GELUK, 2013).

Atkinson e colaboradores (2004) demonstraram aumento de IL-10 e IL-6, pela imuno-histoquímica, em pacientes com RT1 e observaram que, após o tratamento com prednisona oral, essas citocinas decresceram (ATKINSON *et al.*, 2004).

Stefani e colaboradores (2009) observaram maior nível plasmático de CXCL10 e IL-6 em pacientes com RT1 em comparação aos controles e elevação de IL6, IL7, PDGF-BB em RT2, sendo que os biomarcadores nas RT1 apresentaram significância estatística superior aos observados nas RT2 (STEFANI *et al.*, 2009).

Saini e colaboradores (2016) demonstraram maior número de células Th17 associadas ao nível maior das citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-23, IL-6 e quimiocinas CCL20 e CCL22 em pacientes reacionais e concomitantemente observou-se menor nível de FOXP3 e TGF- β (SAINI *et al.*, 2016).

Alguns dados da literatura sugerem a existência de outros biomarcadores que possam prever a RT1, como por exemplo o estudo de Chaitanya e colaboradores (2013), que indicou associação de baixos níveis de cortisol urinário e lesional com RT1. Além disso, observaram também que IP-10, IL-17F, IL-6 e TNF- α , podem ser potenciais marcadores sorológicos e de expressão gênica, para detecção precoce dessas reações na hanseníase (CHAITANYA *et al.*, 2013).

Faber e colaboradores (2004) avaliaram a expressão de citocinas e da monocina neopterin na RT1, em sangue periférico, durante o diagnóstico de RT1, no primeiro mês de tratamento, no segundo mês e ao final do tratamento. Observaram maior nível de neopterin sérica em pacientes com RT1, em comparação aos níveis no diagnóstico, sendo ainda observados níveis menores ao final do tratamento (FABER *et al.*, 2004).

Bochud e colaboradores (2008) observaram que um polimorfismo em TLR2 sugere susceptibilidade ao desenvolvimento de RT1 (BOCHUD *et al.*, 2008).

Sharma e colaboradores (2015), em estudo caso controle, observaram por meio de imuno-histoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR), que os pacientes dimorfos que desenvolveram RT1 expressavam mais intensamente CXCL10 e CXCR3 do que os controles (SHARMA *et al.*, 2015).

Khadge e colaboradores (2015) observaram, em um estudo coorte, por meio de estimulação de PBMC, maiores níveis de interferon- γ , IP-10, IL-17, VEGF, e diminuição da IL-10 na RT1 (KHADGE *et al.*, 2015).

3.6 Componentes do inflamassoma como biomarcadores candidatos

Os inflamassomas, descritos pela primeira vez em 2002, são complexos multiproteicos intracelulares, compostos por três elementos: um PRR, uma proteína ligadora puntiforme associada à apoptose com um domínio CARD – caspase activation and recruitment domains (ASC) e a enzima caspase-1 (MARTINON, BURNS.; TSCHOPP, 2002; SCHRODER; TSCHOPP, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; SÁ; FESTA NETO, 2016).

Os inflamassomas são constituintes do sistema imune inato, sendo responsáveis por regular a resposta imunológica a diversos estímulos, sejam eles exógenos, como agentes bacterianos, ou endógenos, como neoplasias, por meio da produção e secreção de citocinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A montagem e a ativação do inflamassoma têm início pelo reconhecimento de estímulos por receptores PRR que, então, interagem com a molécula adaptadora ASC. Segue-se a ligação da proteína ASC com a pró-caspase que é, então, clivada, ativando a caspase. A ativação da caspase culmina na clivagem das pró-IL-1 β e pró-IL-18, gerando suas formas ativas, IL-1 β e IL-18, respectivamente, que estimulam a resposta inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A ativação da caspase pela via do inflamassoma é ainda capaz de induzir a piroptose, um tipo de morte celular altamente inflamatória (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; SÁ; FESTA NETO, 2016; SHI *et al.*, 2016).

O inflamassoma é denominado de acordo com a nomenclatura do seu receptor intracelular. Duas classes de receptores já foram identificadas: a dos receptores do tipo NOD (NLR) e a dos receptores do tipo AIM2 (ALR). Pelo menos seis tipos de inflamassoma já foram descritos: NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NLRC4/IPAF e AIM-2. Os cinco primeiros são receptores NLR, enquanto o AIM-2 é um receptor ALR. A função normal do inflamassoma, com a síntese de IL-18 e, principalmente, de IL-1 β , é necessária para que o sistema imune inato aja de forma eficaz contra patógenos e contra outras doenças, inclusive alguns tipos de câncer. Quando sua atividade torna-se excessiva, podem ocorrer efeitos deletérios ao organismo. (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; BAUERNFEIND; HORNING, 2013; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; SÁ; FESTA NETO, 2016).

Desde sua descrição, distúrbios do inflamassoma têm sido implicados em diversas doenças, tornando-os um possível alvo para ação terapêutica (SCHRODER; TSCHOPP, 2010; SÁ; FESTA NETO, 2016).

O inflamassoma NLRP3 é o mais estudado e para que ocorra sua ativação pela via clássica, dois sinais são necessários:

- primeiro sinal: ativação do fator de transcrição NFκB via TLR;
- segundo sinal: fatores citoplasmáticos associados à presença de microorganismos e/ou dano de organelas celulares, como efluxo de potássio, aumento da concentração de cálcio ou dano mitocondrial.

Transcritos e ativados, os NLRP3 formam um complexo e ativam a caspase-1, que, por sua vez, ativa as citocinas pro-inflamatórias IL-1β e IL-18 (ZHONG; KINIO; SALEH, 2013; CHOI; RYTER, 2014; HE; HARA; NÚÑEZ, 2016; MENDES, 2017).

A caspase-1 é uma enzima da família de cisteína-aspartato proteases envolvida no processo inflamatório. Inicialmente denominada pro-caspase-1, é clivada quando ativada pelo inflamassoma, formando um complexo heterotetramérico que expressa uma potente atividade enzimática e tem como principais substratos a pró-IL-1β e a pró-IL-18. Além disso, a caspase-1 também é capaz de executar um programa de morte celular rápida, denominado piroptose, que é exercido pelos macrófagos, em resposta às bactérias intracelulares. Em oposição à apoptose, uma forma imunologicamente silenciosa de morte celular, a piroptose é uma forma altamente inflamatória e imunogênica de morte das células e é comumente observada durante a infecção por patógenos (JIMÉNEZ FERNANDÉZ; LAMKANFI, 2015; SHI *et al.*, 2016; MENDES, 2017).

A IL-1β é produzida na forma inativa, a pró-IL-1β, que é clivada pela caspase-1 na sua forma biologicamente ativa. A caspase-1 promove ainda a clivagem da pró-IL-18, que na sua forma biologicamente ativa, induz a imunidade mediada por células. Em resposta à IL-18, há uma intensa produção de IFN-γ pelos linfócitos T *helper*, os quais ativam macrófagos e outras células do sistema imune desenvolvendo um elo entre a imunidade inata e adaptativa (JIMÉNEZ FERNANDÉZ; LAMKANFI, 2015; MENDES, 2017).

Além da ativação pela via clássica, o inflamassoma NLRP3 pode ser ativado diretamente pela caspase inflamatória 11 em camundongos e 4/5 nos humanos. O mecanismo exato da ativação do inflamassoma NLRP3 via caspases-4/5 ainda não está bem definido, mas acredita-se que agentes microbiológicos, como LPS, podem

ativá-las, por ligação direta com domínios da própria caspase. Isso resulta na maturação e liberação de IL-1 β por processos citoplasmáticos dependentes de NLRP3 e de caspase-1 (JIMÉNEZ FERNANDÉZ; LAMKANFI, 2015; KAYAGAKI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2016; BROZ; DIXIT, 2016; MENDES, 2017).

A Figura 3 demonstra a ativação do complexo proteico inflamassoma NLRP3 através das vias clássica e alternativa.

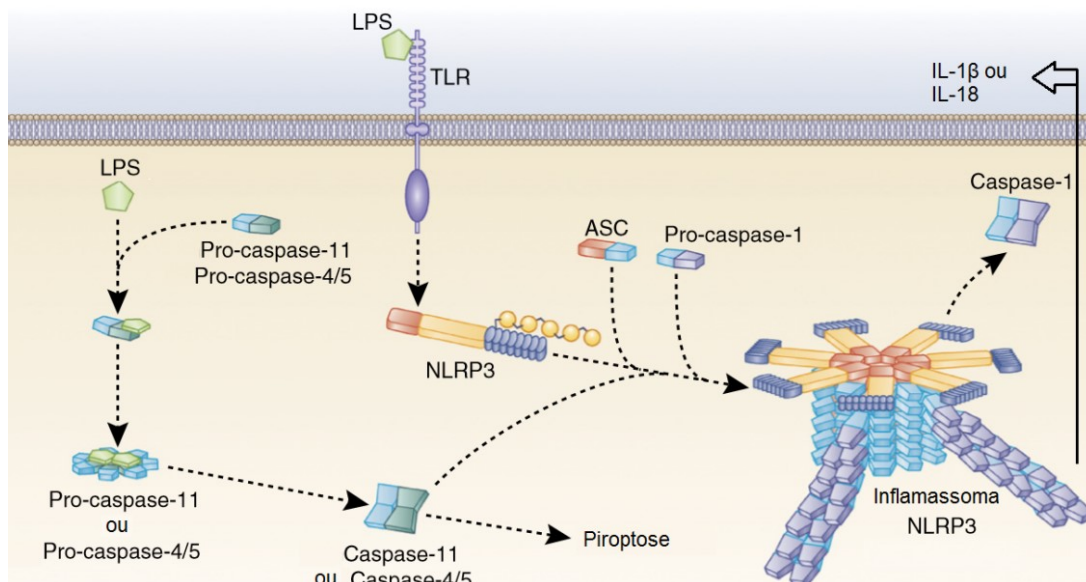


Figura 3 - Inflamassoma clássico e não clássico.

Legenda: LPS: lipopolissacarídeo; TLR: TOLL like receptor [receptor do tipo TOLL]; IL Interleucina; ASC: Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD [proteína puntiforme associada à apoptose com um domínio CARD]; NLRP3: NLR family pyrin domain 3 [família NLR com domínio de pirina 3].

Fonte: Guo, Callaway e Ting (2015) (modificada para fins didáticos).

O complexo proteico inflamassoma foi pouco estudado na hanseníase, mas alguns estudos já evidenciam sua participação na doença, abordando polimorfismos genéticos nos genes NLRP1 e NLRP3. Pontillo e colaboradores (2013) observaram a combinação dos halótipos rs2137722, G-rs12150220 e T-rs2670660, no gene NLRP1, mais frequentes em pacientes com hanseníase paucibacilar em relação à multibacilar. Já o trabalho de Zhang e colaboradores (2015) evidenciou associação entre o polimorfismo rs35829419, no gene NLRP3, em várias doenças inflamatórias humanas, dentre elas a hanseníase (PONTILLO *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015).

Gigliotti (2014) observou que macrófagos expressando marcadores de ativação (CD40 e ICAM), em indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase virchowiana, secretavam altos níveis de TNF e baixos níveis de IL-1 β , apesar de

expressarem TLR1 e TLR2 e induzirem o gene IL-1 β . Esses achados sugerem que o *M. leprae* é reconhecido por um PRR, mas que, posteriormente, pode inibir a via de sinalização, que levaria à secreção de IL-1 β , como, por exemplo, o inflamassoma (GIGLIOTTI, 2014).

Assadi e colaboradores (2016) observaram polimorfismos no gene LACC1, codificador da proteína FAMIN, com funções metabólicas como oxidação de ácidos graxos, ativação do inflamassoma e produção de espécies reativas de oxigênio. Os polimorfismos no gene LACC1 foram associados à susceptibilidade a doenças inflamatórias intestinais, hanseníase e artrite idiopática juvenil. Esses achados sugerem que se polimorfismos no gene codificador de FAMIN podem inibir a via do inflamassoma e aumentar a susceptibilidade à hanseníase, o inflamassoma parece ter importante participação na resposta imune do hospedeiro contra a doença (ASSADI *et al.*, 2016).

Yoon e colaboradores (2016) também demonstraram a possível participação do inflamassoma em hanseníase, através da inoculação do *M. leprae* em patas de camundongos e posterior avaliação da expressão de IL-1 β , caspase-1 e antagonistas de receptores de IL-1. Esses biomarcadores foram avaliados através de amostras de sangue periférico e imuno-histoquímica de baço, fígado e pulmão, antes da instituição do tratamento com clofazimina e, em seguida, após duas e oito semanas do início da medicação. Com oito semanas de tratamento, observou-se, nas células hepáticas, menor expressão de IL-1 β e caspase 1, associada a aumento da expressão do antagonista do receptor de IL-1, por pelo menos três vezes no tecido, e, aumento dos níveis séricos 21 vezes (YOON *et al.*, 2016).

A fraca expressão de caspase-1 e IL-1 β também foi demonstrada por Kang e colaboradores (2010), em macrófagos de camundongos A/J, com diferenças de aminoácidos em Naip5 (proteína que inibe a apoptose) e em uma das proteínas adaptadoras de caspase-1. Neste estudo, foram comparadas as respostas imunes de macrófagos de camundongos A/J com a de macrófagos de camundongos C57BL/6, contra infecção por *M. leprae*. A infecção induziu níveis elevados de TNF- α , ativação de NF-kB, ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 β em ambos os tipos de macrófagos. Contudo, os macrófagos dos camundongos A/J, exibiram menor ativação da caspase-1 e menor secreção de IL-1 β em comparação aos macrófagos C57BL/6 (KANG *et al.*, 2010).

Sinsimer e colaboradores (2010) observaram que monócitos *naive* estimulados com *M. leprae* suprimiram a produção de IL-6, reduziram a ativação do NF-kB e retardaram a conversão de IL-1 e caspase-1, quando comparados com monócitos estimulados com *M. Bovis* (SINSIMER *et al.*, 2010).

Ma e colaboradores (2017) demonstraram, através de citometria de fluxo, que, embora macrófagos em autofagia possam promover a depuração do *M. leprae*, eles expressam preferencialmente baixos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α e altos níveis de IL-10, o que contribuiu para inibição de novos processos autofágicos, promovendo a persistência da micobactéria (MA *et al.*, 2017).

Recentemente, Mendes (2017) observou, por meio de imuno-histoquímica de pele em pacientes com hanseníase, hiperexpressão dos biomarcadores NLRP3 e caspases-4/5 no pólo virchowiano da doença, o que sugere ativação do inflamassoma NLRP3, pela via não-canônica, nesses casos (MENDES, 2017).

Essas evidências da participação do inflamassoma na hanseníase levam a pensar que a ativação desse complexo possa estar também relacionada aos processos reacionais da doença, o que justifica a pesquisa de biomarcadores do inflamassoma como preditores da RT1.

3.6.1 Inflamassoma e reação hansênica tipo 1

Por meio de busca pelas bases de dados MEDLINE e LILACS, utilizando-se os termos “leprosy type 1 reaction” and “inflammasome”, “reversal reaction” and “inflammasome”; “leprosy type 1 reaction” and “NLRP3”, “reversal reaction” and “NLRP3”, “leprosy type 1 reaction” and “caspase”, “reversal reaction” and “caspase”, “leprosy type 1 reaction” and “pyroptosis” e “reversal reaction” and “pyroptosis”, não foram encontrados artigos relacionados à RT1 e inflamassoma, o que indica lacuna na literatura quanto à participação do inflamassoma nessa condição clínica.

Contudo, o estudo de Pontillo e colaboradores (2013), encontrado por meio da busca “leprosy” and “inflammasome” na base de dados MEDLINE, evidenciou a combinação de halótipos no gene NLRP1, mais frequentes nos pacientes paucibacilares em relação aos multibacilares, sugerindo que o inflamassoma NLRP1 possa estar envolvido no reconhecimento de *M. leprae* ou na subsequente ativação inflamatória (PONTILLO *et al.*, 2013).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a possível associação entre a expressão de biomarcadores do inflamassoma e a ocorrência de RT1.

4.2 Objetivos específicos

1. Avaliar semiquantitativamente e qualitativamente o padrão imuno-histoquímico de expressão dos biomarcadores da via clássica do inflamassoma (NLRP3, caspase 1 e IL-1 β) em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase.
2. Avaliar semiquantitativamente e qualitativamente o padrão imuno-histoquímico de expressão dos biomarcadores da via alternativa do inflamassoma (caspase-4/5) em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase.
3. Avaliar semiquantitativamente e qualitativamente o padrão imuno-histoquímico de expressão da IL-6 em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase.
4. Comparar o padrão imuno-histoquímico de expressão de biomarcadores da via clássica do inflamassoma (NLRP3, caspase 1 e IL-1 β) em pacientes com hanseníase, com e sem RT1.
5. Comparar o padrão imuno-histoquímico de expressão de biomarcadores da via alternativa do inflamassoma (caspase-4/5) em pacientes com hanseníase, com e sem RT1.
6. Comparar o padrão imuno-histoquímico de expressão da IL-6 em pacientes com hanseníase, com e sem RT1.

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Considerações éticas

Este estudo seguiu as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos da Resolução nº 466/2012. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, sob o número de registro pelo Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) - 14887414.0.0000.5149 (ANEXO B - Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG) (BRASIL, 2013).

O COEP autorizou a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido com a justificativa de que os pacientes que tiveram suas biópsias realizadas não seriam novamente recrutados (ANEXO C - Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG).

5.2 Participantes do estudo

Foi realizada avaliação de prontuários para seleção dos participantes do estudo no período entre 2012 e 2015. Dos 230 prontuários avaliados, foram selecionados para participar do estudo, por meio dos critérios de inclusão e exclusão pré-definidos, 23 indivíduos adultos com diagnóstico de hanseníase, durante o primeiro ano de tratamento e acompanhamento clínico no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes, da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), em Belo Horizonte, Minas Gerais. Foram considerados casos os participantes que desenvolveram RT1 nesse período de acompanhamento, e, controles, aqueles que não as desenvolveram.

A RT1 foi definida pela presença de um critério maior ou dois critérios menores, conforme descritos na Tabela 1 (NAAFS, 2003).

Tabela 1 - Critérios para definição de reação hansênica tipo 1.

Maior	Exacerbação de lesões preexistentes ou surgimento de novas lesões
Menor	Um ou mais nervos espessados Novas lesões indolores Edema súbito de face e/ou extremidades Recente perda de sensibilidade em mãos ou pés ou em local referente à determinada inervação por determinado nervo

Fonte: Naafs (2003).

5.2.1 Critérios de seleção

1. Pacientes com diagnóstico de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG no período entre 2012 e 2015;
2. pacientes com diagnóstico de hanseníase no primeiro ano de tratamento;
3. pacientes com suspeita clínica de hanseníase submetidos a biópsia lesional, e confirmação diagnóstica por meio do exame histopatológico compatível com a doença.

5.2.2 Critérios de inclusão

1. Pacientes com diagnóstico de hanseníase e registros médicos (prontuários) da ocorrência ou não de RT1 no primeiro ano de tratamento;
2. biópsia (bloco de parafina) disponibilizada pelos laboratórios de anatomia patológica terceirizados.

5.2.3 Critérios de exclusão

1. Idade inferior a 18 ou superior a 65 anos;
2. recidiva ou abandono de tratamento anterior;
3. pacientes indeterminados, tuberculoides e virchowianos;
4. imunossupressão conhecida;
5. gestantes;
6. doenças infectoparasitárias conhecidas;
7. amostras de pele inferiores a dois milímetros;
8. amostras de pele com artefatos por processamentos histológicos.

5.3 Delineamento do estudo e cenário da pesquisa

Estudo observacional, transversal e comparativo da expressão de biomarcadores do inflamassoma, em pacientes com hanseníase que apresentaram RT1 (casos) e em pacientes com hanseníase, mas que não desenvolveram RT1 (controles) por meio da técnica imuno-histoquímica realizada em amostras de pele armazenadas em blocos de parafina. Os pacientes considerados casos e controles

receberam o diagnóstico de hanseníase no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015. O primeiro ano de acompanhamento e tratamento da hanseníase foi analisado por meio da revisão dos prontuários Protocolo do estudo.

Após a seleção de pacientes, foram solicitados os blocos de parafina pertencentes aos mesmos e, posteriormente, cedidos pelos laboratórios CEAP, Cytogenesis, Lupa, Analys, Tafuri, Cito-Diagnóstico e Instituto Moacyr Junqueira, onde cada material biológico, correspondente à biópsia realizada sobre a lesão sugestiva de hanseníase, no momento do diagnóstico, foi processado. Logo após o corte dos blocos de parafina e montagem das lâminas, os mesmos foram devolvidos aos respectivos laboratórios de origem.

As lâminas preparadas por meio da coloração de hematoxilina-eosina (HE) foram avaliadas pelo patologista do estudo, para confirmação da classificação histopatológica da hanseníase, de acordo com os critérios de Ridley e Jopling. Outras lâminas foram confeccionadas para avaliação dos biomarcadores com a utilização da técnica imuno-histoquímica. Para a confiabilidade dos resultados, foi realizada análise cega para as condições clínicas dos participantes, por três observadores independentes (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Foram ainda processados cinco blocos, com material biológico (pele), para fins de controle externo da reação imuno-histoquímica (pele basal). A partir desses blocos, também foram confeccionadas lâminas, para realização da técnica de imuno-histoquímica, que foram examinadas por três observadores independentes. Os controles saudáveis (pele basal) consistem em cinco materiais biológicos (pele) excisados em mamoplastias e doados para o estudo, pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFMG.

O fluxograma está representado na Figura 4.

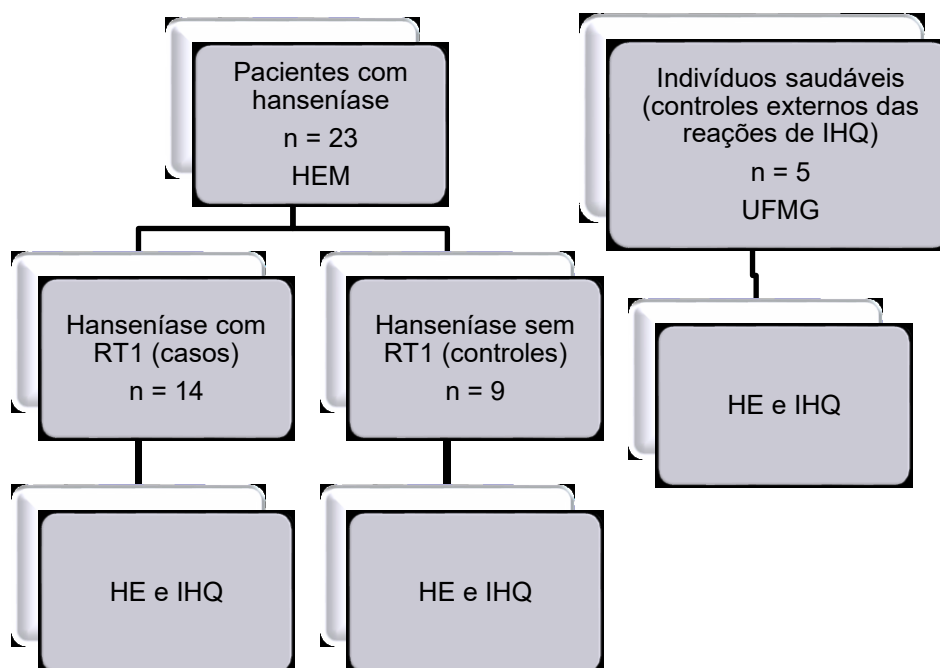


Figura 4 - Fluxograma do estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina de Minas Gerais com dados referentes ao período entre 2012 e 2016.

Legenda: HEM (Hospital Eduardo de Menezes); IHQ (imuno-histoquímica); UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais); RT1 (Reações hansênicas tipo 1); HE (Hematoxilina-eosina); IHQ (imuno-histoquímica).

5.3.1 Coloração com hematoxilina-eosina

Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina. Com essa coloração, os núcleos se coram em azul (têm afinidade pelo corante básico hematoxilina, portanto são basofílicos), enquanto colágeno, fibras musculares e fibras nervosas se coram em vermelho ou rosado (têm afinidade pelo corante ácido eosina, portanto são eosinofílicos).

Segundo os critérios de Ridley e Jopling (1966) para classificação de hanseníase, que inclui a descrição das características histopatológicas de cada forma clínica da doença, as lâminas foram avaliadas e reclassificadas pelo patologista responsável do estudo (RIDLEY; JOPLING, 1966).

5.3.2 Técnica de imuno-histoquímica

Lâminas com cortes parafinados de 5 µm de culturas organotípicas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool.

A recuperação da antigenicidade foi feita pelo aquecimento a 90°C no vapor por 20 minutos em solução tampão, 10 mM Trisácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), com potencial hidrogeniônico (pH) 9,0 e em solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0). A coloração para imuno-histoquímica foi feita com os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio da peroxidase (PBS) (Quadro 2). A peroxidase endógena foi bloqueada pela PBS do NOVOLINK e as lâminas lavadas em solução tampão duas a três vezes, sendo então adicionados 100 µl do anticorpo primário, na diluição informada no Quadro 3, por 60 minutos, em temperatura ambiente em câmara úmida. Os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpos secundários presentes na sonda NOVOLINK, de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, os cortes histológicos foram cobertos com 200 µl de solução reveladora, contendo diaminobenzidina (DAB), Dako, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem, os cortes foram embebidos rapidamente em Hematoxilina de Harris, para contra-coloração, e avaliados por microscopia óptica.

Quadro 2 - Dados sobre as diluições dos anticorpos primários em diaminobenzidina.

Anticorpo primário	Marcação	Diluição	Fabricante
Anti-caspase-1	Caspase-1	1:500	Santa Cruz
Anti-caspase-11	Caspases-4/5	1:300	Santa Cruz
Anti-IL-1β	IL-β	1:500	Santa Cruz
Anti-IL-6	IL-6	1:600	Santa Cruz
Anti-NLRP3	NLRP3	1:500	Santa Cruz

Legenda: IL (Interleucina); NLRP3 (*NLR family pyrin domain 3* [família NLR com domínio de pirina 3]).
Fonte: Fabricante (Santa Cruz).

A avaliação imuno-histoquímica foi realizada por três observadores (Professor Marcelo Antônio Pascoa Xavier, Professora Paula Vieira Teixeira Vidigal e Dra. Ana Luísa Gomes Mendes), independentes e cegos para as condições clínicas dos participantes, sendo a avaliação padrão-ouro realizada pelo patologista responsável do estudo. As diferenças encontradas foram solucionadas por consenso entre os observadores.

A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio Nikon Eclipse 50.I. Foi utilizado aumento de 10 vezes para avaliar as áreas de marcação e de 40 vezes para determinar a semi-quantificação da intensidade e do percentual de marcação das células. A observação de campos aconteceu de forma aleatória pelos observadores.

Para controle e monitoramento da qualidade das reações imuno-histoquímicas, foram utilizados controles externo e interno (intralâmina). O controle externo utilizou cinco amostras de peles saudáveis, doadas pelo serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas de Minas Gerais, provenientes de mamoplastia (pele basal). O controle interno utilizou o próprio compartimento epitelial das amostras, conforme orientações dos fabricantes dos anticorpos primários.

Para as análises semi-quantitativas, foram classificadas, para cada anticorpo primário ou biomarcador, a intensidade e o percentual da imunorreatividade celular da marcação imuno-histoquímica do epitélio e do infiltrado inflamatório, de acordo com a seguinte escala, modificada a partir do trabalho de Lockwood e colaboradores (2011), conforme demonstrado no Quadro 3 (LOCKWOOD *et al.*, 2011):

Quadro 3 - Escala para análise semi-quantitativa da reatividade imuno-histoquímica

Intensidade		Percentual	
0	ausente	0	ausente
1	leve ou uma cruz (+)	1	1-25%
2	moderada ou duas cruzes (++)	2	25-50%
3	intensa ou três cruzes (+++)	3	50-75%
		4	75-100%

Legenda: % percentual.

Fonte: Modificado de Locwood *et al.* (2011).

Em seguida foi estabelecido um escore da expressão imuno-histoquímica, de acordo com Takano e colaboradores (2016). Foram categorizadas, para cada anticorpo primário ou biomarcador, a multiplicação dos parâmetros intensidade e percentual da imunorreatividade celular da marcação imuno-histoquímica do epitélio e infiltrado inflamatório em “expressão elevada” (1) ou “expressão baixa” (0). De acordo com esses critérios, descritos no Quadro 4, produto maior ou igual a 4 (destaque vermelho) foi considerado “expressão elevada” e produto menor ou igual a 3 (destaque azul) foi considerado “expressão baixa” (TAKANO *et al.*, 2016).

Quadro 4 - Parâmetros para análise semiquantitativa da imuno-histoquímica

Intensidade	Percentual				
	0	1	2	3	4
0	0	0	0	0	0
1	0	1	2	3	4
2	0	2	4	6	8
3	0	3	6	9	12

Fonte: Takano *et al.* (2016).

5.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas realizadas serão descritas separadamente em cálculo amostral, variáveis analisadas e caracterização da amostra.

5.4.1 Cálculo amostral

A partir de revisão prévia de prontuários entre janeiro de 2014 e janeiro de 2015, utilizando-se os critérios de exclusão definidos nesse estudo, observou-se que a população do Serviço de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes foi composta por 57 casos novos de hanseníase no período. A partir desse dado e considerando essa população descrita, para um nível de confiança de 95%, frequência de RT1 de 20% (TEIXEIRA *et al.*, 2010) e margem de erro de 12%, estimou-se uma amostra de 25 pacientes para este estudo. O cálculo foi realizado utilizando o programa “Open Epi”, versão 3.01 (OPEN EPI, 2006).

A fórmula utilizada no cálculo amostral foi $n = [EPA * Np(1-p)] / [(d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p)]$, onde n = tamanho da amostra, EPA = efeito do plano amostral (considerou-se 1), N = tamanho da população (aproximadamente 57 casos novos de hanseníase em um ano, considerando critérios de inclusão e exclusão deste estudo), p = proporção estimada do evento de interesse (prevalência de reação = 20%), d = precisão ou margem erro (12%), $Z_{1-\alpha/2}$ = percentil da distribuição normal para o nível de confiança considerado (nível de confiança de 95% - $\alpha = 5\%$ - $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$).

5.4.2 Variáveis analisadas dos grupos casos, controles e controles saudáveis/pele basal

As variáveis analisadas no estudo, bem como suas classificações e categorizações, estão apresentadas no Quadro 5. No grupo indivíduos saudáveis (pele basal), foram analisadas apenas as variáveis referentes aos biomarcadores.

Quadro 5 - Variáveis analisadas no estudo, sua classificação e categorias utilizadas

Variáveis clínicas	Classificação	Categorização
Grupo	Categórica nominal	0. Controle (sem RT1) 1. Caso (com RT1)
Classificação operacional	Categórica nominal	0. PB 1. MB
RT1: exacerbação	Categórica nominal	0. Não 1. Sim
RT1: neurite	Categórica nominal	0. Não 1. Sim
Número de RT1 exacerbação	Categórica ordinal	0, 1, 2
Número de RT1 neurite	Categórica ordinal	0, 1, 2
Grau de incapacidade no diagnóstico	Categórica ordinal	0, 1, 2
Grau de incapacidade na cura	Categórica ordinal	0, 1, 2
Classificação de Ridley e Jopling	Categórica nominal	0. DD 1. DT 2. DV 3. TT
Índice baciloscópico	Numérica contínua	0; 1; 2; 3; 4; 5; 6
Contato conhecido de hanseníase	Categórica nominal	0. Não 1. Sim
Sociodemográficas	Idade	Numérica contínua Em anos
	Sexo	Categórica nominal 0. Feminino 1. Masculino
Imunorreatividade intensidade/ Imunorreatividade percentual	Categórica ordinal	0, 1, 2 e 3

Legenda: RT1 (reação tipo 1); PB (paucibacilar); MB (multibacilar); DD (dimorfa dimorfa); DT (dimorfa tuberculoide); DV (dimorfa virchowiana); TT (tuberculoide); Epi (epiderme); % (percentual).

Fonte: quadro elaborado pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2012 e 2016.

5.4.3 Comparação dos biomarcadores entre casos e controles

A comparação dos biomarcadores entre os grupos foi realizada por meio de análise univariada e multivariada.

5.4.4 Caracterização da amostra

Inicialmente, foi feita análise descritiva de todas as variáveis investigadas, por meio de tabelas de distribuição de frequências e medidas de tendência central e variabilidade. Em seguida, os dados foram comparados entre casos e controles. Nessa comparação, para as variáveis categóricas, foram realizados os testes qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher. Na comparação para a variável numérica (idade) foi utilizado o teste t de Student, já que essa variável apresentava distribuição normal. Para testar a normalidade, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov (APÊNDICE A - Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov).

5.4.4.1 Análise univariada

Para comparação dos resultados dos biomarcadores entre casos e controles foi realizado o teste qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher (na presença de dados com baixas frequências). Essa análise foi realizada considerando os valores de 0 a 3, e em seguida, os valores 0 e 1, e 2 e 3, foram agrupados gerando apenas duas categorias. Nessa segunda análise, foram estimados ainda os valores da razão de chances ou Odds Ratio (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

5.4.4.2 Análise multivariada

Para controlar possíveis fatores de confusão na investigação da associação entre os grupos de estudo (casos e controles) e os resultados dos biomarcadores, foi utilizado o modelo de regressão logística binária.

Nessa análise, a variável resposta foi o grupo (casos *versus* controles) e as demais variáveis do estudo foram consideradas possíveis variáveis explicativas. Para seleção das variáveis explicativas candidatas a entrarem no modelo multivariado, foi considerado um valor-p menor que 0,20 na análise univariada. Utilizou-se o critério *backward* para retirada das variáveis no modelo, e, para permanência das variáveis no modelo final, foi adotado um nível de 5% de significância.

Após ajustes do modelo final, foi avaliada a estimativa da OR, ajustada com respectivo intervalo de confiança de 95% (IC95%). O ajuste do modelo foi avaliado por meio da estatística de Hosmer & Lemeshow.

Em todas as análises foi considerado um nível de significância de 5% e utilizado o *software* estatístico SPSS, versão 19.0.

6 RESULTADOS

Para melhor demonstração e compreensão dos resultados, os mesmos foram subdivididos em dois subtítulos: características demográficas, epidemiológicas e clínicas e comparação dos biomarcadores entre casos e controles.

6.1 Características demográficas, epidemiológicas e clínicas

As principais características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos participantes do estudo foram sintetizadas em gráficos e tabelas e são apresentadas a partir do número de amostras nos grupos casos e controles (Figura 5).

Dentre os 23 pacientes com hanseníase, 14 foram classificados como casos (61%), isto é, apresentaram RT1 (exacerbações de lesões e/ou neurite) e nove foram classificados como controles (39%).

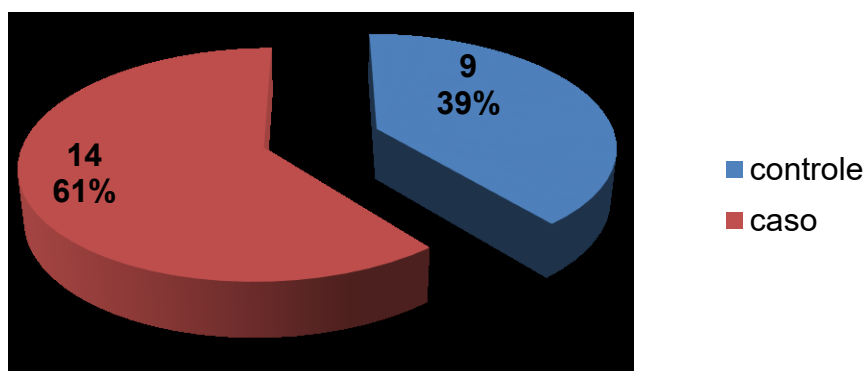


Figura 5- Representação dos setores da distribuição dos pacientes por grupo de estudo.

O Quadro 6 apresenta a descrição das características da RT1 nos participantes do grupo caso. Dentre esses, 14,3% tiveram exacerbações de lesões, 57,1% tiveram neurite e 28,6% apresentaram ambas manifestações. Dentre aqueles que tiveram exacerbações de lesões, 66,7% tiveram um episódio no primeiro ano de tratamento de hanseníase. Já entre os casos com neurite, 58,3% tiveram uma neurite.

Quadro 6 - Descrição das características da reação tipo 1 entre os casos (n = 14)

Reação tipo 1	N	Frequência
Apenas exacerbação	2	14,3
Apenas neurite	8	57,1
Exacerbação e neurite	4	28,6
Número de exacerbações		
1	4	66,7
2	2	33,3
Número de neurites		
1	7	58,3
2	5	41,7

Fonte: Quadro elaborado pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2012 e 2015.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, dos 23 pacientes avaliados, a maioria era do sexo masculino (52,2%), com média de idade de 47,5 anos ($\pm 10,8$). Quando se analisa separadamente os grupos, observa-se 66,7% de mulheres entre os controles contra 35,7% entre os casos. Já a média de idade foi de 45,4 anos entre os controles e quase 49 anos entre os casos. No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 2 - Caracterização das variáveis sociodemográficas na amostra total e por grupo (n = 27).

Variáveis	Amostra total (n = 23)	Controles (n = 9)	Casos (n = 14)	Valor-p
Sexo - n (%)				
Feminino	11 (47,8)	6 (66,7)	5 (35,7)	0,214*
Masculino	12 (52,2)	3 (33,3)	9 (64,3)	
Idade				
Média \pm desvio-padrão	47,5 \pm 10,8	45,4 \pm 9,4	48,8 \pm 11,7	0,480**

*Teste exato de Fisher**Teste t-Student.

Fonte: Tabela elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina de Minas Gerais, entre os anos de 2012 e 2015.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, na amostra total de pacientes analisados, a maior parte (47,8%) teve forma clínica dimorfa dimorfa, 87,0% tiveram classificação operacional como multibacilar, 60,9% tiveram grau de

incapacidade zero no diagnóstico e na cura. Dos pacientes 43,5% tiveram baciloscopia positiva e 39,1% tiveram contato com hanseníase antes do diagnóstico.

Apenas a classificação operacional mostrou diferença significativa entre casos e controles ($p < 0,05$), sendo a forma PB mais frequente entre os controles.

Tabela 3 - Caracterização das variáveis clínicas na amostra total e por grupo (n = 23)

Variáveis	Amostra total (n = 23)		Controles (n = 9)		Casos (n = 14)		Valor-p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
Forma clínica							
DD	11	47,8	3	33,3	8	57,1	0,576*
DT	10	43,5	5	55,6	5	35,7	
DV	2	8,7	1	11,1	1	7,1	
Classificação operacional							
PB	3	13,0	3	33,3	0	0	0,047*
MB	21	87,0	6	66,7	14	100	
Grau de incapacidade: diagnóstico							
0	14	60,9	8	88,9	6	42,9	0,114*
1	4	17,4	0	0,0	4	28,6	
2	5	21,7	1	11,1	4	28,6	
Grau de incapacidade: cura							
0	14	60,9	8	88,9	6	42,9	0,134*
1	3	13,0	0	0,0	3	21,4	
2	6	26,1	1	11,1	5	35,7	
Baciloscopia							
Negativo	13	56,5	6	66,7	7	50,0	0,669*
Positivo	10	43,5	3	33,3	7	50,0	
Contato conhecido de hanseníase							
Não	14	60,9	5	55,6	9	64,3	0,999*
Sim	9	39,1	4	44,4	5	35,7	

*Teste exato de Fisher.

DD (dimorfa dimorfa); DT (dimorfa tuberculoide); DV (dimorfa virchowiana); TT (tuberculoide); PB (paucibacilar); MB (multibacilar).

Fonte: Tabela elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina de Minas Gerais, entre os anos de 2012 e 2015.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, dos 23 pacientes avaliados, a maioria apresentava índice baciloscópico 0 (56,5%), com média 0,89 ($\pm 1,25$). Quando se analisam os grupos separadamente, observam-se 66,7%

com índice baciloscópico 0 entre os controles, contra 50% entre os casos. A média de índice baciloscópico foi de 0,64 entre os controles e 1,05 entre os casos, diferença sem significado estatístico.

Tabela 4 - Comparação do Índice Baciloscópico entre casos e controles.

IB	Amostra total (n = 27)		Controles (n = 13)		Casos (n = 14)		Valor-p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
0,00	13	56,5	6	66,7	7	50,0	0,999**
1,00	3	13,0	2	22,2	1	7,1	
1,25	1	4,3	0	0	1	7,1	
1,50	1	4,3	0	0	1	7,1	
2,00	1	4,3	0	0	1	7,1	
2,50	1	4,3	0	0	1	7,1	
2,75	1	4,3	0	0	1	7,1	
3,75	2	8,7	1	11,1	1	7,1	
Média ± desvio-padrão	0,89 ± 1,25		0,64 ± 1,24		1,05 ± 1,27		
Mediana (P25 - P75)	0,00 (0,00 - 1,50)		0,00 (0,00 - 1,00)		0,50 (0,00 - 2,12)		

Teste exato de Fisher;*Teste Mann-Whitney P25 = percentil 25P75 = percentil 75.

Fonte: tabela elaborada pelo autor, com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos de 2012 e 2015.

6.2 Comparação dos biomarcadores entre casos e controles

Para comparação dos biomarcadores entre os grupos foram realizadas análises univariada e multivariada.

6.2.1 Análise univariada

Os resultados da intensidade da imunorreatividade dos biomarcadores NLRP3, caspase-1, caspases-4/5, IL-1 β e IL-6, no epitélio e no infiltrado inflamatório das amostras dos grupos casos e controles, estão apresentados na Figura 6 e tabelas subsequentes.

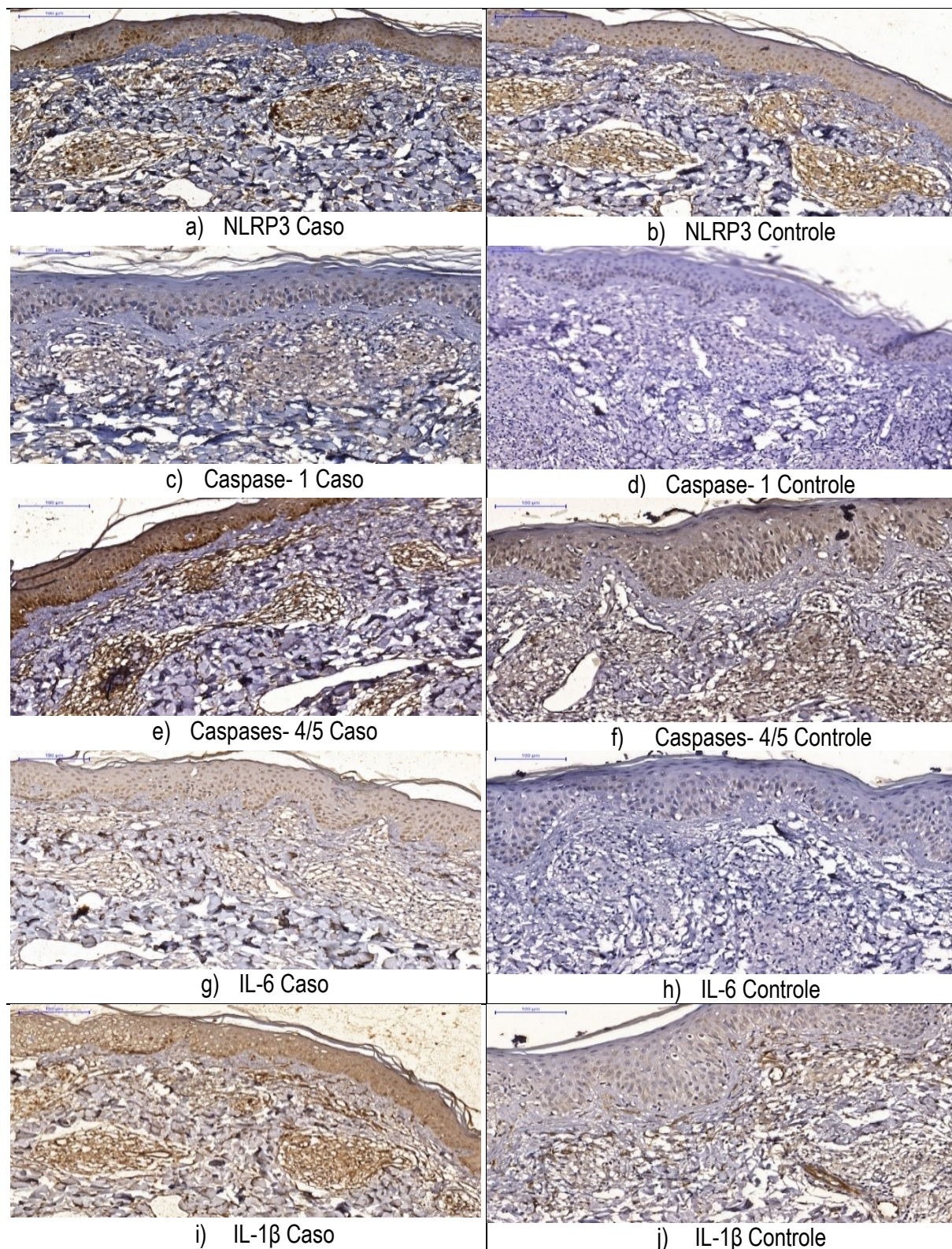


Figura 6 - Imunorreatividade dos biomarcadores NLRP3, caspase-1, caspases-4/5, IL-1 β e IL-6 no epitélio e no infiltrado inflamatório das amostras dos grupos casos (imagens à esquerda) e controles (imagens à direita).

Legenda: a) NLRP3 no grupo caso; b) NLRP3 no grupo controle; c) caspase-1 no grupo caso; d) caspase-1 no grupo controle; e) caspases-4/5 no grupo casos; f) caspases-4/5 no grupo controle; g) IL-6 no grupo caso; h) IL-6 no grupo controle; i) IL-1 β no grupo caso; j) IL-1 β no grupo controle.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados da intensidade da imunorreatividade dos biomarcadores NLRP3, caspase-1, caspase-4/5, IL-1 β e IL-6 na avaliação da derme.

Tabela 5 - Comparação entre casos e controles dos resultados de intensidade da imunorreatividade dos biomarcadores na derme, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23)

Biomarcadores	Amostra total (n = 23)		Controles (n = 9)		Casos (n = 14)		Valor-p
	n	%	n	%	n	%	
Derme int NLRP3							
0	10	43,5	4	44,4	6	42,9	0,025**
1	4	17,4	4	44,4	0	0	
2	3	13,0	0	0	3	21,4	
3	6	26,1	1	11,1	5	35,7	
Derme int caspase-1							
0	10	45,5	3	37,5	7	50,0	0,187**
1	9	40,9	5	62,5	4	28,6	
2	3	13,6	0	0	3	21,4	
Derme int caspase-4/5							
0	14	60,9	6	66,7	8	57,1	0,999**
1	7	30,4	3	33,3	4	28,6	
2	1	4,3	0	0	1	7,1	
3	1	4,3	0	0	1	7,1	
Derme int IL-1 β							
0	19	82,6	6	66,7	13	92,9	0,260**
1	4	17,4	3	33,3	1	7,1	
Derme int IL-6							
0	8	34,8	3	33,3	5	35,7	0,999**
1	10	43,5	4	44,4	6	42,9	
2	5	21,7	2	22,2	3	21,4	

*Teste qui-quadrado de Pearson**Teste exato de Fisher.
int (intensidade).

De acordo com os resultados da tabela 5, houve diferença significativa entre casos e controles quanto à intensidade de NLRP3, com valores mais elevados entre os casos. O resultado 1 ocorreu em 44,4% dos controles e em nenhum dos casos; o resultado 2 não foi observado entre os controles e em 21,4% dos casos e o score 3 esteve presente em 11,1% dos controles e 35,7% dos casos.

Nas Figuras 7 a 11 foram apresentados os resultados do percentual da imunorreatividade dos biomarcadores NLRP3, caspase-1, caspase-4/5, IL-1 β e IL-6 entre casos e controles nas avaliações da derme e epiderme.

Para nenhum dos biomarcadores observou-se diferença entre casos e controles no que se refere ao percentual de imunorreatividade.

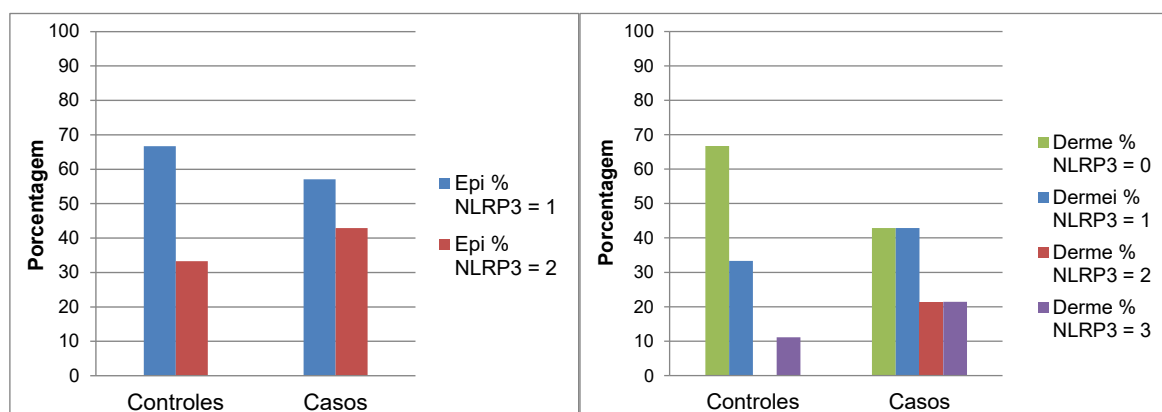


Figura 7 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador NLRP3 na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

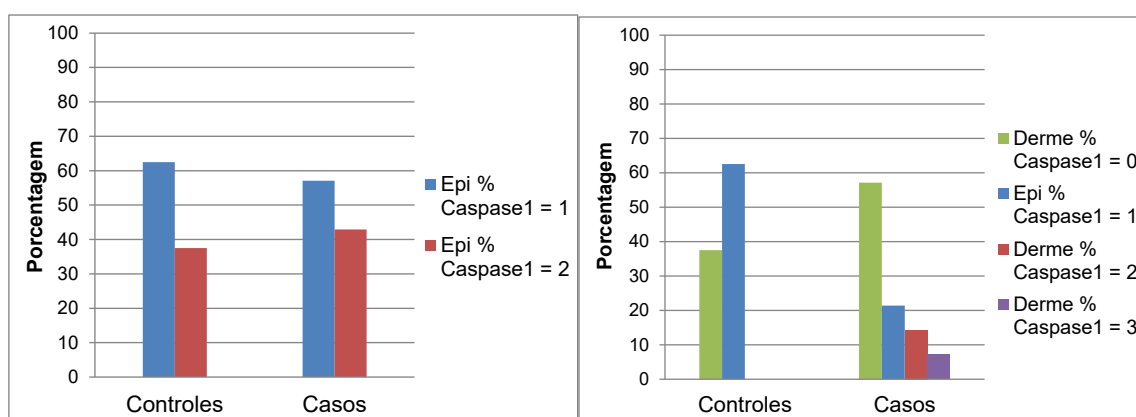


Figura 8 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador caspase-1 na epiderme e derme entre casos e controles segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

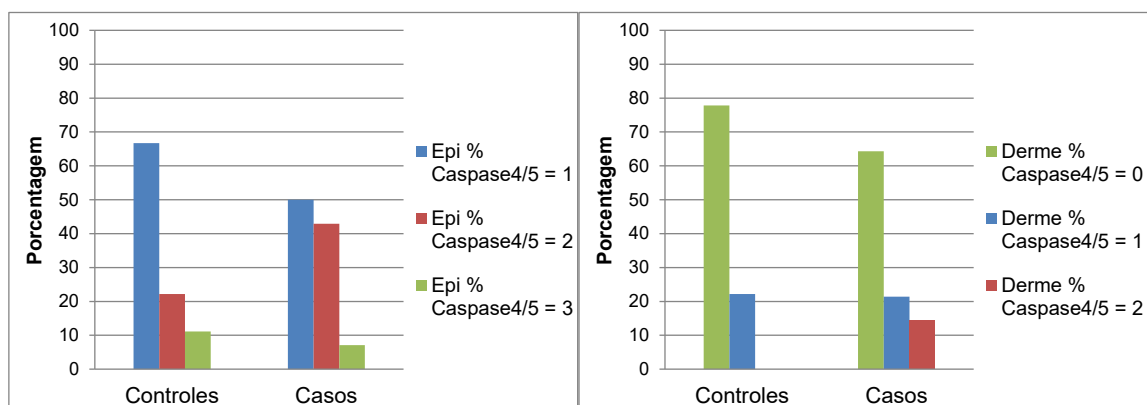


Figura 9- Percentual da imunorreatividade do biomarcador Caspase-4/5 na epiderme e derme entre casos e controles segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

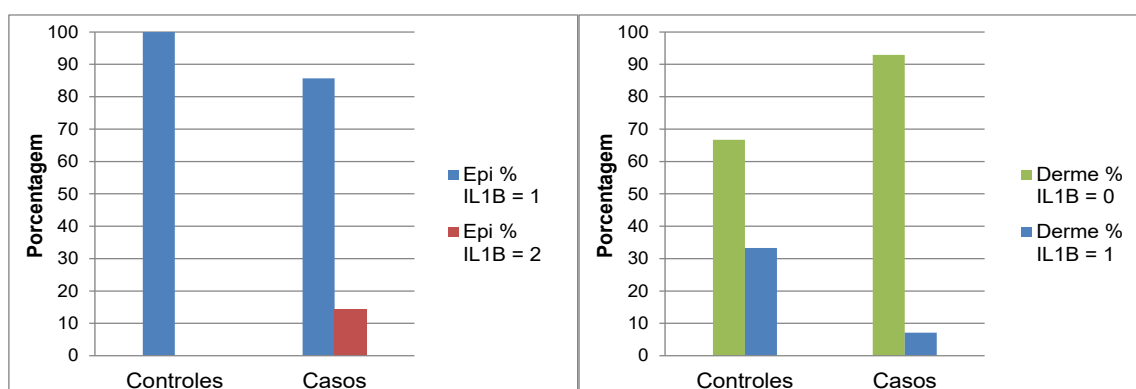


Figura 10 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL-1β na epiderme e derme entre casos e controles segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

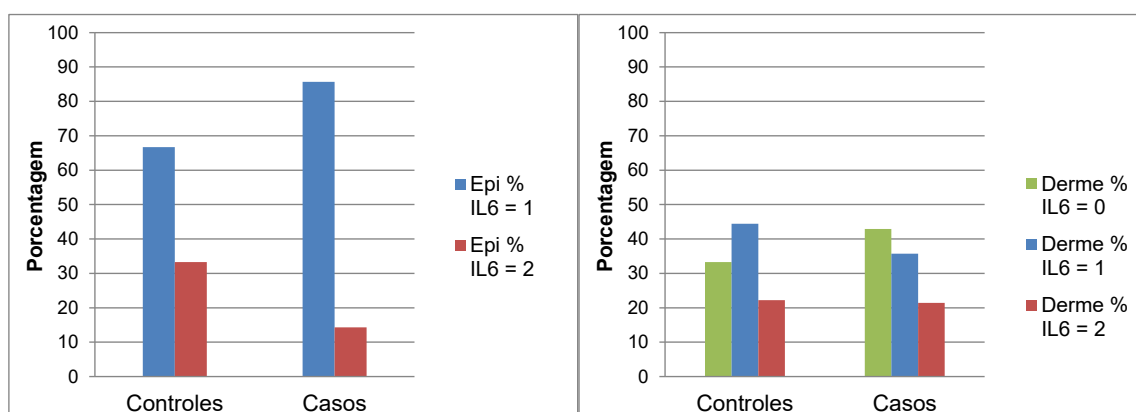


Figura 11 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL-6 na epiderme e derme entre casos e controles segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

Considerando a sua baixa frequência, os resultados dos biomarcadores foram agrupados em apenas duas categorias: 0 e 1 *versus* 2 e 3 (Tabelas 6 e 7). Mesmo após a recategorização, não houve diferença entre casos e controles para nenhum dos biomarcadores na avaliação da intensidade da imunorreatividade na epiderme (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação entre casos e controles dos resultados de intensidade da imunorreatividade dos biomarcadores (recategorizados) na epiderme segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

Biomarcadores	Controles (n = 9)		Casos (n = 14)		Valor-p	OR [IC 95%]
	n	%	n	%		
Epiint NLRP3						
0 e 1	5	55,6	5	35,7	0,417**	1,00
2 e 3	4	44,4	9	64,3		2,25 [0,41; 12,44]
Epiint caspase-1						
0 e 1	3	37,5	6	42,9	0,999**	1,00
2 e 3	5	62,5	8	57,1		0,80 [0,13; 4,75]
Epiint caspase-4/5						
0 e 1	5	55,6	5	35,7	0,417*	1,00
2 e 3	4	44,4	9	64,3		2,25 [0,41; 12,44]
Epiint IL-1 β						
0 e 1	6	66,7	6	42,9	0,400**	1,00
2 e 3	3	33,3	8	57,1		2,67 [0,47; 15,25]
Epiint IL-6						
0 e 1	3	33,3	4	28,6	0,999**	1,00
2 e 3	6	66,7	10	71,4		1,25 [0,20; 7,61]

*Teste qui-quadrado de Pearson; **Teste exato de Fisher.

OR (*Odds Ratio*); IC (intervalo de confiança); Epi (epiderme); int (intensidade).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, também após a recategorização, houve diferença significativa entre casos e controles para a intensidade da imunorreatividade do NLRP3 na avaliação da derme. Para esse biomarcador, observou-se valores mais elevados entre os casos, já que os resultados 0 e 1 ocorreram em 88,9% dos controles e em 42,9% casos. Por outro lado, os resultados 2 e 3 foram observados entre 11,1% dos controles e em 57,1% dos casos. Segundo os resultados da medida de risco (OR), os pacientes com resultados 2 e 3 para a intensidade de NLRP3 na derme apresentam 10,67 vezes mais chance de serem casos de RT1 do que aqueles com NLRP3 0 e 1.

Tabela 7 - Comparação entre casos e controles dos resultados de intensidade da imunorreatividade dos biomarcadores (recategorizados) na derme segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

Biomarcadores	Controles (n = 9)		Casos (n = 14)		Valor-p	OR [IC 95%]
	n	%	n	%		
Derme int NLRP3						
0 e 1	8	88,9	6	42,9	0,040**	1,00
2 e 3	1	11,1	8	57,1		
Derme int caspase-1						
0 e 1	8	88,9	11	78,6	0,273**	***
2 e 3	0	0	3	21,4		
Derme int caspase-4/5						
0 e 1	9	100,0	12	85,7	0,502**	***
2 e 3	0	0,0	2	14,3		
Derme int IL-1 β						
0 e 1	9	100	14	100	****	****
Derme int IL-6						
0 e 1	7	77,8	11	78,6	0,999**	1,00
2 e 3	2	22,2	3	21,4		

*Teste qui-quadrado de Pearson. **Teste exato de Fisher. *** Impossível calcular devido a existência de caselas nulas. **** Não há resultado por haver apenas um grupo.

OR (*Odds Ratio*/razão de chances); IC (intervalo de confiança); int (intensidade).

Nas Figuras 12 a 16 encontram-se os resultados do percentual da imunorreatividade dos biomarcadores NLRP3, caspase-1, caspase-4/5, IL-1 β e IL-6 entre casos e controles nas avaliações da derme e epiderme após recategorização, sendo que para nenhum dos biomarcadores observou-se diferença entre casos e controles.

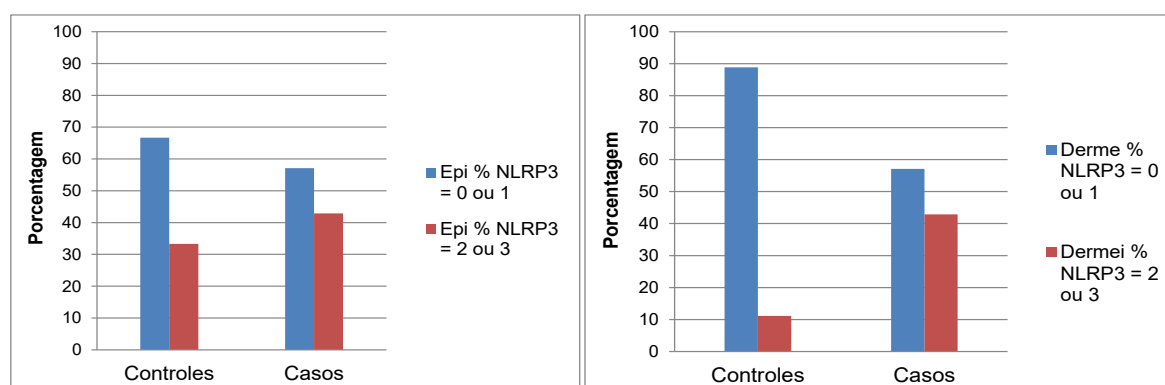


Figura 12- Percentual da imunorreatividade do biomarcador NLRP3 (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

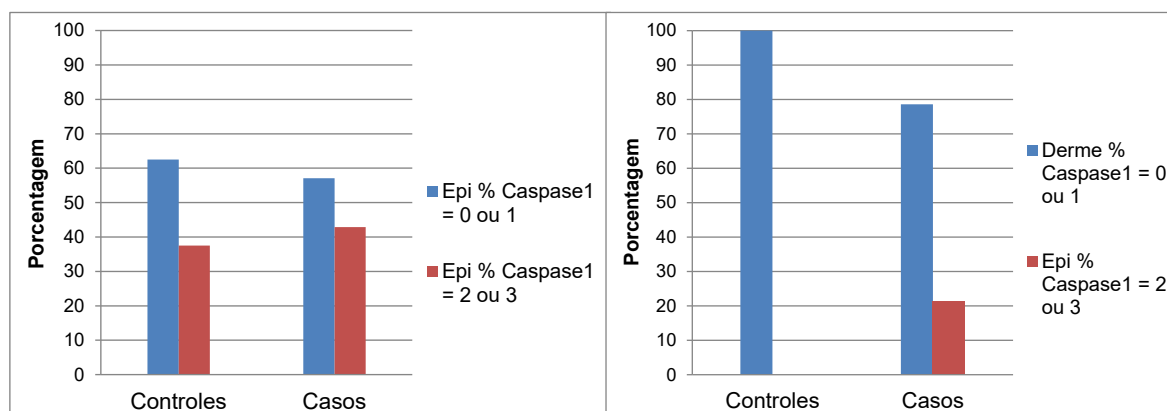


Figura 13 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador caspase-1 (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

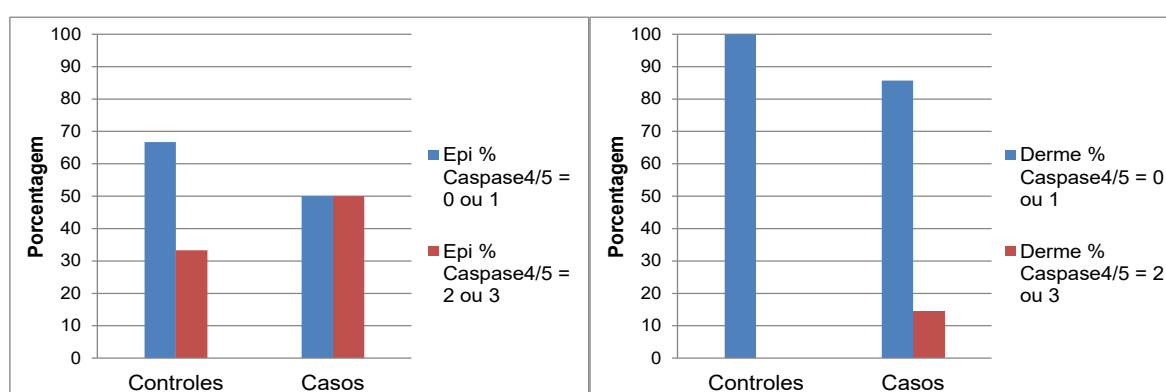


Figura 14- Percentual da imunorreatividade do biomarcador caspase-4/5 (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

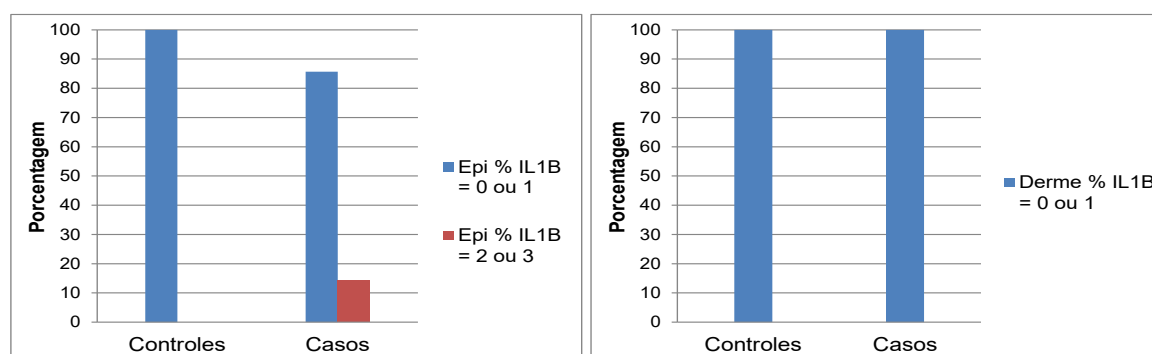


Figura 15 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL-1β (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

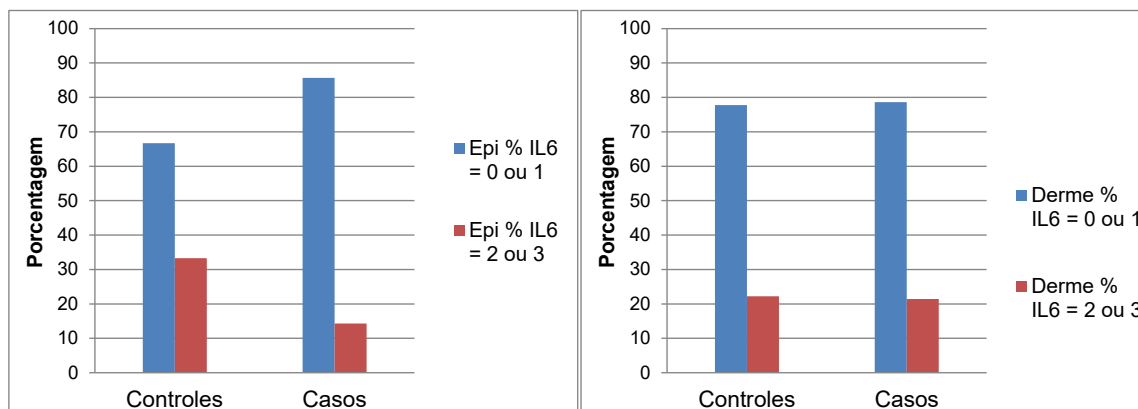


Figura 16 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL-6 (recategorizado) na epiderme e derme entre casos e controles, segundo estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes, entre 2012 e 2015 (n = 23).

6.2.2 Análise de regressão logística

Para avaliar o efeito dos biomarcadores em relação à ocorrência de RT1 (comparação entre casos e controles) de maneira independente, isto é, após controle por possíveis fatores de confusão foi realizada análise multivariada por meio do modelo de regressão logística binária.

Nessa análise, considerou-se como variável dependente a ocorrência de RT1 (caso *versus* controle) e, como possíveis variáveis explicativas, todas as demais variáveis analisadas no estudo (sociodemográficas, clínicas, além dos biomarcadores).

Para construção do modelo de regressão, todas as variáveis com valor $-p < 0,20$ na análise univariada foram inseridas no modelo de regressão logística binária para ajuste de possíveis fatores de confusão. Dessa forma, as variáveis selecionadas para o modelo foram: classificação operacional, grau de incapacidade no diagnóstico e na cura, e intensidade de imunorreatividade do NLRP3 na derme.

Após ajuste do modelo, todas as variáveis não significativas ($p > 0,05$) foram retiradas uma a uma do modelo, permanecendo no modelo final ($p < 0,05$) a variável “intensidade de imunorreatividade do NLRP3 na derme”.

Os resultados do modelo final apresentados na Tabela 8 indicam que a intensidade de imunorreatividade do NLRP3 é um fator relacionado à ocorrência da RT1, independentemente de qualquer fator de confusão.

Segundo os valores da medida de risco (OR), estimada por meio do modelo de regressão, os pacientes com resultados 2 e 3 para a intensidade de NLRP3, na derme, apresentam quase 11 vezes mais chance de serem casos de RT1 do que aqueles com NLRP3 0 e 1, sendo que esse valor pode variar na população conforme intervalo de confiança de 95% entre 1,04 e 109,94.

Tabela 8 - Modelo final de regressão logística binária considerando como variável resposta o grupo de estudo (caso *versus* controle), com base em dados obtidos no estudo realizado no Hospital Eduardo de Menezes e na Faculdade de Medicina de Minas Gerais, entre 2012 e 2015.

Variável	Valor-p	OR [IC 95%]
Derme int NLRP3		
0 e 1	0,047	1,00
2 e 3		10,67 [1,04; 109,94]

Legenda: OR (*Odds Ratio*/ razão de chances); IC (intervalo de confiança); int (intensidade).

7 DISCUSSÃO

A reação hansênica tipo 1 tem grande potencial incapacitante e, devido a esse fato, várias pesquisas estão em andamento em busca de biomarcadores que possam predizê-la precocemente.

O principal resultado desse estudo, a partir de dados originais, ampliou o conhecimento da participação da imunidade inata na reação hansênica do tipo 1. Foi encontrada associação entre a hiperexpressão do biomarcador do inflamassoma NLRP3 no infiltrado inflamatório dos casos com a reação tipo 1. E, considerando-se que a pele analisada foi coletada no momento do diagnóstico de hanseníase, esse resultado permite a apresentação de um potencial biomarcador preditivo da referida reação.

Apesar da originalidade e relevância, o presente estudo encontrou limitações como o fato de ter sido baseado em uma amostra de um único centro de referência em Belo Horizonte, circunstância na qual os resultados não são representativos de todos os casos de hanseníase de Minas Gerais. Como centro de referência, o Hospital Eduardo de Menezes, no qual o estudo foi realizado, recebe com maior frequência pacientes com apresentações graves da doença, incluindo as reações tipo 1. Além disso, pacientes com doenças inflamatórias e/ou infecciosas conhecidas não foram incluídos e nem mesmo rastreados para tais condições no estudo, como estratégia para que essas enfermidades não causassem efeito potencialmente confundidor na avaliação dos resultados. Outra limitação desse estudo se refere aos muitos critérios de exclusão utilizados como estratégia para se evitar o erro sistemático por confundimento, o que pode prejudicar a extrapolação dos resultados para a população geral. E, por fim, o material biológico analisado corresponde à biópsia da lesão suspeita de hanseníase realizada no momento do diagnóstico, e não no momento exato da reação. Esse dado pode mitigar a participação dos biomarcados caspase-1, caspases-4/5, IL-1 β e IL-6 como protagonistas da reação tipo 1.

Entretanto, assumidas essas limitações, destacam-se como pontos fortes do presente estudo o seu desenho (estudo transversal do tipo caso controle), a abrangência de uma quantidade de amostras adequada e a adoção de critérios rigorosos para controlar os vieses da técnica e da análise da imuno-histoquímica. A quantidade amostral foi definida a partir da realização do cálculo amostral e posteriormente optou-se por calcular o poder de detecção da amostra, considerando

os resultados do biomarcador NLRP3, o NLR mais estudado em inflamassoma (ZHONG; KINIO; SALEH, 2013). Para um nível de significância de 5%, ao considerarmos os resultados de intensidade do NLRP3 temos um poder de 77,7% valor considerado adequado (muito próximo de 80%), mas considerando os resultados de porcentagem do NLRP3, o poder cai para 54,3%. Para esse segundo resultado, seria necessária uma amostra de pelo menos 24 pacientes em cada grupo para detectar uma diferença significativa.

Esse resultado pode ser considerado ainda mais relevante porque o estudo controlou os seus principais vieses: o de subjetividade e de seleção. Considerando que o estudo foi realizado com técnica e protocolos rigorosamente padronizados, conforme orientações do fabricante dos insumos, três cuidados complementares foram adotados para mitigar ou controlar o risco de subjetividade supracitado: 1º) análise semi-quantitativa das reações de imuno-histoquímica nos compartimentos epitelial e dérmico, por duas variáveis independentes (intensidade e percentual de reatividade), através do score modificado do trabalho de Lockwood e colaboradores (2011); 2º) segunda análise semi-quantitativa das reações de imuno-histoquímica nos mesmos locais, por meio de escore de expressão imuno-histoquímica, conforme publicação de Takano e colaboradores (2016); 3º) classificação das reações imuno-histoquímicas por meio do consenso entre três observadores independentes (LOCKWOOD *et al.*, 2011; TAKANO *et al.*, 2016).

Além de todas essas estratégias utilizadas para reduzir os erros aleatórios e sistemáticos, os resultados desse estudo foram criticamente comparados e confrontados com outros estudos relacionados aos temas de imunopatologia das doenças infecciosas, neoplásicas e autoinflamatórias, como está descrito abaixo.

Evidências recentes sugerem uma participação evidente da família do receptor NLRP3, por meio do inflamassoma NLRP3, nas respostas a infecções crônicas intracelulares, tais como tuberculose (SOUZA DE LIMA *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2016), Legionella (MASCARENHAS; ZAMBONI, 2017), HIV-1 (PONTILLO *et al.*, 2012) e HTLV-1 (KAMADA *et al.*, 2014), reforçando a idéia de que esse inflamassoma representa uma ferramenta desencadeadora de cascata inflamatória na tentativa de combate aos patógenos intracelulares.

Da mesma forma, diversos estudos em neoplasias também avaliaram o inflamassoma NLRP3 como um importante protagonista na patogenia e gravidade das mesmas, e obtiveram resultados que fortalecem a principal conclusão do nosso

estudo. Detalhadamente, Okamoto e colaboradores (2010) identificaram que melanomas em fases avançadas exibiam características de doenças autoinflamatórias, com ativação de NLRP3. Em concordância com esse estudo Ahmad e colaboradores (2013) evidenciaram a ação autoinflamatória desse complexo por meio do processamento e secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 em células do melanoma e por fim demonstraram que a inibição do inflamassoma NLRP3 evita a metástase. Já, Ungerback e colaboradores (2012) propuseram que polimorfismos em NLRP3 (Q705K) estão associados com uma sobrevida baixa em pacientes com carcinoma colorretal avançado e que os mesmos podem ser utilizados como marcadores prognósticos, enquanto Li e colaboradores (2016) verificaram que hiperexpressão de NLRP3 e caspase-1 foram observadas em pacientes com mieloma múltiplo em comparação à baixa expressão em indivíduos saudáveis. Semper e colaboradores (2014) indicaram que a secreção de IL-1 β induzida por *Helicobacter pylori* é mediada pela ativação de receptores NLRP3, aumentando o risco para câncer gástrico (UNGERBACK *et al.*, 2012; SEMPER *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016).

Além dessas evidências experimentais anteriores, também já foi demonstrado que o inflamassoma NLRP3 encontra-se ativado em doenças inflamatórias da pele, como por exemplo nas múltiplas síndromes hereditárias periódicas ou doenças autoinflamatórias, que são caracterizadas por crises inflamatórias agudas sistêmicas não associadas a infecções, tumores ou auto-imunidade. As criopirinopatias decorrem da mutação do gene NLRP3 (CONTASSOT; BEER; FRENCH, 2012).

Entretanto, de todos os dados recentes da literatura sobre o inflamassoma NLRP3, destacam-se aqueles relacionados à tuberculose. Eklund e colaboradores (2014) observaram que macrófagos isolados de doadores de sangue saudáveis, apresentando variantes genéticas em NLRP3 e CARD8, condicionados à subsequente infecção com *M. tuberculosis*, não desenvolviam a tuberculose, sugerindo a participação do inflamassoma na defesa contra esse patógeno. Além desse estudo, Souza de Lima e colaboradores (2016) também observaram que indivíduos com polimorfismo no gene NLRP3 são menos susceptíveis à tuberculose pulmonar. Este polimorfismo aumenta a estabilidade e disponibilidade do RNA de NLRP3 e conseqüentemente aumento da taxa de processamento de IL-1 β e IL-18 e provável combate a infecção (EKLUND *et al.*, 2014; SOUZA DE LIMA *et al.*, 2016).

Além da corroboração acima da importância do nosso principal resultado, outra questão fundamental levantada pelo estudo foi a predição da RT1. Considerando que

a análise longitudinal para a identificação de biomarcadores que prevêm a ocorrência da reação hansênica tipo 1 se faz necessária, não existe, até o atual momento, um exame ou teste sensível e específico que possa predizê-la. Poucos estudos avaliaram biomarcadores nas lesões como o estudo de Atkinson e colaboradores (2004) que observaram forte imunorreatividade de expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-13 no momento do diagnóstico em pacientes que desenvolveram reação tipo 1, mas não contaram com um grupo controle e Chaitanya e colaboradores (2013) observaram baixa expressão do gene codificador do cortisol (11 β HSD I e II) nas lesões de pele de pacientes com reação tipo 1 em comparação aos pacientes não reacionais, além de baixos níveis de cortisol na lesão e na urina associados a elevados níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IP-10, IL-17F, IL-6, TNF- α . Sharma e colaboradores (2015), evidenciaram expressão gênica e imunorreatividade significativamente maior, para CXCL10 e CXCR3, nos pacientes dimorfos que apresentaram reação tipo 1, do que naqueles que não as apresentaram, porém não há relato sobre critérios de exclusão utilizados.

Muitos estudos avaliaram citocinas e/ou quimiocinas séricas que podem sofrer grandes variabilidades por diversas situações corriqueiras cotidianas como uma infecção de via aérea superior, atividades físicas intensas, entre outras. Faber e colaboradores (2004) observaram aumento de neopterin sérica durante os episódios de reação tipo 1 e o decréscimo dessa monocina durante o curso de tratamento com prednisona, mas não pode sugerir predição pois não conta com um grupo controle. Stefani e colaboradores (2009) demonstraram níveis plasmáticos aumentados das citocinas pró-inflamatórias CXCL10 e IL-6 nos pacientes com reação tipo 1 em relação aos controles, sugerindo que as mesmas seriam fortes candidatas a biomarcadores de predição dessa reação. Chaitanya e colaboradores (2012) observaram níveis significativamente maiores de IL-17F em pacientes com reação tipo 1 do que nos pacientes não reacionais. Saini e colaboradores (2016) evidenciaram aumento de células Th17, citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-23, IL-6, quimiocinas CCL20 e CCL22 e redução de FOXP3 e TGF- β em pacientes reacionais quando comparados aos não reacionais. Em 2015, Khadge e colaboradores observaram, produção elevada de IFN- γ , IP-10, IL-17 e VEGF e baixa produção de IL-10 nos pacientes com reações tipo 1 em comparação aos pacientes não reacionais. Além dessas avaliações de biomarcadores séricos, Bochud e colaboradores (2008) em estudo caso controle, observaram a predominância de dois polimorfismos no gene TLR2 nos pacientes que

desenvolveram reação tipo 1, sendo estes polimorfismos potenciais biomarcadores genéticos referentes à imunidade inata, para predição de reação tipo 1.

Assim, após a fundamentação teórica e argumentação acima, nossos achados sugerem que o biomarcador NLRP3 pode ser um potencial biomarcador preditivo da reação tipo 1 no momento do diagnóstico dessa grave doença.

8 CONCLUSÃO

Este estudo identificou hiperexpressão do biomarcador do inflamassoma NLRP3, em células inflamatórias da derme, notadamente superiores em pacientes que desenvolveram RT1, no primeiro ano de tratamento da doença, quando comparados àqueles que não desenvolveram a reação.

Para os outros biomarcadores do inflamassoma ativados pela via clássica (caspase-1 e IL-1 β) e biomarcadores do inflamassoma ativados pela via alternativa (caspases-4/5, caspase-1 e IL-1 β), não foi evidenciada diferença significativamente estatística entre os grupos.

Para IL-6, também não foi encontrada diferença significativamente estatística entre os grupos.

Em conjunto, os resultados dessa pesquisa sugerem que o biomarcador do inflamassoma NLRP3 possa constituir um potencial biomarcador preditivo das RT1, o que pode contribuir para instituição de medidas de prevenção, tratamento precoce e desenvolvimento de novas propostas terapêuticas para a condição.

9 PROPOSIÇÕES

Há necessidade de estudos adicionais para comprovação da atuação da imunidade inata e do inflamassoma na hanseníase, e em especial, nas reações hansênicas. Antes de se recomendar a imuno-histoquímica do NLRP3, como um teste de rastreio da reação hansênica tipo 1, deve-se replicar esta investigação.

Estudos prospectivos incluindo a biopsia de lesões de pele simultaneamente com a coleta do sangue periférico, por ocasião do diagnóstico de hanseníase e nos momentos de reações, podem contribuir para elucidação da patogênese da doença e predição dos distintos espectros clínicos da mesma.

Estudos adicionais incluindo a extração de RNA e DNA devem ser realizados para elucidação dos mecanismos biomoleculares de ativação das vias do inflamassoma pelo *M. leprae* e, conseqüentemente, avaliação de seus produtos e mecanismos evasores.

Pode-se realizar estudo prospectivo do tipo ensaio clínico que avalie o comportamento dos biomarcadores do inflamassoma frente ao tratamento das reações hansênicas.

Pode-se também avaliar pacientes com neurite refratária e neuropatia sequelar comparando entre esses a expressão dos biomarcadores do inflamassoma.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hanseníase deve continuar a ser um problema de saúde pública no Brasil nos próximos anos. Não devem ser medidos esforços para detecção de biomarcadores preditivos das reações hansênicas, que possam favorecer a detecção e o tratamento precoces desses estados inflamatórios e, conseqüentemente, a prevenção de incapacidades e deformidades físicas na doença.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AHMAD, I. *et al.* Thymoquinone suppresses metastasis of melanoma cells by inhibition of NLRP3 inflammasome. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 270, n. 1, p. 70-76, Jul. 2013.

ALGOOD, H. M.; LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clinical infectious diseases*, v. 41, Suppl. 3, p. S189-93, Aug. 2005.

ANDRADE, P. R. *et al.* CD123, the plasmacytoid dendritic cell phenotypic marker, is abundant in leprosy type 1 reaction. *The British Journal of Dermatology*, v. 172, n. 1, p. 268-271, Jan. 2015a.

ANDRADE, P. R. *et al.* Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert Review of Clinical Immunology*, v. 11, n. 3, p. 391-407, Mar. 2015b.

ASSADI, G. *et al.* Functional Analyses of the Crohn's Disease Risk Gene LACC1. *PLoS One*, v. 11, n. 12, p. e0168276, Dec. 2016.

ATKINSON, S. E. *et al.* Detection of IL-13, IL-10, and IL-6 in the leprosy skin lesions of patients during prednisolone treatment for type 1 (T1R) reactions. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, v. 72, n. 1, p. 27-34, Mar. 2004.

BAUERNFEIND, F.; HORNUNG, V. Of inflammasomes and pathogens: sensing of microbes by the inflammasome. *EMBO molecular medicine*, v. 5, n. 6, p. 814-826, Jun. 2013.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional*. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/04/diretrizes-eliminacao-hansenise-4fev16-web.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2017.a

BRASIL. Ministério da Saúde. *Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase, Brasil 2000-2015*. Portal da Saúde, jan. 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/julho/07/Indicadores-epidemiol--gicos-e-operacionais-de-hansen--ase-2000-a-2015.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2017.b

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 466, de 1º de dezembro de 2012. Conselho Nacional de Saúde aprovar as seguintes diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial da União*, 13 jun. 2013. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Taxa de prevalência da hanseníase, estados, Brasil, 2015*. *Portal da Saúde*, 31 mai. 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/julho/07/Taxa-de-Preval-ncia-da-Hansen-ase--estados--Brasil--2015.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature reviews. Immunology*, v. 16, n. 7, p. 407-420, Jul. 2016.

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, Dec. 2012.

CHAITANYA, V. S. *et al.* Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. *Immunology Letters*, v. 156, p. 1-2, p. 159-167, Nov.-Dec. 2013.

CHOI, A. J.; RYTER, S. W. Inflammasomes: molecular regulation and implications for metabolic and cognitive diseases. *Molecules and cells*, v. 37, n. 6, p. 441-448, Jun. 2014.

COGEN, A. L.; *et al.* Human beta-defensin 3 is up-regulated in cutaneous leprosy type 1 reactions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 11, p. e1869, 2012

COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, v. 409, n. 6823, p. 1007-1011, Feb. 2001.

CONTASSOT, E.; BEER, H. D.; FRENCH, L. E. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss medical weekly*, v. 142, p. w13590, May 2012.

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. *OpenEpi*: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, versão 3.01, atualizado em 6 abr. 2013. Disponível em: <www.OpenEpi.com>. Acesso em: 03 abr. 2017.

EKLUND, D. *et al.* Human gene variants linked to enhanced NLRP3 activity limit intramacrophage growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.*, v. 209, n. 5, p. 749-53, Mar. 2014.

FABER, W. R. *et al.* Serial measurement of serum cytokines, cytokine receptors and neopterin in leprosy patients with reversal reactions. *Lepr Rev.*, v. 75, n. 3, p. 274-81, Sep. 2004.

FREMOND, C. M. *et al.* IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.*, v. 179, n. 2, p. 1178-1189, Jul. 2007.

GAY, N. J.; KEITH, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*, v. 351, n. 6325, p. 355-356, May 1991.

GELBER, R. H. Leprosy (Hansen's Disease). In: MANDELL, G. L.; DOUGLAS, R. G.; BENNET, J. E. *Principles and practice of infectious diseases*. 3. ed. New York: Churchill Livingstone, 1990. v. 2. cap. 231, p. 2243-2250.

GELUK, A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. *Expert Opin Med Diagn.*, v. 7, n. 3, p. 265-274, May 2013.

GIGLIOTTI, P. Avaliação da função macrófaga na hanseníase virchowiana: marcadores de superfície, receptores TLR e NLR e mediadores inflamatórios. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2014.

GOULART, I. M; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to Mycobacterium leprae. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 35, n. 4, p. 365-375, Jul.-Aug. 2002.

GROSSI, M. A. F. Episódios Reacionais. In: LYON, S.; GROSSI, M. A. F. *Hanseníase*. Rio de Janeiro: Medbook, 2013.

GROSSI, M. A. F. *Noções de Hansenologia*. Informe Técnico de Hanseníase, FHEMIG, 1987.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.*, v. 21, n. 7, p. 677-687, Jul. 2015.

HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci.*, v. 41, n. 12, p. 1012-1021, Dec. 2016.

JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, D.; LAMKANFI, M. Inflammatory caspases: key regulators of inflammation and cell death. *Biol Chem.*, v. 396, n. 3, p. 193-203, Mar. 2015.

KAMADA, A. J. *et al.* NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 960-963, Nov. 2014.

KANG, T. J. *et al.* Comparison of two mice strains, A/J and C57BL/6, in caspase-1 activity and IL-1 β secretion of macrophage to Mycobacterium leprae infection. *Mediators Inflamm.*, v. 2010, p. 708713, 2010.

KAYAGAKI, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, v. 526, n. 7575, p. 666-71, Oct. 2015.

KHADGE, S. *et al.* Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. *BMC Infect Dis.*, v. 15, p. 477, Oct. 2015.

LI, Y. *et al.* Dysregulation of the NLRP3 inflammasome complex and related cytokines in patients with multiple myeloma. *Hematology*, v. 21, n. 3, p. 144-151, Apr. 2016.

- LOCKWOOD, D. N. *et al.* Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 5, n. 12, p. e1327, Dec. 2011.
- LYON, S.; LYON, L. F. P. A doença hanseníase. In: LYON, S.; GROSSI, M. A. F. *Hanseníase*. Rio de Janeiro: Medbook, 2013.
- LYON-MOURA, A. C.; PEDROSA, M. S. Histopatologia da hanseníase. In: LYON, S.; GROSSI, M. A. F. *Hanseníase*. Rio de Janeiro: Medbook, 2013.
- MA, Y. *et al.* A Negative Feedback Loop Between Autophagy and Immune Responses in *Mycobacterium leprae* Infection. *DNA Cell Biol.*, v. 36, n. 1, p. 1-9, Jan. 2017.
- MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *MolCell.*, v. 10, n. 2, p. 417-426, Aug. 2002.
- MASCARENHAS, D. P.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome biology taught by *Legionella pneumophila*. *J Leukoc Biol.*, v. 101, n. 4, p. 841-849, Apr. 2017.
- MEMÓRIA. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY, 6., Madrid, 1953. Madrid: Association International de la Lepra, 1953.
- MENDES, A. L. G. *Associação de biomarcadores do inflamassoma às diferentes formas imunopatológicas da hanseníase*. 2017. 110 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.
- MENEZES, V. M. *et al.* Epidemiological and clinical patterns of 92 patients co-infected with HIV and *Mycobacterium leprae* from Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v. 108, n. 2, p. 63-70, Feb. 2014.
- MISHRA, B. B. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol.*, v. 12, n. 8, p. 1046-1063, Aug. 2010.
- MOTTA, A. C. *et al.* Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 67, n. 10, p. 1145-8, Oct. 2012.
- NAAFS, B. Treatment duration of reversal reaction: a reappraisal. Back to the past. *Lepr Rev.*, v. 74, n. 4, p. 328-336, Dec. 2003.
- ODETALL, C.; KAGAN, J. C. Activation and pathogenic manipulation of the sensors of the innate immune system. *Microbes and infection*, pii: S1286-4579, n. 17, p. 30005-9, Jan. 2017.
- OKAMOTO, M. *et al.* Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *J Biol Chem.*, v. 285, n. 9, p. 6477-6488, Feb. 2010.

OPROMOLLA, D. V. A. *Noções de Hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Epidemiological situation, burden and distribution*, 2015. Jan. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/epidemiology/en/>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Estratégia global para hanseníase 2016-2020: aceleração rumo a um mundo sem hanseníase*. Jan. 2016. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208824/8/9789290225201Portuguese.pdf?ua=1>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. *Princípios de Bioestatística*. São Paulo: Thomson, 2004.

PONTILLO, A. *et al.* NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. *Infect Genet Evol.*, v. 19, p. 274-279, Oct. 2013.

PONTILLO, A. *et al.* Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, v. 59, n. 2, p. 121-125, Feb. 2012.

REES, R. J. The impact of experimental human leprosy in the mouse on leprosy research. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 39, n. 2, p. 201-215, Apr-Jun. 1971.

REES, R. J.; YOUNG, D. B. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, R. C.; OPROMOLLA, D. V. A. L. *Leprosy*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1985. Cap. 3, p. 35-52.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. A Classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev.*, v. 33, p. 119-128, 1962.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 34, n. 3, p. 255-73, Jul.-Sep. 1966.

SÁ, D. C.; FESTA NETO, C. Inflamassomas e a dermatologia. *An Bras Dermatol.*, v. 91, n. 5, p. 566-578, 2016.

Sá DC, Festa Neto C. Inflamassomas e a dermatologia. *An Bras Dermatol.* 2016;91(5):566-78.

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 Negl Trop Dis.*, v. 10, n. 4, p. e 0004592, Apr. 2016.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Dermatologia. São Paulo: Artes Médicas, 2008. cap. 41: *Hanseníase*. p. 625-651.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. *Cell.*, v. 140, n. 6, p. 821-832, Mar. 2010.

SCOLLARD, D. M. et al. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, v. 62, n. 4, p. 559-567, Dec. 1994.

SEMPER, R. P. et al. Helicobacter pylori-induced IL-1 β secretion in innate immune cells is regulated by the NLRP3 inflammasome and requires the cag pathogenicity island. *J Immunol.*, v. 193, n. 7, p. 3566-3576, Oct. 2014.

SHARMA, I. et al. Is CXCL10/CXCR3 axis overexpression a better indicator of leprosy type 1 reaction than inducible nitric oxide synthase? *Indian J Med Res.*, v. 142, n. 6, p. 681-689, Dec. 2015.

SHEPARD, C. C. Temperature optimum of Mycobacterium leprae in mice. *J Bacteriol.*, v. 90, p. 1271-1275, 1965.

SHEPARD, C. C.; MCRAE, D. H. Mycobacterium leprae in mice: minimal infections relationship between staining quality and infectivity and effect of cortisone. *J Bacteriol.*, v. 89, p. 365-372, 1965.

SHI, J.; GAO, W.; SHAO, F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem Sci.*, pii, v. S0968-0004, n. 16, p. 30182-30187, Dec. 2016.

SINSIMER, D. et al. Mycobacterium leprae actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun.*, v. 78, n. 1, p. 293-300, Jan. 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HANSENOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. *Hanseníase: Episódios Reacionais*. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Brasília, 4 jul. 2003.

SOUZA DE LIMA, D. et al. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol.*, v. 41, p. 240-244, Jul. 2016.

STEFANI, M. M. A.; MACHADO, P. R. Imunologia na hanseníase. In: TALHARI, S. et al. *Hanseníase*. Rio de Janeiro: Di Livros, 2015.

STEFANI, M. M. et al. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis.*, v. 9, p. 75, May. 2009.

TAKANO, K. et al. Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol.*, v. 77, p. 98-104, 2016.

TEIXEIRA, M. A. et al. NRAMP1 gene polymorphisms in individuals with leprosy reactions attended at two reference centers in Recife, northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 43, n. 3, p. 281-6, May-Jun. 2010.

UNGERBACK, J. et al. Genetic variation and alterations of genes involved in NF κ B/TNFAIP3- and NLRP3 inflammasome signaling affect susceptibility and outcome of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, v. 33, n. 11, p. 2126-2134, Nov. 2012.

VAN BRAKEL, W. H.; KHAWAS, I. B; LUCAS, S. B. *Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal*. *Lepr Rev.*, v. 65, n. 3, p. 190-203, Sep. 1994.

VAN BEERS, S.M.; DE WIT, Madeleine YL; KLATSER, Paul R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. *FEMS Microbiology letters*, v. 136, n. 3, p. 221-230, 1996.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome biology*, v. 2, n. 8, REVIEWS 1023, 2001.

WEI, M. et al. NLRP3 Activation Was Regulated by DNA Methylation Modification during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Biomed Research International*, v. 2016, p. 4323281, 2016.

YOON, G. S. et al. Clofazimine Biocrystal Accumulation in Macrophages Upregulates Interleukin 1 Receptor Antagonist Production To Induce a Systemic Anti-Inflammatory State. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 60, n. 6, p. 3470-3479, May 2016.

ZHANG, Q. et al. NLRP3 rs35829419 polymorphism is associated with increased susceptibility to multiple diseases in humans. *Genet Mol Res.*, v. 14, n. 4, p. 13968-13980, Oct. 2015.

ZHONG, Y.; KINIO, A.; SALEH, M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol.*, v. 4, p. 333, Oct. 2013.

APÊNDICE A- Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov		
	Estatística	df	Sig.
Idade	,128	23	,200

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Estatística	df	Sig.
Índice Baciloscópico	,327	23	,000

ANEXO A - Aprovação do estudo 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 - Dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido 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 agosto de 2016, a emenda abaixo relacionada, do 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".

- Dispensa de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com a justificativa de que os pacientes que tiveram suas biópsias realizadas não serão novamente recrutados.

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

Prof. Drª Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO C - Saídas das análises

Caracterização da amostra por grupo

sexofinal * Grupo Tabulação cruzada

			Grupo		Total
			controle	caso	
sexofinal	feminino	Contagem	6	5	11
		% dentro de Grupo	66,7%	35,7%	47,8%
	masculino	Contagem	3	9	12
		% dentro de Grupo	33,3%	64,3%	52,2%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	2,103 ^a	1	,147	,214
Correção de continuidade ^b	1,046	1	,306	
Razão de verossimilhança	2,135	1	,144	
Fisher's Exact Test				
Associação Linear por Linear	2,012	1	,156	
N de Casos Válidos	23			

Estatísticas descritivas

Grupo	N	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Idade	23	26	63	47,48	10,757
N válido (de lista)	23				

Estatísticas de grupo

Grupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	
Idade	controle	9	45,44	9,356	3,119
	caso	14	48,79	11,716	3,131

Teste de amostras independentes

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias	
		F	Sig.	t	df
Idade	Variâncias iguais assumidas	,473	,499	-,719	21
	Variâncias iguais não assumidas			-,756	19,847

Teste de amostras independentes

		teste-t para Igualdade de Médias		
		Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença
Idade	Variâncias iguais assumidas	,480	-3,341	4,647
	Variâncias iguais não assumidas	,458	-3,341	4,419

Teste de amostras independentes

teste-t para Igualdade de Médias - 95% Intervalo de confiança da diferença			
		Inferior	Superior
Idade	Variâncias iguais assumidas	-13,006	6,323
	Variâncias iguais não assumidas	-12,564	5,882

Classificação Ridley Jopling * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Classificação Ridley Jopling	MHDD	Contagem	3	8	11
		% dentro de Grupo	33,3%	57,1%	47,8%
	MHDT	Contagem	5	5	10
		% dentro de Grupo	55,6%	35,7%	43,5%
	MHDV	Contagem	1	1	2
		% dentro de Grupo	11,1%	7,1%	8,7%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,245 ^a	2	,537	,695
Razão de verossimilhança	1,263	2	,532	,695
Fisher's Exact Test	1,506			,576
N de Casos Válidos	23			

a. 4 células (66,7%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é ,78.

Classificação Operacional * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Classificação Operacional	PB	Contagem	3	0	3
		% dentro de Grupo	33,3%	0,0%	13,0%
	MB	Contagem	6	14	20
		% dentro de Grupo	66,7%	100,0%	87,0%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	5,367 ^a	1	,021	,047
Correção de continuidade ^b	2,830	1	,093	
Razão de verossimilhança	6,355	1	,012	,047
Fisher's Exact Test				,047
Associação Linear por Linear	5,133 ^c	1	,023	,047
N de Casos Válidos	23			

Grau de incapacidade diagnóstico * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Grau de incapacidade diagnóstico	0	Contagem	8	6	14
		% dentro de Grupo	88,9%	42,9%	60,9%
	1	Contagem	0	4	4
		% dentro de Grupo	0,0%	28,6%	17,4%
	2	Contagem	1	4	5
		% dentro de Grupo	11,1%	28,6%	21,7%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	5,247 ^a	2	,073	,096
Razão de verossimilhança	6,664	2	,036	,083
Fisher's Exact Test	4,688			,114
Associação Linear por Linear	3,139 ^b	1	,076	,124
N de Casos Válidos	23			

Grau de incapacidade cura * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Grau de incapacidade cura	0	Contagem	8	6	14
		% dentro de Grupo	88,9%	42,9%	60,9%
	1	Contagem	0	3	3
		% dentro de Grupo	0,0%	21,4%	13,0%
	2	Contagem	1	5	6
		% dentro de Grupo	11,1%	35,7%	26,1%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	5,107 ^a	2	,078	,114
Razão de verossimilhança	6,261	2	,044	,114
Fisher's Exact Test	4,429			,134
Associação Linear por Linear	3,493 ^b	1	,062	,088
N de Casos Válidos	23			

IBcat * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
IBcat	negativo	Contagem	6	7	13
		% dentro de Grupo	66,7%	50,0%	56,5%
	positivo	Contagem	3	7	10
		% dentro de Grupo	33,3%	50,0%	43,5%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	,619 ^a	1	,431	,669
Correção de continuidade ^b	,127	1	,722	
Razão de verossimilhança	,627	1	,428	,669
Fisher's Exact Test				,669
Associação Linear por Linear	,592 ^c	1	,442	,669
N de Casos Válidos	23			

Contato MH * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Contato MH	Não	Contagem	5	9	14
		% dentro de Grupo	55,6%	64,3%	60,9%
	Sim	Contagem	4	5	9
		% dentro de Grupo	44,4%	35,7%	39,1%
Total		Contagem	9	14	23
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	,175 ^a	1	,675	1,000
Correção de continuidade ^b	,000	1	1,000	
Razão de verossimilhança	,175	1	,676	1,000
Fisher's Exact Test				1,000
Associação Linear por Linear	,168 ^c	1	,682	1,000
N de Casos Válidos	23			

Índice Bacilosκόpio * Grupo Tabulação cruzada

			Grupo		Total
			controle	caso	
Índice Bacilosκόpio	,00	Contagem	6	7	13
		% dentro de Grupo	66,7%	50,0%	56,5%
	1,00	Contagem	2	1	3
		% dentro de Grupo	22,2%	7,1%	13,0%
	1,25	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,3%
	1,50	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,3%
	2,00	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,3%
	2,50	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,3%
	2,75	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,3%
	3,75	Contagem	1	1	2
		% dentro de Grupo	11,1%	7,1%	8,7%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	4,538 ^a	7	,716	1,000
Razão de verossimilhança	6,253	7	,511	1,000
Fisher's Exact Test	4,705			1,000
Associação Linear por Linear	,601 ^b	1	,438	,461
N de Casos Válidos	23			

Estatísticas - Índice Baciloscópio

	N	Válido		
		Ausente		
controle				9 0
		Média		,6389
		Modelo padrão		1,24443
	Percentis		25 50 75	,0000 ,0000 1,0000
caso	N	Válido		14 0
		Ausente		
	Média			1,0536
	Modelo padrão			1,27543
	Percentis		25 50 75	,0000 ,5000 2,1250

Estatísticas Índice Baciloscópio

	N	Válido		
		Ausente		
				23 0
		Média		,8913
		Modelo padrão		1,25188
Percentis		25		,0000
		50		,0000
		75		1,5000

Mann-Whitney Test**Test Statisticsa**

	Índice Baciloscópio
Mann-Whitney U	49,500
Wilcoxon W	94,500
Z	-,940
Sig. Assint. (2 caudas)	,347
Sig exata [2*(Sig. de 1-cauda)]	,403 ^b

a. Variável de agrupamento: Grupo. b. Não corrigido para vínculos.

Comparação dos biomarcadores por grupo**Derme Int NLRP3 * Grupo****Tabulação cruzada**

		Grupo		Total	
		controle	caso		
Derme Int NLRP3	0	Contagem	4	6	10
		% dentro de Grupo	44,4%	42,9%	43,5%
	1	Contagem	4	0	4
		% dentro de Grupo	44,4%	0,0%	17,4%
	2	Contagem	0	3	3
		% dentro de Grupo	0,0%	21,4%	13,0%
Total	3	Contagem	1	5	6
		% dentro de Grupo	11,1%	35,7%	26,1%
	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	9,425 ^a	3	,024
Razão de verossimilhança	11,922	3	,008
Associação Linear por Linear	1,750	1	,186
N de Casos Válidos	23		

a. 7 células (87,5%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 1,17.

Derme int Casp 1 * Grupo

Tabulação cruzada

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme int Casp 1	0	Contagem	3	7	10
		% dentro de Grupo	37,5%	50,0%	45,5%
	1	Contagem	5	4	9
		% dentro de Grupo	62,5%	28,6%	40,9%
	2	Contagem	0	3	3
		% dentro de Grupo	0,0%	21,4%	13,6%
	Total	Contagem	8	14	22
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	3,322 ^a	2	,190
Razão de verossimilhança	4,259	2	,119
Associação Linear por Linear	,079	1	,779
N de Casos Válidos	22		

a. 4 células (66,7%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 1,09.

Derme int Casp 11 * Grupo

Tabulação cruzada

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme int Casp 11	0	Contagem	6	8	14
		% dentro de Grupo	66,7%	57,1%	60,9%
	1	Contagem	3	4	7
		% dentro de Grupo	33,3%	28,6%	30,4%
	2	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,3%
	3	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,3%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,408 ^a	3	,704
Razão de verossimilhança	2,107	3	,551
Associação Linear por Linear	,840	1	,359
N de Casos Válidos	23		

a. 6 células (75,0%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é ,39.

Derme int IL1B * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme int IL1B	0	Contagem	6	13	19
		% dentro de Grupo	66,7%	92,9%	82,6%
	1	Contagem	3	1	4
		% dentro de Grupo	33,3%	7,1%	17,4%
Total		Contagem	9	14	23
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	2,616 ^a	1	,106	
Correção de continuidade ^b	1,110	1	,292	
Razão de verossimilhança	2,592	1	,107	
Fisher's Exact Test				,260
Associação Linear por Linear	2,502	1	,114	
N de Casos Válidos	23			

Derme int IL6 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme int IL6	0	Contagem	3	5	8
		% dentro de Grupo	33,3%	35,7%	34,8%
	1	Contagem	4	6	10
		% dentro de Grupo	44,4%	42,9%	43,5%
	2	Contagem	2	3	5
		% dentro de Grupo	22,2%	21,4%	21,7%
Total		Contagem	9	14	23
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	,014 ^a	2	,993
Razão de verossimilhança	,014	2	,993
Associação Linear por Linear	,010	1	,922
N de Casos Válidos	23		

a. 5 células (83,3%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 1,96.

Derme Int NLRP3 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme Int NLRP3	0	Contagem	4	6	10
		% dentro de Grupo	44,4%	42,9%	43,5%
	1	Contagem	4	0	4
		% dentro de Grupo	44,4%	0,0%	17,4%
	2	Contagem	0	3	3
		% dentro de Grupo	0,0%	21,4%	13,0%
	3	Contagem	1	5	6
		% dentro de Grupo	11,1%	35,7%	26,1%
Total		Contagem	9	14	23
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	9,425 ^a	3	,024	,020
Razão de verossimilhança	11,922	3	,008	,017
Fisher's Exact Test	8,296			,025
Associação Linear por Linear	1,750 ^b	1	,186	,246
N de Casos Válidos	23			

Derme int Casp 1 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme int Casp 1	0	Contagem	3	7	10
		% dentro de Grupo	37,5%	50,0%	45,5%
	1	Contagem	5	4	9
		% dentro de Grupo	62,5%	28,6%	40,9%
	2	Contagem	0	3	3
		% dentro de Grupo	0,0%	21,4%	13,6%
	Total	Contagem	8	14	22
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	3,322 ^a	2	,190	,187
Razão de verossimilhança	4,259	2	,119	,187
Fisher's Exact Test	2,847			,187
Associação Linear por Linear	,079 ^b	1	,779	1,000
N de Casos Válidos	22			

Derme int Casp 11 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme int Casp 11	0	Contagem	6	8	14
		% dentro de Grupo	66,7%	57,1%	60,9%
	1	Contagem	3	4	7
		% dentro de Grupo	33,3%	28,6%	30,4%
	2	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,3%
	3	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,3%
	Total	Contagem	9	14	23
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,408 ^a	3	,704	1,000
Razão de verossimilhança	2,107	3	,551	1,000
Fisher's Exact Test	1,443			1,000
Associação Linear por Linear	,840 ^b	1	,359	,457
N de Casos Válidos	23			

Derme int IL1B * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme int IL1B	0	Contagem	6	13	19
		% dentro de Grupo	66,7%	92,9%	82,6%
	1	Contagem	3	1	4
		% dentro de Grupo	33,3%	7,1%	17,4%
Total			9	14	23
			100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	2,616 ^a	1	,106	,260
Correção de continuidade ^b	1,110	1	,292	
Razão de verossimilhança	2,592	1	,107	,260
Fisher's Exact Test				,260
Associação Linear por Linear	2,502 ^c	1	,114	,260
N de Casos Válidos	23			

Derme int IL6 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme int IL6	0	Contagem	3	5	8
		% dentro de Grupo	33,3%	35,7%	34,8%
	1	Contagem	4	6	10
		% dentro de Grupo	44,4%	42,9%	43,5%
	2	Contagem	2	3	5
		% dentro de Grupo	22,2%	21,4%	21,7%
Total			9	14	23
			100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	Df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	,014 ^a	2	,993	1,000
Razão de verossimilhança	,014	2	,993	1,000
Fisher's Exact Test	,215			1,000
Associação Linear por Linear	,010 ^b	1	,922	1,000
N de Casos Válidos	23			

Epi % NLRP3 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Epi % NLRP3	1	Contagem	6	8	14
		% dentro de Grupo	66,7%	57,1%	60,9%
	2	Contagem	3	6	9
		% dentro de Grupo	33,3%	42,9%	39,1%
Total		Contagem	9	14	23
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	,209 ^a	1	,648	,691
Correção de continuidade ^b	,000	1	,985	
Razão de verossimilhança	,210	1	,646	,691
Fisher's Exact Test				1,000
Associação Linear por Linear	,200 ^c	1	,655	,691
N de Casos Válidos	23			

Derme % NLRP3 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
	0	Contagem	6	6	12
		% dentro de Grupo	66,7%	42,9%	52,2%
Derme % NLRP3	1	Contagem	2	2	4
		% dentro de Grupo	22,2%	14,3%	17,4%
	2	Contagem	0	3	3
		% dentro de Grupo	0,0%	21,4%	13,0%
	3	Contagem	1	3	4
		% dentro de Grupo	11,1%	21,4%	17,4%
Total		Contagem	9	14	23
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	3,058 ^a	3	,383	,485
Razão de verossimilhança	4,110	3	,250	,446
Fisher's Exact Test	2,784			,485
Associação Linear por Linear	1,689 ^b	1	,194	,215
N de Casos Válidos	23			

Epi % Casp 1 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Epi % Casp 1	1	Contagem	5	8	13
		% dentro de Grupo	62,5%	57,1%	59,1%
	2	Contagem	3	6	9
		% dentro de Grupo	37,5%	42,9%	40,9%
Total		Contagem	8	14	22
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	,060 ^a	1	,806	1,000
Correção de continuidade ^b	,000	1	1,000	
Razão de verossimilhança	,061	1	,805	1,000
Fisher's Exact Test				1,000
Associação Linear por Linear	,058 ^c	1	,810	1,000
N de Casos Válidos	22			

Deme % Casp 1 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
	0	Contagem	3	8	11
		% dentro de Grupo	37,5%	57,1%	50,0%
Deme % Casp 1	1	Contagem	5	3	8
		% dentro de Grupo	62,5%	21,4%	36,4%
	2	Contagem	0	2	2
		% dentro de Grupo	0,0%	14,3%	9,1%
	3	Contagem	0	1	1
		% dentro de Grupo	0,0%	7,1%	4,5%
Total		Contagem	8	14	22
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	4,469 ^a	3	,215	,217
Razão de verossimilhança	5,365	3	,147	,198
Fisher's Exact Test	3,886			,288
Associação Linear por Linear	,058 ^b	1	,810	1,000
N de Casos Válidos	22			

Epi % Casp 11 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Epi % Casp 11	1	Contagem	6	7	13
		% dentro de Grupo	66,7%	50,0%	56,5%
	2	Contagem	2	6	8
		% dentro de Grupo	22,2%	42,9%	34,8%
	3	Contagem	1	1	2
		% dentro de Grupo	11,1%	7,1%	8,7%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,039 ^a	2	,595	,701
Razão de verossimilhança	1,074	2	,584	,701
Fisher's Exact Test	1,273			,701
Associação Linear por Linear	,200 ^b	1	,655	,758
N de Casos Válidos	23			

Derme % Casp 11 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme % Casp 11	0	Contagem	7	9	16
		% dentro de Grupo	77,8%	64,3%	69,6%
	1	Contagem	2	3	5
		% dentro de Grupo	22,2%	21,4%	21,7%
	2	Contagem	0	2	2
		% dentro de Grupo	0,0%	14,3%	8,7%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,431 ^a	2	,489	,664
Razão de verossimilhança	2,129	2	,345	,557
Fisher's Exact Test	1,186			,804
Associação Linear por Linear	,981 ^b	1	,322	,367
N de Casos Válidos	23			

Epi % IL1B * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Epi % IL1B	1	Contagem	9	12	21
		% dentro de Grupo	100,0%	85,7%	91,3%
	2	Contagem	0	2	2
		% dentro de Grupo	0,0%	14,3%	8,7%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,408 ^a	1	,235	,502
Correção de continuidade ^b	,184	1	,668	
Razão de verossimilhança	2,107	1	,147	,502
Fisher's Exact Test				,502
Associação Linear por Linear	1,347 ^c	1	,246	,502
N de Casos Válidos	23			

Derme % IL1B * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme % IL1B	0	Contagem	6	13	19
		% dentro de Grupo	66,7%	92,9%	82,6%
	1	Contagem	3	1	4
		% dentro de Grupo	33,3%	7,1%	17,4%
Total		Contagem	9	14	23
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	2,616 ^a	1	,106	,260
Correção de continuidade ^b	1,110	1	,292	
Razão de verossimilhança	2,592	1	,107	,260
Fisher's Exact Test				,260
Associação Linear por Linear	2,502 ^c	1	,114	,260
N de Casos Válidos	23			

Epi % IL6 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Epi % IL6	1	Contagem	6	12	18
		% dentro de Grupo	66,7%	85,7%	78,3%
	2	Contagem	3	2	5
		% dentro de Grupo	33,3%	14,3%	21,7%
Total		Contagem	9	14	23
		% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	1,168 ^a	1	,280	,343
Correção de continuidade ^b	,317	1	,573	
Razão de verossimilhança	1,144	1	,285	,343
Fisher's Exact Test				,343
Associação Linear por Linear	1,117 ^c	1	,290	,343
N de Casos Válidos	23			

Derme % IL6 * Grupo**Tabulação cruzada**

			Grupo		Total
			controle	caso	
Derme % IL6	0	Contagem	3	6	9
		% dentro de Grupo	33,3%	42,9%	39,1%
	1	Contagem	4	5	9
		% dentro de Grupo	44,4%	35,7%	39,1%
	2	Contagem	2	3	5
		% dentro de Grupo	22,2%	21,4%	21,7%
Total	Contagem	9	14	23	
	% dentro de Grupo	100,0%	100,0%	100,0%	

Testes de qui-quadrado

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	,235 ^a	2	,889	1,000
Razão de verossimilhança	,236	2	,889	1,000
Fisher's Exact Test	,413			1,000
Associação Linear por Linear	,096 ^b	1	,756	,790
N de Casos Válidos	23			

Modelo de regressão logística**Modelo 1****Resumo do processamento de caso**

Casos não ponderados ^a		N	Porcentagem
Casos selecionados	Incluído na análise	23	100,0
	Casos ausentes	0	,0
	Total	23	100,0
Casos não selecionados		0	,0
Total		23	100,0

a. Se a ponderação estiver em vigor, veja a tabela de classificação para o número total de casos.

Codificação de variável dependente

Valor original	Valor interno
controle	0
caso	1

Codificações de variáveis categóricas

	Frequência	Codificação de parâmetro		
		(1)	(2)	
Grau de incapacidade diagnóstico	0	14	,000	,000
	1	4	1,000	,000
	2	5	,000	1,000

Testes de coeficientes de modelo Omnibus

		Qui-quadrado	df	Sig.
Etapa 1	Etapa	14,122	4	,007
	Bloco	14,122	4	,007
	Modelo	14,122	4	,007

Resumo do modelo

Etapa	Verossimilhança de log -2	R quadrado Cox & Snell	R quadrado Nagelkerke
1	16,668 ^a	,459	,622

Teste de Hosmer e Lemeshow

Etapa	Qui-quadrado	df	Sig.
1	13,036	5	,023

Tabela de contingência para teste de Hosmer e Lemeshow

	Grupo = controle		Grupo = caso		Total
	Observado	Esperado	Observado	Esperado	
1	3	3,000	0	,000	3
2	5	4,087	1	1,913	6
3	0	,913	3	2,087	3
4	0	,913	5	4,087	5
5	1	,087	1	1,913	2
6	0	,000	2	2,000	2
7	0	,000	2	2,000	2

Tabela de classificação^a

Observado		Previsto		Porcentagem correta
		Grupo		
		controle	caso	
Etapa 1	Grupo controle	8	1	88,9
	Grupo caso	1	13	92,9
Porcentagem global				91,3

a. O valor de corte é ,500

Variáveis na equação

	B	S.E.	Wald	df	Sig.
classificaçãooperacional	20,443	23205,423	,000	1	,999
Grauinca paci diag			1,264	2	,532
Etapa 1 ^a Grauinca paci diag(1)	21,218	18643,574	,000	1	,999
Grauinca paci diag(2)	1,587	1,411	1,264	1	,261
DermeIntNLRP3	2,259	1,351	2,797	1	,094
Constante	-21,203	23205,423	,000	1	,999

Modelo 2

Resumo do processamento de caso

Casos não ponderados ^a		N	Porcentagem
Casos selecionados	Incluído na análise	23	100,0
	Casos ausentes	0	,0
	Total	23	100,0
Casos não selecionados		0	,0
Total		23	100,0

a. Se a ponderação estiver em vigor, veja a tabela de classificação para o número total de casos.

Codificação de variável dependente

Valor original	Valor interno
controle	0
caso	1

Codificações de variáveis categóricas

	Frequência	Codificação de parâmetro	
		(1)	(2)
Grau de incapacidade diagnóstico	0	14	,000
	1	4	1,000
	2	5	,000

Testes de coeficientes de modelo Omnibus

		Qui-quadrado	df	Sig.
Etapa 1	Etapa	12,304	3	,006
	Bloco	12,304	3	,006
	Modelo	12,304	3	,006

Resumo do modelo

Etapa	Verossimilhança de log -2	R quadrado Cox & Snell	R quadrado Nagelkerke
1	18,485 ^a	,414	,562

a. Estimação encerrada na iteração número 20 porque o máximo de iterações foi atingido. Não é possível encontrar a solução final.

Teste de Hosmer e Lemeshow

Etapa	Qui-quadrado	df	Sig.
1	19,179	4	,001

Tabela de contingência para teste de Hosmer e Lemeshow

	Grupo = controle		Grupo = caso		Total
	Observado	Esperado	Observado	Esperado	
1	8	7,057	1	1,943	9
2	0	,943	3	2,057	3
3	0	,943	5	4,057	5
4	1	,057	1	1,943	2
5	0	,000	2	2,000	2
6	0	,000	2	2,000	2

Tabela de classificação^a

Observado			Previsto		Porcentagem correta
			Grupo		
			controle	caso	
Etapa 1	Grupo	controle	8	1	88,9
		caso	1	13	92,9
Porcentagem global					91,3

a. O valor de corte é ,500

Variáveis na equação

	B	S.E.	Wald	df	Sig.
Grauinacidiag			2,166	2	,339
Grauinacidiag(1)	21,658	18151,986	,000	1	,999
Grauinacidiag(2)	2,070	1,406	2,166	1	,141
DermIntNLRP3	2,749	1,336	4,234	1	,040
Constante	-1,290	,798	2,614	1	,106

Modelo final**Resumo do processamento de caso**

Casos não ponderados ^a		N	Porcentagem
Casos selecionados	Incluído na análise	23	100,0
	Casos ausentes	0	,0
	Total	23	100,0
Casos não selecionados		0	,0
Total		23	100,0

a. Se a ponderação estiver em vigor, veja a tabela de classificação para o número total de casos.

Codificação de variável dependente

Valor original	Valor interno
controle	0
caso	1

Testes de coeficientes de modelo Omnibus

	Qui-quadrado	df	Sig.
Etapa	5,389	1	,020
Bloco	5,389	1	,020
Modelo	5,389	1	,020

Resumo do modelo

Etapa	Verossimilhança de log -2	R quadrado Cox & Snell	R quadrado Nagelkerke
1	25,400 ^a	,209	,283

a. Estimação encerrada no número de iteração 5 porque as estimativas de parâmetro mudaram em menos de ,001.

Teste de Hosmer e Lemeshow

Etapa	Qui-quadrado	df	Sig.
1	,000	0	.

Tabela de contingência para teste de Hosmer e Lemeshow

		Grupo = controle		Grupo = caso		Total
		Observado	Esperado	Observado	Esperado	
Etapa 1	1	8	8,000	6	6,000	14
	2	1	1,000	8	8,000	9

Tabela de classificação^a

Observado		Previsto		Porcentagem correta
		Grupo		
		controle	caso	
Etapa 1	Grupo controle	8	1	88,9
	Grupo caso	6	8	57,1
Porcentagem global				69,6

a. O valor de corte é ,500

Variáveis na equação

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	
Etapa 1 ^a	DermeIntNLRP3	2,367	1,190	3,955	1	,047	10,667
	Constante	-,288	,540	,284	1	,594	,750

Variáveis na equação

		95% C.I. para EXP(B)	
		Inferior	Superior
Etapa 1 ^a	DermeIntNLRP3	1,035	109,941
	Constante		