



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Vilma de Figueiredo

**Resposta imune a antígenos do *Mycobacterium leprae* na forma neural pura
de hanseníase**

Rio de Janeiro

2017

Vilma de Figueiredo

**Resposta imune a antígenos do *Mycobacterium leprae* na forma neural pura de
hanseníase**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Euzenir Nunes Sarno

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F475 Figueiredo, Vilma de.

Resposta imune a antígenos do *Mycobacterium leprae* na forma neural pura de hanseníase / Vilma de Figueiredo – 2017.

80 f.

Orientador: Geraldo Moura Batista Pereira.

Coorientadora: Euzenir Nunes Sarno.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Hanseníase – Teses. 2. Neurapatia – Teses. 3. *Mycobacterium leprae* - Teses. 4. Resposta imune - Teses. 5. Hanseníase Paucibacilar. I. Pereira, Geraldo Moura Batista. II. Sarno, Euzenir Nunes. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-002.73

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Vilma de Figueiredo

**Resposta imune a antígenos do *Mycobacterium leprae* na forma neural pura de
hanseníase**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas, da Universidade
do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de maio de 2017.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Euzenir Nunes Sarno
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Luciana Silva Rodrigues

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Sandra Regina Boiça da Silva

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Sérgio Luiz Gomes Antunes

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado especialmente a todos os doadores que aceitaram participar com o objetivo apenas de colaborar com os avanços na pesquisa da hanseníase contribuindo para o bem comum, assim como a todos que contribuíram direta e indiretamente, sem os quais este trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela força, perseverança e inspiração e pelas pessoas que ele colocou no meu caminho que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos meus familiares por compreender a importância deste trabalho, especialmente a minha filha Alice que por tantas vezes teve que se privar da companhia da mãe e ao Prof. Antonio Lisboa sempre pronto a ajudar e dar cobertura na minha ausência.

A toda equipe do ambulatório Sousa Araújo pela ajuda, por estar sempre pronta a esclarecer minhas dúvidas e pelo trato tão especial dedicado aos pacientes que participaram do projeto.

A Prof.^a Dra. Cristina Pessolani e a todos os amigos e colaboradores do Laboratório de Microbiologia Celular pela cooperação, competência e por fornecer estrutura necessária para realização deste.

Aos meus companheiros de laboratório Fernanda Carvalho, Otto Castro Nogueira, Mariana Gandini e Natasha Cabral pelo carinho, ajuda e tudo mais que os amigos fazem.

Ao Prof. Dr. José Augusto Nery, Prof. Dr. Sergio Antunes, Prof.^a Dra. Nádia Duppre e Profa. Dra. Marcia Jardim pelo imenso carinho, apoio e colaboração.

A Dra. Iris Alvim e a Prof.^a Dra. Euzenir Sarno pela orientação e pela ajuda nos momentos de indecisão.

Ao Prof. Dr. Geraldo Pereira por me conduzir ao caminho que nos permitiu realizar este trabalho.

A todos muito obrigada.

Creio que a transcendência é talvez o desafio mais secreto e escondido do ser humano. Ele se recusa a aceitar a realidade na qual está mergulhado porque se sente maior do que tudo que o cerca. Com seu pensamento, ele habita as estrelas e rompe todos os espaços. Essa capacidade é o que nós chamamos transcendência, isto é, transcende, rompe, vai para além daquilo que é dado. Numa palavra, eu diria que o ser humano é um projeto infinito.

Leonardo Boff

RESUMO

FIGUEIREDO, Vilma de. **Resposta imune a antígenos do *Mycobacterium leprae* na forma neural pura de hanseníase**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A análise do genoma sugere que o *Mycobacterium leprae* surgiu ainda no pleistoceno há aproximadamente 100 mil anos, e sua disseminação acompanhou a rota de migração dos primeiros seres humanos, com os quais este patógeno se espalhou pelo mundo. Este bacilo é o agente etiológico da hanseníase, um problema de saúde pública no Brasil, e em diversos outros países, nos quais a hanseníase é uma doença endêmica. Trata-se de um patógeno intracelular obrigatório que induz lesão nos nervos periféricos e na pele. A detecção do bacilo na lesão de pele e a neuropatia permitem o diagnóstico da doença. A neuropatia periférica com ausência de lesão de pele é observada na hanseníase neural pura (HNP). Entender a resposta imune patógeno-específica é crítico para o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem o diagnóstico precoce da HNP e outras formas de hanseníase. O diagnóstico numa fase mais inicial da doença é necessário para reduzir as incapacidades frequentes na hanseníase. O objetivo geral deste trabalho é investigar se os níveis de citocinas induzidas por antígenos *M. leprae*-específicos podem ser uma ferramenta de diagnóstico de hanseníase, especialmente para exclusão da hipótese de hanseníase em pacientes com neuropatias periféricas. Amostras de plasma e sobrenadante de 60 doadores (controles saudáveis, pacientes com hanseníase multibacilar, paucibacilar e neural pura, e portadores de outras neuropatias periféricas) foram analisadas por ensaio multiplex, após estímulo com antígenos *M. leprae*-específicos. Os pacientes com forma neural pura de hanseníase responderam aos estímulos-controle e *M. leprae*-específicos. Foram avaliadas respostas tanto em células mononucleares de sangue periférico quanto em sangue não fracionado. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas foram induzidos em resposta a antígenos de *M. leprae* no grupo controle saudável (ABE) e estes níveis diminuía gradativamente à medida que se aproximava da forma mais grave da doença (LL). Os resultados obtidos a partir de amostras de soro pacientes HNP mostram que PGL-I e LID-1 não teriam grande utilidade diagnóstica nesta forma de hanseníase. Porém, em pacientes com HNP com positividade para anti-PGL-I e anti-LID-1, talvez a sorologia pré e pós-tratamento por poliquimioterapia possa ser um elemento de avaliação de resposta terapêutica. O grupo HNP demonstrou uma resposta comparável às formas tuberculóides da hanseníase. IFN- γ , IL-17 e diversos outros biomarcadores de ativação funcional de linfócitos T, induzidos por estímulo com antígenos específicos de *M. leprae*, mostraram redução progressiva quando indivíduos expostos sem hanseníase foram comparados com pacientes. Estes biomarcadores foram detectados em níveis mais baixos em pacientes com as formas multibacilares de hanseníase. A análise de componente principal dos níveis de citocinas induzidos pela proteína ML1419c e por peptídeos sintéticos *M. leprae*-específicos permitiu separação, de pacientes com hanseníase, inclusive HNP de indivíduos saudáveis e pacientes com neuropatias periféricas não hanseníacas. A inclusão de novos parâmetros, talvez associados à lesão neural periférica ou à infecção por *M. leprae* das células de Schwann são elementos adicionais que podem aumentar a precisão de discriminação de HNP de outras neuropatias periféricas não hanseníacas.

Palavras-chave: Hanseníase. Neural pura. *M. leprae*. Resposta imune. Antígeno. Neuropatia.

Sangue não fracionado. Paucibacilar. Biomarcadores. Peptídeos.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Vilma de. **Immune response to *Mycobacterium leprae* antigens in pure neural form of leprosy**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Analysis of the genome suggests that *Mycobacterium leprae* emerged in the Pleistocene about 100,000 years ago, and its spread followed the migration route of the first humans, with which this pathogen spread throughout the world. This bacillus is the etiological agent of leprosy, a public health problem in Brazil, and in several other countries, where leprosy is an endemic disease. It is an obligate intracellular pathogen that induces injury to the peripheral nerves and skin. The detection of bacillus in the skin lesion and the neuropathy allow the diagnosis of the disease. Peripheral neuropathy with no skin lesion is seen in pure neural leprosy (PNL). Understanding the pathogen-specific immune response is critical for the development of tools that will allow the early diagnosis of PNL and other forms of leprosy. Early diagnosis of the disease is necessary to reduce the frequent disabilities in leprosy and the transmission of this infection. The general objective of this investigation is to investigate whether the levels of cytokines induced by *M. leprae*-specific antigens may be a diagnostic tool for leprosy, especially to exclude the leprosy hypothesis in patients with peripheral neuropathies. Plasma and supernatant samples from 60 donors (healthy controls, patients with multibacillary leprosy, paucibacillary and pure neural leprosy, and patients with other peripheral neuropathies) were analyzed by multiplex assay following stimulation with *M. leprae*-specific antigens. Patients with PNL responded to control and *M. leprae*-specific stimuli. Responses were evaluated both in peripheral blood mononuclear cells and in non-fractionated blood. Elevated levels of proinflammatory cytokines and chemokines were induced in response to *M. leprae* antigens in the healthy control (ABE) group and these levels gradually decreased as they approached the more severe form of the disease (LL). The results obtained from serum samples from HNP patients show that these two markers would not have great diagnostic utility in the form of leprosy. However, in patients with HNP with anti-PGL-I and anti-LID-1 positivity, perhaps the pre and post-treatment serology by multidrug therapy may be an element of evaluation of therapeutic response. The PNL group demonstrated a response comparable to the tuberculoid forms of leprosy. IFN- γ , IL-17, and several other biomarkers of T cell functional activation induced by stimulation with specific antigens of *M. leprae*, showed progressive reduction when exposed individuals without leprosy were compared with patients. These biomarkers were detected at lower levels in patients with multibacillary forms of leprosy. Principal component analysis of the cytokine levels induced by the ML1419c protein and synthetic *M. leprae*-specific peptides allowed separation of leprosy patients including PNL, from healthy subjects and patients with non-leprosy peripheral neuropathies. Inclusion of new parameters, perhaps associated with peripheral neural damage or *M. leprae* infection of Schwann cells, are additional elements that may increase the accuracy of discrimination of PNL from other non-leprosy peripheral neuropathies.

Keywords: Leprosy. Pure neural leprosy. *Mycobacterium leprae*. Cellular immunity. Neuropathy. Unfractionated blood. Paucibacillary. Biomarkers. Peptides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Blocos bem conservados (<i>Synten</i> y) em torno do locus <i>hemN</i> da <i>M. lepromatosis</i> e comparação com <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i>	15
Tabela 1 -	Relação dos peptídeos <i>M. leprae</i> -específicos e respectivas sequências de aminoácidos	25
Tabela 2 -	Características dos grupos investigados.....	31
Tabela 3 -	Proporção de indivíduos positivos para anti-PGL-I e anti-LID-1.....	32
Figura 2 -	Anticorpos anti-PGL-I versus anti-LID-1 no soro de pacientes com HNP ou NNH.....	33
Figura 3 -	Produção de anticorpos anti-PGL-I versus LID-1	34
Figura 4 -	Análise da quantificação de anticorpos IgM e IgG em amostras de pacientes HNP antes e após o término do tratamento.....	35
Figura 5 -	HNP células mononucleares de sangue periférico e células de sangue não-fracionado	36
Figura 6 -	Níveis de citocinas em culturas de sangue não fracionado estimuladas com a proteína ML1419c do <i>M. leprae</i>	38
Quadro 1 -	Comparação entre grupos para cada citocina e quimiocina induzida pelo respectivo estímulo.....	39
Figura 7 -	PCA – Proteína recombinante ML1419c.....	43
Figura 8 -	PCA – Pool de peptídeos <i>M. leprae</i> -específicos Classe I e II	44
Figura 9 -	PCA – componente 1 da ML1419c – G-CSF entre grupos.....	45
Figura 10 -	PCA- componente 2 ML1419c análise comparativa.....	46
Figura 11 -	PCA- componente 2 ML1419c análise comparativa de IL-10.....	47
Figura 12 -	PCA- componente 1 pool análise comparativa	49
Figura 13 -	PCA- componente 2 pool análise comparativa de IL-10.....	50
Figura 14 -	PCA- componente 3 pool análise comparativa de G-CSF.....	51
Figura 15 -	PCA do componente 3 das amostras estimuladas com o pool de peptídeos.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/T	Adenina/Timina
ABE	Área de baixa endemicidade
ASA	Ambulatório Souza Araújo
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	Hanseníase borderline borderline
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BEADS	Esferas magnéticas
BSA	Albumina sérica bovina
CMS	Células mononucleares de sangue periférico
CO ₂	Dióxido de carbono
CSNF	Células de sangue não fracionado
D.O	Densidade óptica
DLL	Hanseníase lepromatosa difusa
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
G/C	Guanina/citosina
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating fator</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HI	Hanseníase indeterminada
HLA	Antígeno leucocitário humano
HNP	Hanseníase neural pura
IB	Índice bacilar
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
<i>in silico</i>	Através de uma simulação computacional
LAMICEL	Laboratório de Microbiologia Celular
LID-1	<i>Leprosy Infectious Disease Research Institute diagnosis -1</i>
LL	Hanseníase lepromatosa polar
<i>M.leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. lepromatosis</i>	<i>Mycobacterium lepromatosis</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MB	Hanseníase multibacilar
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1 (CCL2)</i>

MHC	Molécula de histocompatibilidade principal
MIP-1 β	<i>Macrophage inflammatory protein-1β</i>
ML	Extrato da parede do <i>M. leprae</i> sonicado
ML1419c	Proteína recombinante do <i>M. leprae</i>
mM	Milimolar
mmp	Metaloproteinase de matriz
n	Número de participantes
NA	Não avaliado
NNH	Neuropatia não hansênica
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Peptídeo
Pb	Pares de base
PB	Hanseníase paucibacilar
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	Análise de componentes principais
PCL	Pool de classes I e II
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGL-I	Glicolípido fenólico-I
Ph	Potencial hidrogeniônico
PQT	Poliquimioterapia
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Soro feral bovino
SEB	Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SN	Sobrenadante
SNP	Sistema nervoso periférico
SUS	Sistema Único de Saúde
T _H 1	T helper 1
TLR	Receptor Toll-like
TMB	tetramethyl-benzidine
TNF	Fator de necrose tumoral
TT	Hanseníase tuberculoide polar

LISTA DE SÍMBOLOS

γ	Gama
%	Porcentagem
\leq	Menor ou igual
β	Beta
mL	Mililitro
cm	Centímetro
rpm	Rotações por minuto
α	Alfa
°C	Grau Celsius
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	23
1.1	Geral	23
1.2	Específicos	23
2	MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1	Modelo experimental	24
2.1.1	<u>Critérios de inclusão</u>	24
2.1.2	<u>Critérios de exclusão</u>	24
2.2	Peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes	25
2.3	Isolamento e cultura de células mononucleares de sangue periférico	26
2.4	Cultura de sangue não fracionado com peptídeos sintéticos <i>M. leprae</i>- específicos e estímulo controle	26
2.5	Ensaio multiplex para quantificação de citocinas	27
2.6	Coleta e obtenção de soro	27
2.7	Quantificação de anticorpos IgM anti-PGL-I	28
2.8	Quantificação de anticorpos IgG anti-LID-1	28
2.9	Análises estatísticas	29
2.10	Softwares para análise de dados em ensaios funcionais	30
3	RESULTADOS	31
3.1	Desenho amostral	31
3.2	Ensaio sorológicos	32
3.3	Quantificação de citocinas	35
4	DISCUSSÃO	54
	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO A - Termo de consentimento e livre esclarecimento	64
	ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética	73

INTRODUÇÃO

Estudos realizados a partir de comparações genômicas de diferentes cepas sugerem que o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) surgiu aproximadamente 100 mil anos, ainda no pleistoceno superior, na África e na Ásia. A disseminação da doença acompanhou a rota de migração dos primeiros seres humanos, se espalhando pelo mundo (1, 2). Achados arqueológicos na África e Ásia indicam rastros da infecção ainda na pré-história, assim como abordagens arqueológicas documentam a presença da infecção em esqueletos humanos no Egito datados do século 2º antes de Cristo (1). Durante a idade média a hanseníase se disseminou por diversos países da Europa, fato evidenciado pelo aumento no número de leprosários no continente (3). A distribuição pelas Américas provavelmente ocorreu a partir de imigrantes da Europa, uma vez que a maioria das cepas de *M. leprae* encontradas na América do Norte, Central e do Sul têm o genótipo 3I encontrado em casos de hanseníase europeia. Esta hipótese é consistente com os achados paleológicos, porque os esqueletos com sinais de hanseníase são limitados ao período pós-colonial (4).

O homem é considerado o principal hospedeiro natural do *M. leprae*, contudo este bacilo já foi observado em outras espécies como os tatus de nove faixas (*Dasypus novemcinctus*), que tem sido utilizado como modelo animal para a hanseníase. Infecção pelo *M. leprae* pode ocorrer naturalmente em algumas espécies de tatus de vida livre (5). Recentemente foram identificados esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) infectados com o bacilo da hanseníase nas ilhas britânicas. Foi observada a infecção por duas espécies de bacilo, o *M. leprae* e o *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*), uma espécie descrita em 2008 (6). Os exames histopatológicos foram positivos para BAAR (Bacilo álcool-ácido-resistente, pela técnica de Ziehl-Nielsen) e houve comprometimento dos nervos periféricos e da pele. Tatus selvagens e muitos pacientes com hanseníase no sul dos Estados Unidos foram infectados com a mesma cepa de *M. leprae*. Estudos recentes mostram que os tatus são um grande reservatório natural para o *M. leprae*, o que sugere que a hanseníase seja uma zoonose na região. (5) (7).

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, que tem predileção por macrófagos e células de Schwann, microambientes propícios para sua sobrevivência. Um trabalho recente mostrou que amebas de vida livre são capazes de fagocitar e permitir que o *M. leprae* sobreviva em cistos e permaneça viável por um período de aproximadamente 8

meses. Os cistos amebianos fornecem ambientes semelhantes aos macrófagos e podem favorecer a transmissão do *M. leprae* para seres humanos (8).

Acredita-se que a hanseníase chegou à Noruega através de saqueadores vindos das ilhas Britânicas, e, com o tempo, difundiu-se pela Europa. Em 1873 um médico norueguês, Armauer Hansen, sugeriu que um organismo microscópico poderia ser o agente etiológico da infecção, e não uma doença de cunho hereditário como se imaginava. Hansen propôs a teoria de que uma doença crônica poderia ser causada por um micróbio. Os achados de Hansen foram críticos para elucidar a patogênese e para o desenvolvimento de tratamento para esta infecção, contudo ele não conseguiu cultivar o bacilo em meios de cultura artificiais (9).

Em 2000 foi concluído o sequenciamento de uma cepa de *M. leprae* inicialmente originada de um paciente do estado de Tamil Nadu, na Índia, uma das primeiras bactérias patogênicas a ter seu genoma completamente sequenciado. Foi observado que o genoma do *M. leprae* é composto de 3.268.203 pares de base (pb) com uma média de 57 por cento de G + C (GC), um genoma menor e com uma abundância em A + T (AT) quando comparado com outras micobactérias conhecidas (10).

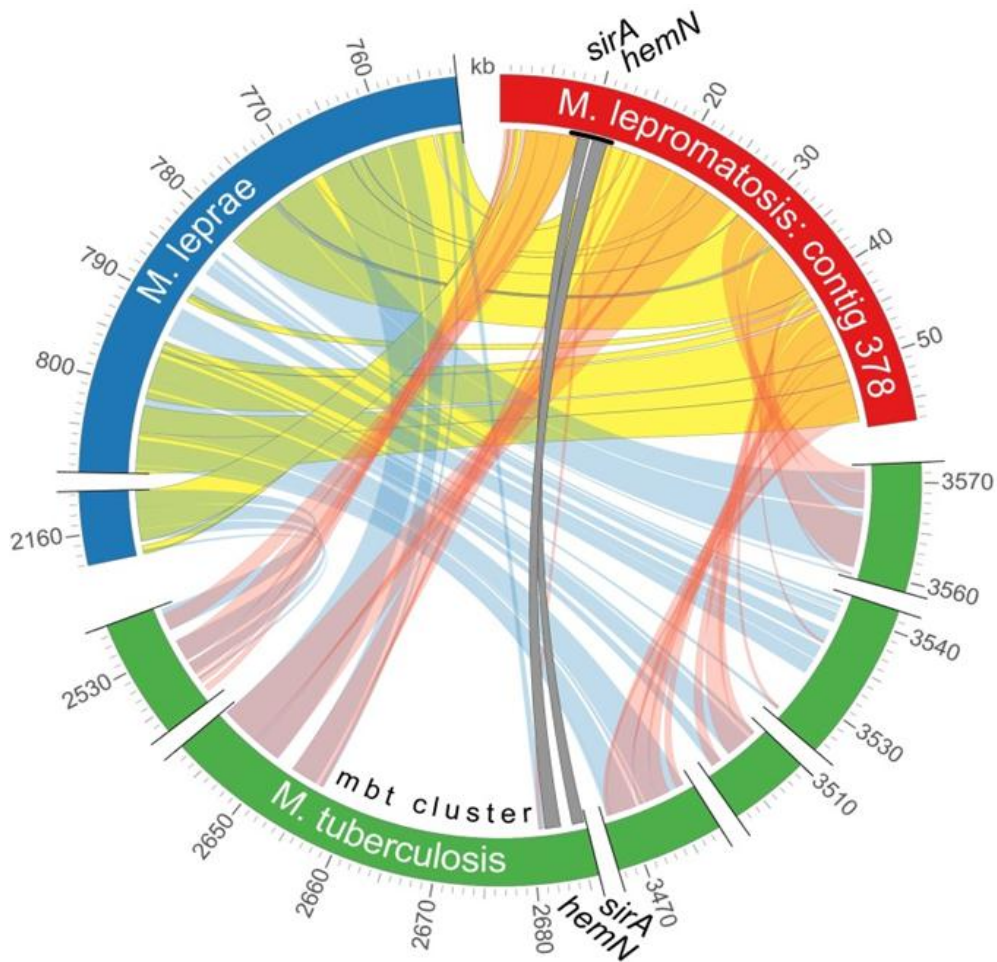
Após análise por bioinformática foram encontrados aproximadamente 1614 genes que codificam proteínas e RNAs estáveis no genoma do *M. leprae*. Estes genes compõem 49,5 por cento do genoma, o restante é ocupado por pseudogenes. Inicialmente foram encontrados 1116 pseudogenes, mas quando novas sequências se tornaram disponíveis para comparação, este número aumentou para 1293. Apesar das semelhanças gênicas compartilhadas com *M. tuberculosis*, 165 dos genes aparentemente ativos não apresentaram ortologia com o *M. tuberculosis*. A comparação de 4 cepas de origem diferenciada mostrou uma conservação notável do genoma, uma identidade de 99,995 por cento, uma conservação notável entre as cepas, assim como 251 polimorfismos, principalmente em nucleotídeos isolados (11, 12).

O *M. lepromatosis*, uma nova micobactéria descrita em 2008 (6), é responsável pela hanseníase lepromatosa difusa (DLL) e pelo Fenômeno de Lúcio que representa uma variante de reação hansênica, conhecida também como eritema necrosante com envolvimento cutâneo. Este patógeno foi sequenciado a partir de uma biópsia de pele de um paciente mexicano. Como o *M. leprae*, o *M. lepromatosis* sofreu uma forte redução gênica. Foi observado que os genomas das duas micobactérias apresentam blocos bem conservados (*Synteny*) e tamanho bem semelhante (~ 3,27 Mb). Os genes que codificam proteínas compartilham uma identidade na sequência de nucleotídeos de 93 por cento, enquanto para os pseudogenes essa semelhança é de 82 por cento. As duas espécies perderam genes, mas de diferentes regiões do genoma. O *M. leprae* parece ser uma bactéria mais recente. Um levantamento filogeográfico,

utilizando PCR diferencial, mostrou que o *M. lepromatosis* era restrito a pacientes do México (12).

Embora não se tenha um meio de transmissão bem estabelecido para a hanseníase, acredita-se que esta se dê através das vias respiratórias e da pele. O trato respiratório superior dos pacientes multibacilares é a principal fonte de *M. leprae* no ambiente (13).

Figura 1 - Blocos bem conservados (*Synteny*) em torno do locus *hemN* da *M. lepromatosis* e comparação com *M. leprae* e *M. tuberculosis*



Legenda: Blocos bem conservados (*Synteny*) em torno do locus *hemN* da *M. lepromatosis* e comparação com *M. leprae* e *M. tuberculosis*. *HemN* e *sirA* estão presentes em *M. lepromatosis* e *M. tuberculosis* (faixas cinza) mas foram suprimidas em *M. leprae*. O cluster *mbt*, presente em *M. tuberculosis*, é deletado em *M. leprae* e *M. lepromatosis*. A escala está em kilobases. Observe o rearranjo genômico entre *M. lepromatosis* (primeiros 10 kb do contig) e *M. leprae*. Adicionalmente, a sequência correspondente ao genoma de *M. leprae* entre 780 e 795 kb é quase totalmente suprimida em *M. lepromatosis*. [*hemN* gene que codifica a coproporfirinogênio III oxidase independente de oxigênio *SirA* gene relacionado à regulação de expressão gênica] (12).

A infecção causada por este patógeno apresenta um longo período de latência, sendo o tempo médio de incubação de aproximadamente 4 anos em pacientes do polo tuberculóide, e de até 30 anos para os do polo lepromatoso (14). Este longo período de incubação pode contribuir para a transmissão da hanseníase, pois antes mesmo da manifestação clínica dos sintomas, é possível que o indivíduo já seja um transmissor da infecção. A hanseníase é curável e, se for detectada e tratada no início, não causa nenhum dano permanente ao indivíduo infectado (15).

O diagnóstico da hanseníase é baseado nos dados clínicos, laboratoriais e histórico do paciente, incluindo achados como manchas hipocrômicas ou avermelhadas na pele com perda de sensibilidade, espessamento dos nervos periféricos e/ou presença de bacilos nas lesões (15).

Na maioria das vezes, os indivíduos que são expostos ao *M. leprae* são resistentes à doença, e conseguem desenvolver uma resposta imune eficaz. Apenas um pequeno grupo de pessoas (cerca de 5 a 10% dos indivíduos expostos) irá desenvolver a doença, e isto está ligado a vários fatores, inclusive genéticos (16).

Os padrões de resposta imune do hospedeiro ao bacilo estão associados ao espectro das formas clínicas observadas na hanseníase, também caracterizadas por diferentes cargas bacilares e número de lesões observadas na pele. Em 1966, Ridley & Jopling propuseram uma classificação, utilizada mundialmente até os dias atuais, a qual é feita levando-se em conta a combinação de dados clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos, caracterizando as seguintes formas: tuberculoide polar (TT), “borderline” tuberculoide (BT), “borderline borderline” (BB), “borderline” lepromatosa (BL), lepromatosa polar (LL) e indeterminada (I) (17, 18). Ridley e Jopling (18) não incluíram a hanseníase neural pura como um subgrupo distinto na classificação que elaboraram para as formas de hanseníase (19). Wade a chamou de lepra polineurítica e a introduziu como um subgrupo separado, o qual foi aceito tanto na classificação de Madri (20) como na classificação indiana (1955). Na classificação de Ridley-Jopling (18) esta categoria de pacientes, embora considerada, é classificada no espectro de formas clínicas com base nos achados histológicos dos nervos. Uma vez que o estudo histológico do nervo nem sempre é possível, muitos destes casos são apenas considerados como integrantes do grupo BT, já que a grande maioria destes pacientes é lepromina ou Mitsuda-positiva (18, 19, 21).

O teste de Mitsuda ou lepromina é amplamente conhecido por representar a imunidade celular local contra antígenos micobacterianos. Trata-se de uma reação de hipersensibilidade tardia (22) e proporciona uma medida da capacidade do indivíduo para montar uma resposta

granulomatosa contra a preparação de antígenos do *M. leprae* (23). É um teste cutâneo, que consiste na injeção intradérmica de uma suspensão de *M. leprae* inativado pelo calor. Após 21-28 dias, a resposta imune é induzida e pode ser observada a olho nu devido ao aparecimento de induração no local da injeção. Na maioria das vezes não é observada a reação em pacientes multibacilares (MB), entretanto os pacientes paucibacilares (PB) apresentam reações positivas que podem ser medidas. Uma resposta positiva ao teste de Mitsuda, com 5 ou mais milímetros de diâmetro da área de induração, está associada a uma maior proteção contra o *M. leprae*. (24)

A hanseníase é curável e o seu diagnóstico precoce é indispensável para a cura do paciente, interrupção da transmissão da doença e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública. O tratamento é feito com a poliquimioterapia (PQT), que consiste na associação de três drogas: dapsona, rifampicina e clofazimina (25). Para fins de tratamento com a PQT, os indivíduos com hanseníase são classificados operacionalmente em PB ou MB. Esta classificação, desenvolvida pelo programa de tratamento da hanseníase da Organização Mundial de Saúde (OMS), baseia-se no número de lesões apresentadas pelo doente: até cinco lesões, os pacientes são classificados como PB e se existirem mais de cinco lesões, como MB. As formas TT, BT e I são chamadas de PB e as formas LL, BL e BB são chamadas MB. A baciloscopia positiva indica pacientes com a forma MB da hanseníase, independentemente do número de lesões observadas (23). Como os pacientes com Hanseníase Neural Pura (HNP) apresentam baciloscopia negativa (Bacilo álcool-ácido resistente - BAAR). A OMS estabeleceu que os pacientes HNPs, são considerados como PB para propósito de tratamento, apesar de vários casos mostrarem nos achados histológicos do nervo características de lesões encontradas nas formas borderline e lepromatosa, algumas vezes com grande número de bacilos no nervo (21).

A prevenção da doença é feita através do uso da vacina com *M. bovis* Bacilos Calmette-Guérin (BCG), a mesma utilizada para a prevenção da tuberculose (26).

De acordo com a OMS a hanseníase se encontra mais concentrado em alguns países, nos quais ainda é considerado um problema de saúde pública. Os índices mais altos foram observados na Índia, no Brasil e na Indonésia. Juntos estes países correspondem a 80% de todos os novos casos. No Brasil foram detectados 31.064 novos casos em 2014. Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase mostram que em 2014, o percentual de avaliados quanto ao grau de incapacidade física na cura foi de 70,8 no Brasil (27). A detecção de novos casos é preocupante, e por isso medidas de controle e prevenção são necessárias, além de novas estratégias para detectar e tratar precocemente a doença, cortando a cadeia de

transmissão. Um dos maiores desafios na pesquisa da hanseníase é a descoberta de testes capazes de diagnosticar a infecção e que possam ser aplicados com a finalidade de identificar grupos com maior risco de desenvolver a doença.

Pacientes com hanseníase ou indivíduos infectados com o *M. leprae* apresentam respostas de anticorpos específicos para o glicolípido fenólico-I (PGL-I). Estudos anteriores demonstraram que o PGL-I, um componente da parede celular do *M. leprae*, está diretamente envolvido no processo de entrada deste bacilo na célula de Schwann (28, 29), auxiliando na invasão bacilar dessas células (30).

Indivíduos com hanseníase multibacilar possuem elevados níveis séricos de imunoglobulina M (IgM) induzida por PGL-I. A quantidade de IgM anti-PGL-I está diretamente relacionada a carga bacilar e auxilia no diagnóstico das formas multibacilares da hanseníase. Estudos mostram que o PGL-I pode modular seletivamente a resposta imune inata ao *M. leprae*, inibindo ou induzindo a produção de citocinas e quimiocinas de monócitos, e pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento das formas clínicas anérgicas da doença e no dano tecidual observado na forma lepromatosa (31). Em casos de hanseníase lepromatosa difusa (DLL), causados por *M. lepromatosis*, a produção de anticorpos anti-PGL-I foi observada em níveis elevados em esquilos vermelhos (7), e nos pacientes mexicanos em que a espécie foi descrita (6). Apesar da redução gênica evidenciada no *M. leprae*, foram identificados seis genes provavelmente envolvidos na síntese de PGL-I sem pseudogenes relacionados, que permanecem intactos mesmo após a evolução redutora (2).

De forma semelhante ao PGL-I, a *Leprosy Infectious Disease Research Institute diagnosis* -1 (LID-1), uma proteína quimérica obtida pela associação de duas proteínas recombinantes codificadas pelos genes *ml0405* e *ml2331*, é reconhecida pela imunoglobulina G (IgG) no soro de pacientes multibacilares (32). Estudos anteriores demonstraram que os níveis de anticorpos IgM e IgG específicos para PGL-I e LID-1 respectivamente, na hanseníase estão correlacionados ao índice bacilar (BI), e que a PQT reduz os níveis destes anticorpos *M. leprae*-específicos no soro dos pacientes (33, 34).

Pacientes com hanseníase podem ter acometimento de nervos periféricos sem alterações na pele. Esta forma da doença é denominada hanseníase neural pura e pode ser vista em aproximadamente 10% dos pacientes com hanseníase (35). Nos países em desenvolvimento e emergentes, a hanseníase é a causa mais comum de neuropatia periférica. A HNP é caracterizada pela ausência de lesão dermatológica e presença de neuropatia periférica causando alterações que afetam principalmente os troncos nervosos, e pode se

apresentar com características das diferentes formas presentes no espectro da doença. A HNP geralmente é silenciosa, evoluindo com deterioração do nervo. Os sintomas mais comuns da HNP são comprometimento da sensibilidade, queixa de parestesia, dor ou espessamento do nervo periférico, além da fraqueza muscular acompanhada de déficit motor que pode ocorrer após um maior comprometimento do nervo (36).

A neuropatia periférica é a causa mais frequente das deformidades que ocorrem na hanseníase. Trata-se de um processo inflamatório no compartimento neural, comum na hanseníase, mas que também acontece em outras patologias. O comprometimento neural na hanseníase inclui acometimento dos troncos nervosos, sintomas sensoriais, autonômicos e motores, nos estágios iniciais pode ser observado um predomínio de neuropatias nas pequenas fibras. Os nervos afetados com mais frequência são o ulnar, mediano, auricular posterior, radial superficial, fibular comum, fibular superficial e tibial posterior (37-39). Dados da literatura mostram que o espessamento do nervo ocorre devido ao processo inflamatório, que pode ocorrer no epimeuro, perineuro e endoneuro, alterando a morfologia das fibras nervosas mielinizadas ou não mielinizadas. Evidências clínicas mostram que o comprometimento dos pares de nervos cranianos também é bastante comum, sendo os mais afetados o quinto e o sétimo pares de nervos cranianos. A biopsia de nervo e a PCR (reação de polimerase em cadeia) são os procedimentos padrão ouro para o diagnóstico da forma neural pura de hanseníase devido à ausência de lesões cutâneas (40, 41).

O diagnóstico de HNP é baseado na avaliação clínica e eletro-neurofisiológica além de exames laboratoriais em conjunto com exames histopatológicos a partir de amostras de pele e nervo somados à PCR, onde os fatores determinantes são a presença de BAAR e a detecção de DNA de *M. leprae* nas amostras. Contudo em algumas amostras de nervo não é detectada a presença dos fatores determinantes para um diagnóstico definitivo, então achados como granuloma epitelióide no endoneuro, macrófagos espumosos, infiltrado mononuclear, espessamento perineural e alterações como fibrose são considerados forte indicador de HNP (36, 40).

Estudos iniciais baseados em PCR foram realizados a partir da década de 1990. Foi desenvolvido um procedimento que possibilitou a detecção de material genético (DNA) de *M. leprae* em tecidos infectados. Nesse período eram utilizadas sondas radioativas, que mais tarde foram substituídas pelas não radioativas. Diversas modificações foram incorporadas nas técnicas para de aumentar a sensibilidade e especificidade do método e reduzir o tempo necessário para obtenção do resultado (15).

A PCR é uma técnica muito eficiente para detectar DNA de *M. leprae* em nervos, mesmo quando o exame histopatológico é inespecífico para HNP. Um resultado positivo é indicativo da presença de *M. leprae* no local investigado. No entanto, a PCR não pode ser indicada como um teste diagnóstico isolado, pois um resultado positivo não indica necessariamente a doença ativa e sim uma infecção por *M. leprae* ou seja, esta tanto pode indicar a doença ativa como uma infecção, sendo necessária a correlação com os achados clínicos e outros métodos de diagnóstico (42).

O *M. leprae* tem preferência pela célula glial mielinizante do sistema nervoso periférico (SNP). O *M. leprae*, aparentemente, se liga a proteínas na superfície das células de Schwann que fazem conexões com o citoesqueleto subjacente. A ligação à superfície de células de Schwann inicia uma cascata de complexos da laminina 2 alfa-distroglicana que leva à penetração do bacilo para o citoplasma da célula de Schwann, estabelecendo assim a infecção neural (42). Uma vez no nervo, o bacilo coloniza as células de Schwann mielinizadas e se mantém por um longo período, com crescimento extremamente lento (43).

O *M. leprae* se liga especificamente às proteínas de matriz extracelular, e a partir daí, explora as interações entre a matriz e as glicoproteínas do citoesqueleto da célula alvo (44). Após a entrada na célula de Schwann, o *M. leprae* provoca a reprogramação que leva essas células a um estágio mais indiferenciado, com características mesenquimais, e que fornece condições favoráveis à permanência do bacilo na célula, assim como à colonização de outras células e tecidos. Entretanto o mecanismo inicial de chegada ao sistema nervoso periférico e a disseminação para outros tecidos ainda não estão bem claros. O esclarecimento desses eventos é necessário para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam prevenir as lesões neurológicas (45).

As metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), uma classe de enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular foram observadas em modelo experimental de dano neural. Estudos sugerem que estão envolvidas na alteração da permeabilidade da barreira hematoneural, na desmielinização e degeneração axonal, e na presença de fibrose (46). Em lesões de nervo na hanseníase foi observado aumento na presença de MMPs que parecem ser produzidas por macrófagos e células de Schwann. Os níveis mais altos de MMPs foram observados em nervos de pacientes com hanseníase com inflamação endoneural (47).

De acordo com Medeiros (2015), há indícios de que o comprometimento do nervo ocorre inicialmente com a entrada do *M. leprae* no compartimento neural, associado com

infecção assintomática, seguida por detecção do *M. leprae* pelo sistema imunológico, despertando um processo inflamatório exacerbado, e, em consequência, dano neural (46).

Estudos em tatus sugerem que o *M. leprae* é recolhido em vasos linfáticos epineurais e pode infectar os vasos sanguíneos do perineuro. A localização do endotélio vascular pode indicar uma via de entrada para *M. leprae* através da barreira hematoneural. Possivelmente o microrganismo é transportado dentro de macrófagos para o fascículo neural, um ambiente de acesso restrito para células do sistema imune em ausência de inflamação. Estudos *in vitro* identificaram moléculas envolvidas na interiorização e permanência do *M. leprae* nas células de Schwann como o receptor Toll-like-6 (TLR-6). As células de Schwann infectadas *in vitro* também são capazes de apresentar antígenos e servir como alvo das células T citotóxicas. A desmielinização dos neurônios pode ser induzida pelos níveis de citocinas pró-inflamatórias e mediadores imunológicos como Fator de necrose tumoral (TNF) e o óxido nítrico (NO), uma molécula efetora conhecida pela capacidade de matar *M. leprae*, que tem sido observada em infiltrados inflamatórios em lesões de nervo da hanseníase (47). Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que níveis elevados de TNF também estão associados a distúrbios de permeabilidade na barreira hematoneural (48).

A resposta imune do hospedeiro contra as micobactérias é mediada por células da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa. A imunidade adaptativa tem como uma função de grande importância coibir a multiplicação das micobactérias através de atividades efectoras como a secreção de citocinas e citotoxicidade contra células infectadas (49, 50). A capacidade de resposta do hospedeiro à hanseníase está relacionada com o espectro da doença. Indivíduos classificados como paucibacilares (TT e BT) apresentam uma resposta imune celular onde é observada a predominância de células que produzem citocinas tipo T_H1, o que não ocorre nos multibacilares (BL e LL) (49). Diversos estudos demonstram que o controle da infecção por *M. leprae* está baseado na resposta imune celular do tipo T_H1 (T helper 1). A produção de interleucina 12 (IL-12), induzida pelo patógeno no organismo infectado, é responsável pelo direcionamento da resposta imune tipo T_H1 (50). A imunidade do hospedeiro e a imunopatogenicidade em resposta a *M. leprae* envolvem interações complexas entre várias células que expressam diferentes moléculas efectoras e reguladoras. A avaliação de novos biomarcadores associados a esta resposta pode fornecer mais informações aproximadas do perfil imunológico do hospedeiro, e pode identificar padrões ainda não descritos na hanseníase (51).

As citocinas pró e anti-inflamatórias conferem proteção contra a patogênese das doenças micobacterianas. As ações destas moléculas podem impedir ou contribuir para um

determinado desfecho clínico. O *M. leprae* desempenha um papel ativo para controlar a resposta imune celular e liberação de citocinas a partir da ação monócitos, macrófagos e células dendríticas, fornecendo sinais reguladores positivos e negativos através de múltiplas vias de sinalização (51). O IFN- γ é uma citocina com papel fundamental na resposta imune contra patógenos intracelulares. Esta citocina é frequentemente utilizada como biomarcador em ensaios para detectar respostas ao *M. leprae* e ao *M. tuberculosis* (52).

O sequenciamento do genoma do *M. leprae* e de outras micobactérias patogênicas permitiu a seleção *in silico* de proteínas específicas do *M. leprae*. A análise destas estruturas *M. leprae*-específicas, através de algoritmos apropriados, identificou um grande número de regiões com potencial de associação a moléculas HLA de classe I e classe II. A partir desta análise foram obtidos peptídeos sintéticos específicos para o *M. leprae* com afinidade por HLA de classe I (nonâmeros) e de classe II (pentadecâmeros) (16, 50, 53). Estudos realizados em nosso laboratório com estes peptídeos demonstraram que eles são capazes de induzir resposta *in vitro* em leucócitos sanguíneos de pacientes com hanseníase, bem como de contatos domiciliares destes pacientes, permitindo inclusive, a discriminação entre indivíduos expostos e não-expostos ao patógeno (50, 53). A elucidação da imunopatogênese da HNP é crítica para o desenvolvimento de novas ferramentas para diagnóstico, e é de extrema importância para evitar que a doença evolua resultando em deficiência (54). Com base nesses dados, resolvemos então, investigar os níveis de citocinas induzidos por peptídeos sintéticos correspondentes a epítomos antigênicos expressos por *M. leprae*, em células mononucleares de sangue periférico, e em culturas de sangue não fracionado em pacientes com HNP e comparar com outras formas de hanseníase, outras neuropatias periféricas que podem levar a suspeita de HNP e grupo-controle saudável. Esta é uma etapa inicial para avaliação da resposta *in vitro* a antígenos do *M. leprae* como uma ferramenta de diagnóstico de HNP, especialmente para a exclusão da hipótese de hanseníase em pacientes com neuropatias periféricas.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Investigar se os níveis de citocinas induzidos por peptídeos sintéticos do *Mycobacterium leprae* podem ser uma ferramenta de diagnóstico de formas de hanseníase especialmente para a exclusão da hipótese de hanseníase em pacientes com neuropatias periféricas.

1.2 Específicos

- a) Avaliar a resposta imune humoral a antígenos do *M. leprae* em pacientes com hanseníase, portadores de neuropatias não hanseníacas e controles saudáveis;
- b) Analisar comparativamente os níveis de citocinas induzidos *in vitro* em ensaio com células mononucleares de sangue e também com sangue não-fracionado, como uma etapa inicial para desenvolvimento de teste diagnóstico;
- c) Avaliar níveis de citocinas produzidos *in vitro* por células de pacientes com HNP, específicas para o *M. leprae*;
- d) Comparar os níveis de resposta *in vitro* de pacientes com HNP a antígenos de *M. leprae* com outros grupos de pacientes com hanseníase e controles saudáveis, assim como em pacientes com outras neuropatias periféricas;

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Modelo experimental:

2.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo indivíduos sadios residentes do Rio de Janeiro ou outros municípios com baixa incidência de casos de hanseníase (de acordo com dados epidemiológicos atuais), com histórico conhecido de exposição persistente à hanseníase, recrutados através de contatos com a equipe de profissionais de saúde lotados no LAMICEL - Laboratório de Microbiologia Celular e ASA - Ambulatório Souza Araújo; pacientes com neuropatias periféricas que não sejam provenientes de hanseníase; pacientes diagnosticados com hanseníase neural pura através de biópsia de nervo e/ou através de PCR e pacientes com outras formas de hanseníase, com até de zero até 3 meses de tratamento com a poliquimioterapia (lepromatosa multibacilar e borderline-tuberculoide paucibacilar). O grupo amostral investigado incluiu homens e mulheres com idades entre 19 e 70 anos. Estes grupos foram avaliados no Ambulatório Souza Araújo da Fiocruz para caracterização de indivíduos com diferentes níveis de exposição ao *M. leprae* e com diferentes formas de hanseníase, conforme já descrito anteriormente (16, 53, 55). Os grupos e tamanhos amostrais iniciais foram planejados como se segue:

- a) Pacientes com neuropatias periféricas associadas a doenças não-infecciosas (diabetes mellitus, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, etc.) e sem história de exposição persistente à hanseníase; n=16;
- b) Pacientes com forma paucibacilares de hanseníase apresentando lesão de pele; n=7;
- c) Pacientes com formas multibacilares de hanseníase apresentando lesão de pele; n=6;
- d) Pacientes com hanseníase neural pura; n=19;
- e) Indivíduos saudáveis; n=9.

2.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do presente estudo indivíduos com idade inferior a 18 anos e superior a 70 anos; indivíduos sabidamente HIV positivos ou portadores de doenças infecciosas

crônicas ou agudas não relacionadas à hanseníase; portadores de doenças crônicas inflamatórias; indivíduos que fizeram uso de medicamentos imunossupressores ou corticosteroides (que usaram nos últimos três meses que antecederam a coleta do material analisado); gestantes; pacientes que apresentam quadro reacional da hanseníase.

2.2 Peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes

Martins e colaboradores (2012) mostraram que níveis de IFN γ em resposta a peptídeos sintéticos, correspondentes a epítomos antigênicos expressos pelo *M. leprae*, são capazes de distinguir diferentes níveis de exposição ao patógeno.

Tabela 1 - Relação dos peptídeos sintéticos *M. leprae*-específicos utilizados em ensaios *in vitro*, suas proteínas de origem e sequências de aminoácidos

Peptídeo	Gene	Sequência de aminoácidos
p51	ML1057	AAALEQLLGQTADVA
p52	ML1057	QLLGQTADV
p56	ML0308	FDEYRAMFALSAMD
p59	ML0398c	MLILGLLPAILPACG
p61	ML0398c	LILGLLPAI
p65	ML1419c	EAVLLRLDGTTLVE
p67	ML1419c	SGRVTYLNPVGVKWM
p68	ML1419c	LLEEGVIVL
p69	ML1419c	RLDGTTLVE
p70	ML1420	MQEYRGLTSHTPCCR
p71	ML1553	LDIYTTLARDMAAIP
p73	ML1829	DAEWLKLTSGLRPR

2.3 Isolamento e cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMS)

Foram coletados, por punção venosa, 20 mL de sangue em tubos heparinizados (BD vacutainer). Após a coleta o sangue foi diluído (1:2) em tampão fosfato salino (PBS - Gibco, EUA) 0,001M (salina tamponada fosfato, pH 7,4) e, centrifugado (centrífuga GS-6R BECKMAN), sobre 15 mL de ficol-hipaque (Invitrogen Life Technologies, EUA) a 2000 rpm por 30 minutos, em temperatura ambiente – para separação e obtenção do anel de células mononucleares. Ao término da primeira centrifugação, a interface contendo as CMS foi coletada, ressuspensa em PBS (contendo 1% de Soro Fetal Bovino SFB – Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e centrifugada novamente (1x 1200 rpm e 2x 1500 rpm, 4°C, 10 minutos). Após a última centrifugação as células foram ressuspensas em meio AIM-V (Gibco, EUA), suplementado com 2 mM de glutamax (Gibco, EUA). As CMS foram colocadas em cultura por 5 dias (2×10^5 células/poço, em duplicata), em microplacas de 96 poços com fundo em côncavo estéril (Corning, NY, EUA), a uma temperatura de 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (estufa Thermo scientific modelo: 3111), e estimuladas ou não com 1µg/mL de enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB - Sigma), 20 µg/mL de extrato da parede de *M. leprae* (*M. leprae* - WC sonicado batch #96 LBT 5.0 mg), 1 µg/mL de proteína recombinante de *M. leprae* ML1419c e 10 µg/mL de peptídeos sintéticos de *M. leprae* (P52, P61, P68, P69, P51, P56, P59, P65, P67, P70, P71, P73 - Peptide 2.0, Chantilly, VA, EUA). Após o término da cultura, os sobrenadantes (SN) foram coletados e armazenados a -20° C.

2.4 Cultura de sangue não-fracionado com peptídeos sintéticos *M. leprae*-específicos e estímulos-controle

O sangue não-fracionado e heparinizado (15 mL) foi distribuído em alíquotas de 1 mL/tubo (tubo de 5 mL, poliestireno, BD Falcon, ref. 352054). Após a adição dos estímulos: pool de peptídeos (10 µg/mL de cada peptídeo); SEB (1µg/mL); *M. leprae* (20 µg/mL); proteína recombinante do *M. leprae* (ML1419c 5µg/mL) as amostras foram incubadas a 37⁰C por 24 horas, e então, o plasma foi coletado, transferido para tubos eppendorfs de 0.6 mL e armazenado no freezer a -20°C.

2.5 Ensaio multiplex para quantificação de citocinas

Painel de 17 citocinas: IL-1 β ; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-10; IL-12 (70); IL-13; IL-17; O G-CSF; GM-CSF; IFN- γ ; MCP-1 (MCAF); MIP-1 β ; TNF. Culturas de células mononucleares e de sangue não-fracionado, estimuladas conforme descrito acima, foram mantidas por 5 dias e 24 horas respectivamente, para coleta de sobrenadantes e plasma, que foram estocados a -20°C para posterior dosagem de citocinas com metodologia multiplex, utilizando o kit Bio-Plex (BIO-RAD, EUA). A placa de foi preparada com a adição de *beads* (microesferas) magnéticas (50 μ L em cada poço da placa). As *beads* magnéticas foram lavadas com tampão de lavagem (100 μ L por poço) e colocadas as amostras, o padrão e o branco, com incubação por 60 minutos. Em seguida, as *beads* magnéticas foram lavadas e incubadas com o anticorpo de detecção (25 μ L / poço;30 minutos). Após esta incubação a placa foi lavada e estreptavidina foi adicionada (25 μ L em cada poço), e permaneceu por mais 30 minutos selada e protegida da luz à temperatura ambiente. As amostras foram ressuspensas em tampão de ensaio (100 μ L por poço), no qual permaneceram por 30 minutos, e foram então levadas para leitura. O ensaio foi realizado de acordo com as orientações do fabricante e com a placa e todos os reagentes inclusos no kit. A leitura foi feita em analisador multiplex Luminex (Biorad, Inc., EUA) com software xPONENT da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz.

2.6 Coleta e obtenção de soro

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos (Serum BD vacutainer) sem heparina, incubadas à temperatura ambiente e, então, processadas para obtenção do soro. O sangue foi centrifugado a 900 x g, sem freio, a 4°C durante 10 minutos. O soro obtido foi aliquotado e estocado a -20°C para posterior dosagem de anticorpos específicos por ensaio imunoenzimático (ELISA).

2.7 Quantificação de anticorpos IgM anti-PGL-I

O D-BSA (dissacarídeo albumina sérica bovina) foi adsorvido em microplacas de 96 poços, de fundo plano (Nunc) durante 24 horas. Após esse período, os poços foram lavados e então bloqueados com albumina sérica bovina (BSA) por 1 hora a 37°C. Os poços foram novamente lavados e os soros previamente diluídos foram adicionados à placa. Após nova lavagem, os poços foram incubados com anticorpo conjugado anti-IgM (100 µL, 1:5000; 1 hora, 37°C; Sigma). Após nova lavagem foi adicionada 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB - Sigma). A reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 2,5 N e a intensidade da coloração foi determinada através de leitura a 450 nm e 650 nm em leitor de microplacas (EON número de série 265484 Software versão 2.06.10 – BioTek).

2.8 Quantificação de anticorpos IgG anti-LID-1

A placas foram sensibilizadas com LID-1 diluído em tampão carbonato/bicarbonato (500ug/mL) 0,05 mM, pH 9.6, por no mínimo 18 horas à temperatura ambiente (100 µL por poço); após a incubação as placas foram lavadas (3 vezes com 200 µL) de tampão de lavagem com PBS a 0,3% de Tween 20 (PBS-T; Bio Rad). A seguir foram adicionados 200 µL / poço de tampão de bloqueio (PBS-T+1% de BSA – Sigma - USA) e realizada incubação à temperatura ambiente por 1 hora. Após esta etapa foi repetido o processo de lavagem e adicionadas as amostras diluídas (1:200) em PBS com 1% de BSA (50 µL /poço) e incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. A seguir foi repetida a lavagem e adicionados 50 µL/poço de streptoavidina (HRP goat anti-human IgG, Pierce) 1:100.000 diluído em BSA a 0,1% - Tampão de lavagem PBS-T a 0,3% + 1% de BSA) e incubar por 1 hora em temperatura ambiente. A lavagem foi repetida e foram adicionados 100 µL por poço de TMB (Sigma - 3,3',5,5', -tetrametilbenzidina). A reação foi interrompida 3 minutos após a adição do TMB, com 50 µL/ poço de ácido sulfúrico. A intensidade da coloração foi determinada através de leitura a 450 nm e 650 nm em leitor de microplacas (EON número de série 265484 Software versão 2.06.10 – BioTek). O valor de corte para a reação positiva foi determinado como densidade óptica de 0,3 ou seja, duas vezes o desvio padrão obtido nas amostras de soro de um indivíduo sadio de área endêmica (57).

2.9 Análise estatística

Foi utilizado o software GraphPad Prism 5. Para analisar as comparações estatísticas na produção de anticorpos anti-PGL-I e anti-LID-1, utilizou-se o teste bicaudal de Mann-Whitney e o teste *t de Student*. A significância foi definida como $p < 0,05$. Os demais dados foram analisados através do software Statistical Package for Social Sciences - SPSS versão 22. (IMB, 2013). P valores $\leq 0,05$ foram considerados como indicando diferenças significativas entre os grupos. A normalidade das variáveis foi investigada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Não foi possível aceitar a hipótese de que os dados tenham distribuição normal, portanto optou-se por utilizar testes não paramétricos. A comparação dos níveis das citocinas entre os grupos foi feita através do teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de comparações múltiplas. A avaliação clínica e demais variáveis qualitativas do estudo foram comparadas entre os grupos utilizando-se o teste de qui-quadrado. O nível de significância estabelecido foi de 5%. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para identificar um número mais reduzido de variáveis capaz de explicar a variabilidade original presente nos dados. Apesar da suposição de normalidade não ter sido atendida, o método apresenta certa robustez quando o tamanho de amostra é adequado e as variáveis são relacionadas entre si (58). A medida de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) verificou a adequação amostral para a análise PCA. Essa medida varia entre 0 e 1, onde quanto mais próximo a 1 maior a adequação amostral. A correlação entre as variáveis foi verificada pelo teste de Bartlett, indicando que a correlação foi significativa e suficiente para utilização do método. Foi utilizado o método de rotação ortogonal (VARIMAX).

2.10 Softwares para análise de dados em ensaios funcionais

Statistical Package for Social Sciences (SPSS). IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp. GraphPad Prism 5.01. A análise dos dados não-paramétricos foi realizada utilizando o teste U de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis como apropriado. P valores $\leq 0,05$ foram considerados como indicando diferenças significativas entre os grupos. GraphPad Prism 5.01.

3 RESULTADOS

3.1 Desenho amostral

Este trabalho foi realizado com a participação de 60 doadores voluntários distribuídos em cinco grupos classificados como; voluntários de área de baixa endemicidade (ABE); pacientes com neuropatias periféricas não hansenianas (NNH); pacientes diagnosticados com hanseníase neural pura (HNP); pacientes hansenianos paucibacilares (PB; HI, TT e BT); pacientes hansenianos multibacilares (MB; BL e LL) (tabela 1). Os pacientes com hanseníase, assim como os portadores de NNH foram avaliados e acompanhados no Ambulatório Souza Araújo (ASA) do laboratório de Hanseníase, IOC/FIOCRUZ. Os portadores de hanseníase foram diagnosticados conforme os critérios de Ridley e Jopling (18).

Tabela 2 – Características dos grupos investigados

Grupos	N	Idade		IB	PGL-I	LID-1	PCR	Mitsuda
		Idade [Média]	M/F [Razão]					
Controle saudável (área de baixa endemicidade)	N = 09	42,4	4/5	NA	11,1	22,2	NA	NA
Neuropatia não hanseniana	N = 15	50,2	10/6	0	12,5	12,5	0	12,5
Hanseníase neural pura	N = 19	46,6	5/12	0	31	20	64,7	11,8
Hanseníase Paucibacilar	N = 07	36,6	4/3	0	0,0	42,9	NA	42,9
Hanseníase Multibacilar	N = 06	55,8	4/2	2,34	100,0	100,0	NA	0,0
Recidiva	N = 04	42	1/3	2,25	50	25	NA	ND
Total	60	45,6	28/31	0,76	33,8	36,7	21,8	16,8

Legenda: Número de participantes de cada grupo (N); Controle saudável de área de baixa endemicidade (ABE); Neuropatias não hansenianas (NNH); Hanseníase neural pura (HNP); Hanseníase paucibacilar (PB); Hanseníase multibacilar (MB); Não avaliado (NA); Não disponível (ND). [n=60].

3.2 Ensaios sorológicos

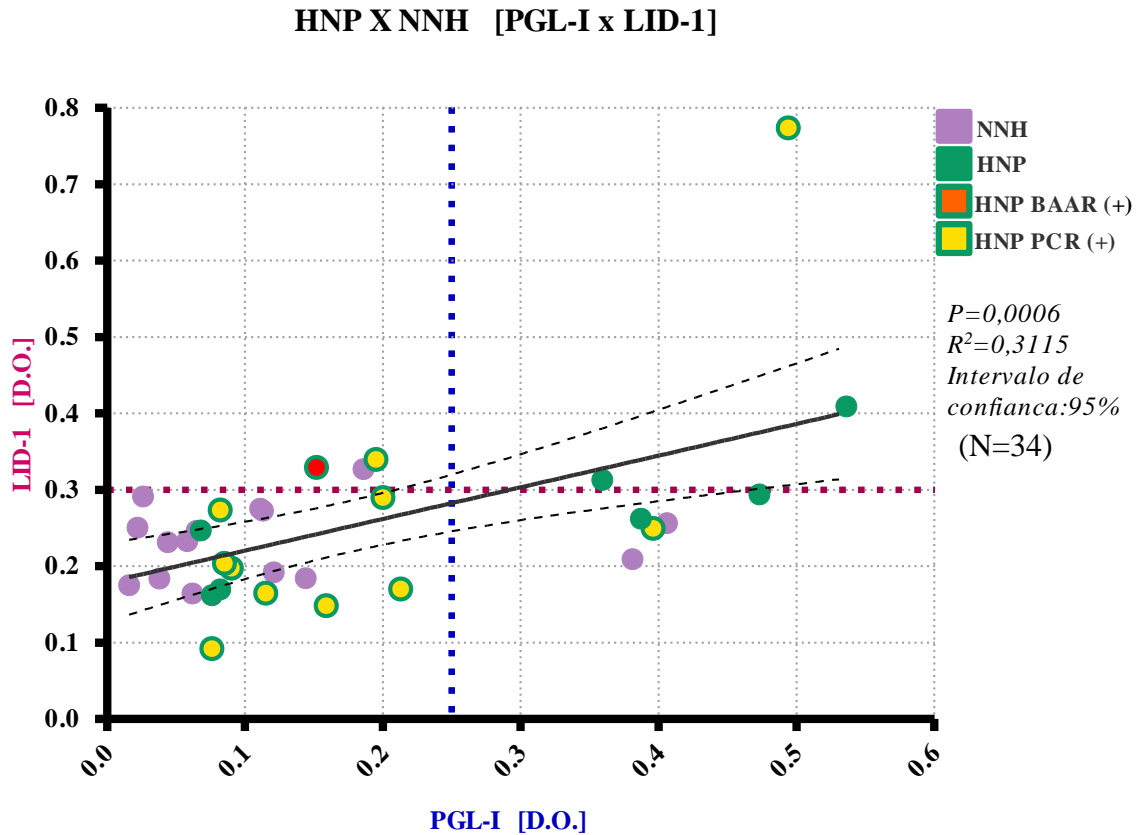
Foram realizados ensaios nas amostras dos doadores com o objetivo de identificar a positividade sérica para biomarcadores relevantes na hanseníase, como é o caso de IgM anti-PGL-I e IgG anti-LID-1. Quando avaliamos as respostas anti-PGL-I e anti-LID-1 nos grupos estudados, todos os indivíduos classificados como MB (n=6) foram positivos para ambos os marcadores, o que era esperado, entretanto todos os pacientes PB (n=7) foram negativos para PGL-I e 42,9% foram positivos para LID-1. O grupo HNP se mostrou bastante heterogêneo, com 27,8% positivos para PGL-I e 22,2% para LID-1 e 11,1% positivos para ambos os marcadores. Foram observados um doador positivo para PGL-I e dois positivos para LID-1 no grupo ABE (tabela 3).

Tabela 3 – Proporção de indivíduos positivos para anticorpos anti-PGL-I e anti-LID-1

Grupos	PGL-I	LID-1	PGL-I e LID-1 (Doadores positivos para ambos os marcadores)
ABE	1/9	2/9	0/9
NNH	2/15	1/15	0/15
HNP	6/19	5/19	2/19
PB	0/7	3/7	0/7
MB	6/6	6/6	6/6
RC	2/4	1/4	1/4
Total	17/60	18/60	9/60

Legenda: Número de indivíduos positivos para anticorpos anti-PGL-I e anti-LID-1. Análise qualitativa da produção de anticorpos IgM anti-PGL-I e IgG anti LID-1 específicos para *M. leprae* nas amostras de soro dos doadores. Controle saudável de área de baixa endemicidade (ABE); neuropatias não hansênicas (NNH); hanseníase neural pura (HNP); hanseníase paucibacilar (PB); hanseníase multibacilar (MB); recidiva de hanseníase ou investigação para recidiva (RC). [n=60].

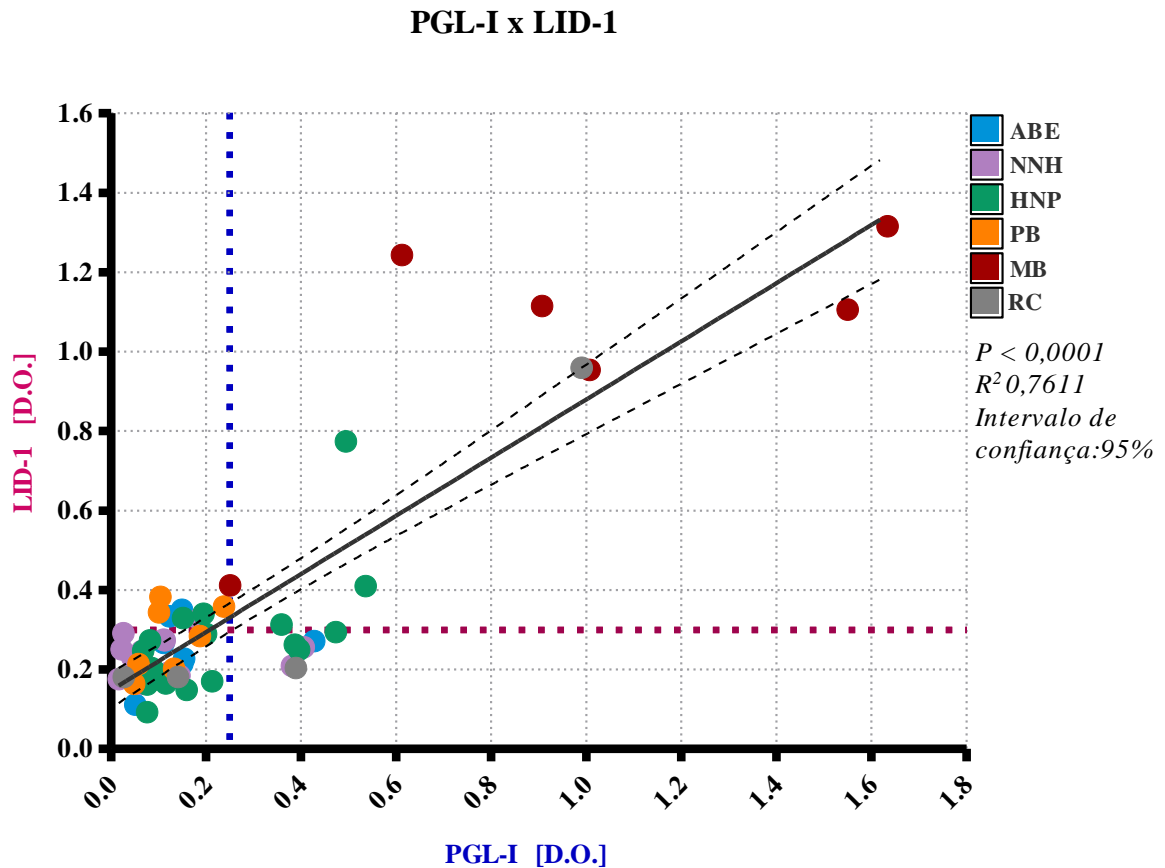
Figura 2 - Anticorpos anti-PGL-I versus anti-LID-1 no soro de pacientes com HNP ou NNH



Legenda: Foi realizado ELISA para quantificação de anticorpos IgM anti-PGL-I e IgG anti-LID-1 em soros de pacientes do grupo HNP (n=34; diluição do soro de 1:200). No eixo x níveis de IgM anti-PGL-I expressos em valores de densidade ótica (DO). A leitura foi realizada em 450nm e 650nm. A linha tracejada azul indica o ponto de corte. No eixo dos y resultados para LID-1 a linha tracejada vermelha indica o ponto de corte. O valor de corte foi determinado a partir de duas vezes os desvios padrão das amostras negativas de área endêmica para hanseníase (PGL-I=0,25 e LID-1= 0,30).

Assim como no grupo NNH, a maioria dos componentes do grupo HNP foi negativo para anti-PGL-I e anti-LID-1, contudo três integrantes deste grupo foram positivos para anticorpos anti-PGL-I e anti-LID-1, e em um deles foi detectado DNA de *M. leprae* na amostra de nervo. Três pacientes foram positivos apenas para anti-PGL-I, um deles também com PCR positivo para DNA de *M. leprae*, e dois deles foram positivos para LID-1, em ambos foi observada a presença do DNA do bacilo no nervo, e em um deles foi observado bacilo na amostra de nervo em corte histológico corado para bacilos álcool-ácido-resistentes. No grupo NNH, dois integrantes apresentaram anticorpos anti-PGL-I e um anti-LID-1, (figura 2). No grupo NNH não foi observado paciente positivo para os dois marcadores simultaneamente (figura 3).

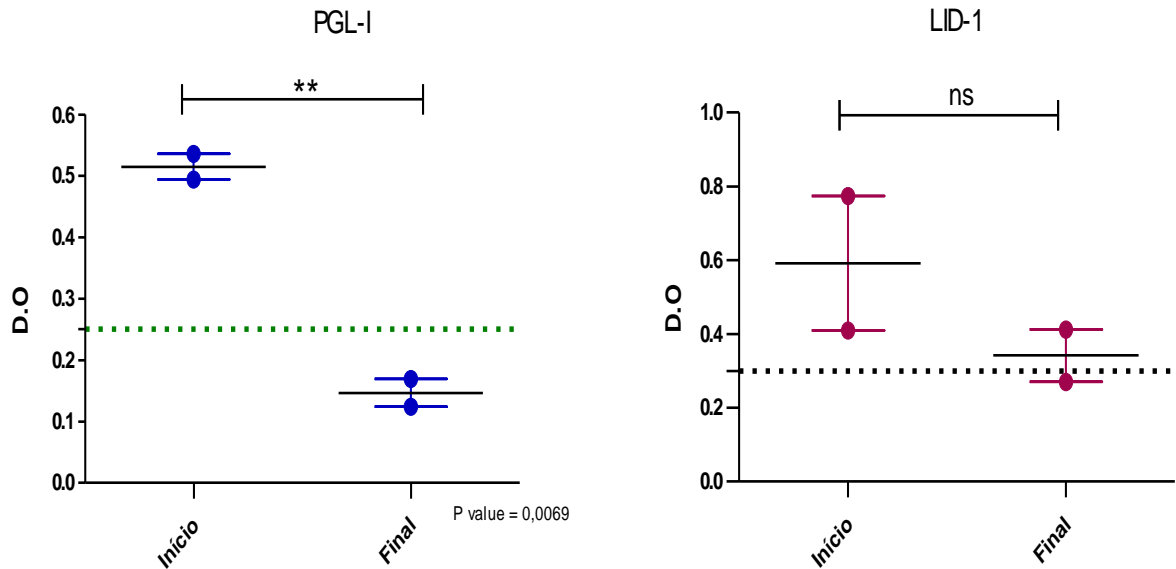
Figura 3 - Produção de anticorpos anti-PGL-I versus anti-LID-1



Legenda: Foi realizado ELISA para quantificação de anticorpos IgM anti-PGL-I e IgG anti-LID-1 nos soros dos doadores participantes (n=60; diluição do soro de 1:200). No eixo x níveis de IgM anti-PGL-I expressos em valores de densidade ótica (DO). A leitura foi realizada em 450nm e 650nm. A linha tracejada azul indica o ponto de corte. No eixo y resultados para LID-1 a linha tracejada vermelha indica o ponto de corte. O valor de corte foi determinado a partir de duas vezes os desvios padrão das amostras negativas de área endêmica para hanseníase (PGL-I=0,25 e LID-1= 0,30).

As amostras de dois pacientes HNP, que foram positivos para anti-PGL-I e anti-LID-1, foram colhidas antes e após o término do tratamento para hanseníase, e daí foi possível analisar o impacto da redução da carga bacilar pela poliquimioterapia na resposta humoral a PGL-I e LID-1 em pacientes com HNP. Houve uma redução consistente nos níveis de anticorpos IgM anti-PGL-I após o término do tratamento com a PQT, o mesmo aconteceu com os níveis de IgG anti-LID-1 (figura 4).

Figura 4 - Análise da quantificação de anticorpos IgM e IgG em amostras de pacientes HNP coletadas antes e após o término do tratamento



Legenda: Ensaio por ELISA a partir de amostras de soro dos pacientes (n=2). A linha tracejada indica o ponto de corte para cada marcador. O valor de corte foi determinado a partir de duas vezes os desvios padrão das amostras negativas de área endêmica para hanseníase (PGL-I=0,25 e LID-1= 0,30). Teste t de Student não pareado [PGL-I: R=0,9862 e P=0,0069; LID-1: R=0,4516 e P=0,3280].

3.3 Quantificação de citocinas

A proteína recombinante de *M. leprae* ML1419c induz uma forte resposta citotóxica em células T CD8⁺. Estudos realizados com peptídeos derivados da proteína mostraram produção significativa de IFN- γ por células T CD8⁺ em 90% de pacientes PB e em 80% dos contatos dos pacientes MB, demonstrando a indução de imunidade de células T CD8⁺ específica para *M. leprae*. Estas respostas são induzidas pela proteína ou por peptídeos correspondentes a epítomos da proteína selecionados por potencial de associação com MHC, e que são capazes de inibir o crescimento de micobactérias (49).

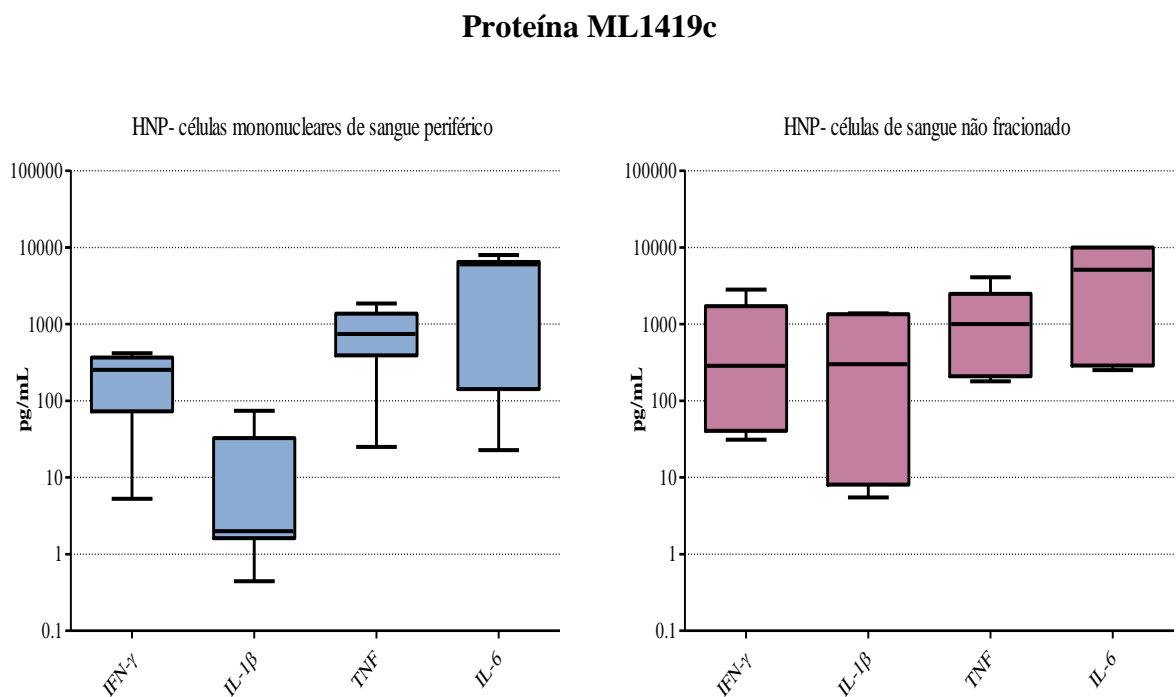
Para compreender o padrão de resposta imune dos pacientes com HNP realizamos a quantificação de citocinas em plasma de culturas de células de sangue não fracionado (24 horas) e sobrenadante de culturas de CMS (5 dias) estimulados com a proteína ML1419c, pool de peptídeos restritos por MHC de Classes I e II, contendo 12 peptídeos específicos do *M. leprae*, enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* – SEB (superantígeno) como controle

positivo e controle não estimulado (controle negativo). Os níveis de citocinas em resposta aos estímulos utilizados foram analisados com sistema multiplex para detecção de um painel de 17 citocinas.

A maioria dos indivíduos possui um valor basal para cada citocina. Para normalizar estes valores obtidos nos ensaios, os valores dos poços não estimulados foram subtraídos dos resultados estimulados com antígenos. Aos valores negativos foram atribuídos valores inferiores ao ponto mais baixo da curva, e o valor máximo detectável foi atribuído para valores acima do limite superior de detecção de cada citocina.

O ensaio Multiplex permitiu testar uma variação de citocinas na mesma amostra de plasma, 13 de um painel de 17 citocinas testadas. Citocinas relacionadas ao perfil T_H2 (IL-4, IL-5, IL-7, IL-13) não foram detectadas nos grupos analisados. Apesar da IL-10 ter sido induzida em níveis elevados, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados.

Figura 5 – HNP células mononucleares de sangue periférico e células de sangue não-fracionado



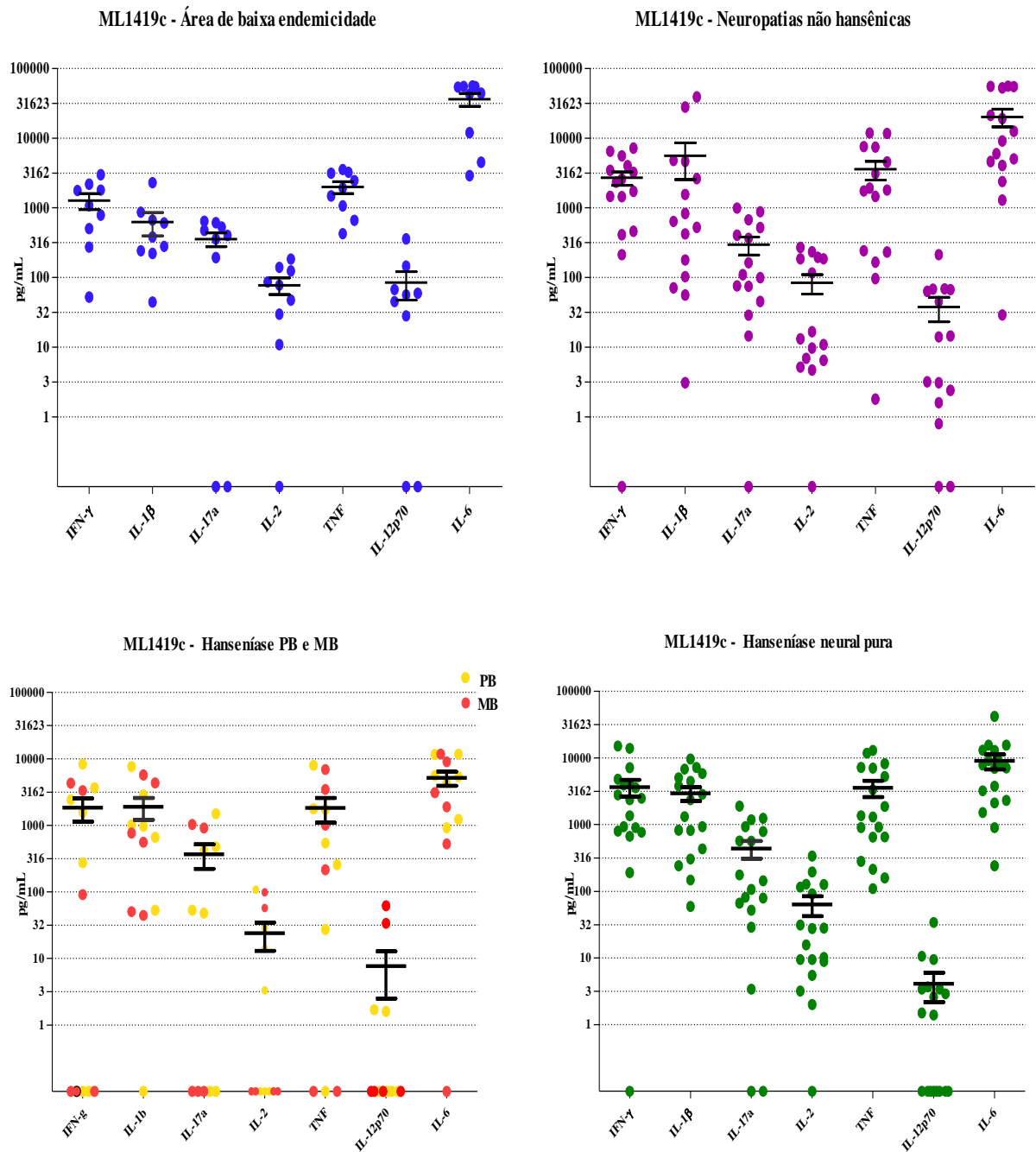
Legenda: A proteína ML1419c do *M. leprae* induz produção das citocinas IFN- γ , IL-1 β , IL-17A, TNF e IL-6 em culturas de CMS e em culturas de leucócitos sanguíneos de pacientes com Hanseníase neural pura. Os níveis de citocinas foram determinados por ensaio multiplex em sobrenadantes de cultura de 5 dias e em plasma de culturas de 24 horas estimuladas com a proteína ML1419c nas concentrações de 1 μ g/1 mL e 5 μ g/1 mL. Valores em pg/mL (n=06).

Para investigar a capacidade dos componentes dos diferentes grupos de produzir citocinas em culturas de sangue não fracionado (24 horas), foi utilizado 1 mL de sangue heparinizado em tubos estéreis, estimulados como descrito acima, e as respostas em plasmas oriundos dessas culturas foram analisadas. Os ensaios mostraram que o grupo HNP é capaz de produzir citocinas pró-inflamatórias nas amostras de sangue não fracionado, em concentrações um pouco mais elevadas do que as observadas em culturas de CMS, em resposta à proteína ML1419c (figura 5).

Passamos então, a observar se havia uma alteração na produção de citocinas pró-inflamatórias capaz de diferenciar indivíduos saudáveis com baixa exposição ao *M. leprae* (ABE) de indivíduos com neuropatias não hansênicas (NNH), e diferenciar estes dois grupos iniciais de pacientes com hanseníase neural pura (HNP), e finalmente estes grupos iniciais de pacientes com formas paucibacilares (PB) e multibacilares de hanseníase. Assim, poderemos detectar respostas comuns a indivíduos com neuropatias inflamatórias, aspectos relacionados mais especificamente com HNP ou com formas de hanseníase que incluem lesões de pele (Figura 6 e quadro 1).

Figura 6 - Níveis de citocinas em culturas de sangue não fracionado estimuladas com a proteína ML1419c do *M. leprae*

Níveis de citocinas em culturas de sangue não fracionado estimuladas com a proteína ML1419c do *M. leprae* nos grupos estudados



Legenda: Culturas de leucócitos sanguíneos de voluntários de áreas de baixa endemicidade para hanseníase (ABE), neuropatias não hansênicas; hanseníase paucibacilar e multibacilar e hanseníase neural pura. Concentração de ML1419c de 5 μ mL. Valores apresentados em pg/mL. Os níveis de citocinas foram determinados por método multiplex. (n=55).

Os níveis de citocinas, principalmente IL-6 e IL-12p70 induzidos pela proteína ML1419c em sangue de pacientes com formas PB e MB de hanseníase (figura 6) foram um pouco menores do que os do grupo saudável de área endêmica, entretanto avaliando a produção de IL-1 β e IFN- γ nos indivíduos do grupo ABE foi observado que estes produziram níveis menores que os demais grupos estudados. Os níveis de IL-17a, IL-2 e TNF foram equivalentes a todos os grupos (figura 6).

Essa diferença pode estar relacionada a mecanismos de regulação negativa progressiva da resposta imune celular a antígenos do *M. leprae* com a evolução da infecção assintomática pelo *M. leprae* para hanseníase. Esses dados ampliam os resultados obtidos por Martins e cols., sugerindo que os níveis de IFN- γ em resposta ao *M. leprae* caem quando há exposição persistente ao bacilo

Para avaliar o papel de biomarcadores associados à inflamação em pele e nervos periféricos, a comparação dos níveis das citocinas e quimiocinas produzidos pelos diferentes grupos, sem lesão, e com lesões de nervos periféricos e pele foi feita através do teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparações múltiplas. O quadro 1 mostra a citocina produzida, o estímulo usado, e as amostras 1 e 2 são os grupos comparados. Para todas as citocinas e quimiocinas apresentadas neste quadro foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos comparados.

Quadro 1 - Mostra a citocina produzida, o estímulo usado para indução de resposta, e as amostras 1 e 2 são os grupos comparados

Comparação entre grupos para cada citocina e quimiocina induzida pelo respectivo estímulo

Un.	Citocina	Estímulo	Amostra 1		Amostra 2
1	MCP-1	SEB	NNH	X	HANS
2			ABE	X	HANS
3			MB/PB	X	ABE/NNH
4			PB	X	NNH
5			PB	X	ABE
6	MCP-1	ML1419c	ABE/NNH	X	HANS
7			ABE	X	HANS
8			ABE/NNH	X	HNP
9			MB	X	ABE
10			HNP	X	ABE
11	MCP-1	POOL	NNH	X	HANS

12			ABE	X	HANS
13			MB/PB	X	ABE/NNH
14			HNP	X	ABE/NNH
15			MB	X	ABE
16			PB	X	ABE
17			HNP	X	ABE
18	MIP-1 β	SEB	ABE/NNH	X	HANS
19			ABE	X	HANS
20			MB/PB	X	ABE/NNH
21			PB	X	ABE
22	MIP-1 β	ML1419c	ABE/NNH	X	HANS
23			ABE	X	HANS
24	MIP-1 β	POOL	NNH	X	HANS
25			ABE	X	HANS
26			MB/PB	X	ABE/NNH
27			HNP	X	ABE/NNH
28			PB	X	NNH
29			PB	X	ABE
30			MB	X	ABE
31	HNP	X	ABE		
32	IL-8	SEB	ABE	X	HANS
33			HNP	X	ABE/NNH
34			PB	X	NNH
35			PB	X	ABE
36			HNP	X	ABE
37	IL-8	ML1419c	ABE/NNH	X	HANS
38			ABE	X	HANS
39	IL-8	POOL	NNH	X	HANS
40			ABE	X	NNH
41			HNP	X	ABE/NNH
42			MB	X	ABE
43			PB	X	ABE
44			HNP	X	ABE
45	IFN- γ	SEB	ABE/NNH	X	HANS
46			ABE	X	HANS
47			ABE	X	PB
48			ABE	X	HNP
49	IL-17a	POOL	ABE/NNH	X	HANS
50			ABE	X	HANS
51			MB/PB	X	ABE/NNH
52			PB	X	ABE
53	IL-2	SEB	ABE	X	HANS
54			MB/PB	X	ABE/NNH
55			HNP	X	ABE/NNH

56			PB	X	ABE
57			HNP	X	ABE
58	IL-2	ML1419c	ABE/NNH	X	HANS
59			MB/PB	X	ABE/NNH
60	IL-2	POOL	ABE	X	HANS
61			MB/PB	X	ABE/NNH
62			PB	X	ABE
63			MB	X	ABE
64	TNF	SEB	ABE	X	HANS
65			PB	X	ABE
66			HNP	X	ABE
67	TNF	POOL	ABE/NNH	X	HANS
68			ABE	X	HANS
69	IL12p70	SEB	NNH	X	HANS
70			ABE	X	HANS
71			PB	X	ABE
72			PB	X	NNH
73			HNP	X	ABE
74			HNP	X	NNH
75	IL12p70	ML1419c	NNH	X	HANS
76			ABE	X	HANS
77			HNP	X	ABE/NNH
78			PB	X	NNH
79			PB	X	ABE
80	IL12p70	POOL	NNH	X	HANS
81			ABE	X	HANS
82			PB	X	ABE
83			MB	X	ABE
84			HNP	X	ABE
85	IL-6	SEB	ABE	X	HANS
86			MB/PB	X	ABE/NNH
87			PB	X	ABE
88	IL-6	ML1419c	ABE/NNH	X	HANS
89			ABE	X	HANS
90			MB/PB	X	ABE/NNH
91			MB	X	ABE
92	IL-6	POOL	NNH	X	HANS
93			ABE	X	HANS
94			MB/PB	X	ABE/NNH
95			MB	X	ABE
96			PB	X	ABE

97			NNH	X	HANS
98			ABE	X	HANS
99			HNP	X	ABE/NNH
100	G-CSF	SEB	MB	X	NNH
101			MB	X	ABE
102			PB	X	NNH
103			PB	X	ABE
104			NNH	X	HANS
105	G-CSF	ML1419c	MB/PB	X	HNP
106			MB	X	HNP
107			MB	X	NNH
108			NNH	X	HANS
109	G-CSF	POOL	ABE	X	HANS
110			MB/PB	X	ABE/NNH
111			MB	X	ABE
112			ABE/NNH	X	HANS
113	GM-CSF	POOL	MB	X	ABE/NNH
114			MB	X	HNP

Legenda: Estímulos: SEB (Enteroxina B de *staphylococcus aureus*), proteína recombinante do *M. leprae* ML1419c e POOL de peptídeos *M. leprae*-específicos (P52, P61, P68, P69, P51, P56, P59, P65, P67, P70, P71, P73). Controles saudáveis de área de baixa endemicidade (ABE); Neuropatias não hansênicas (NNH); Hanseníase neural pura (HNP); Hanseníase paucibacilar (PB); Hanseníase multibacilar (MB). [n=55]. Para todas as citocinas apresentadas neste quadro foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre os grupos apresentados. (Teste Kruskal-Wallis para amostras independentes; todas as diferenças entre grupos são significativas com valores em um nível pelo menos de $p < 0,05$).

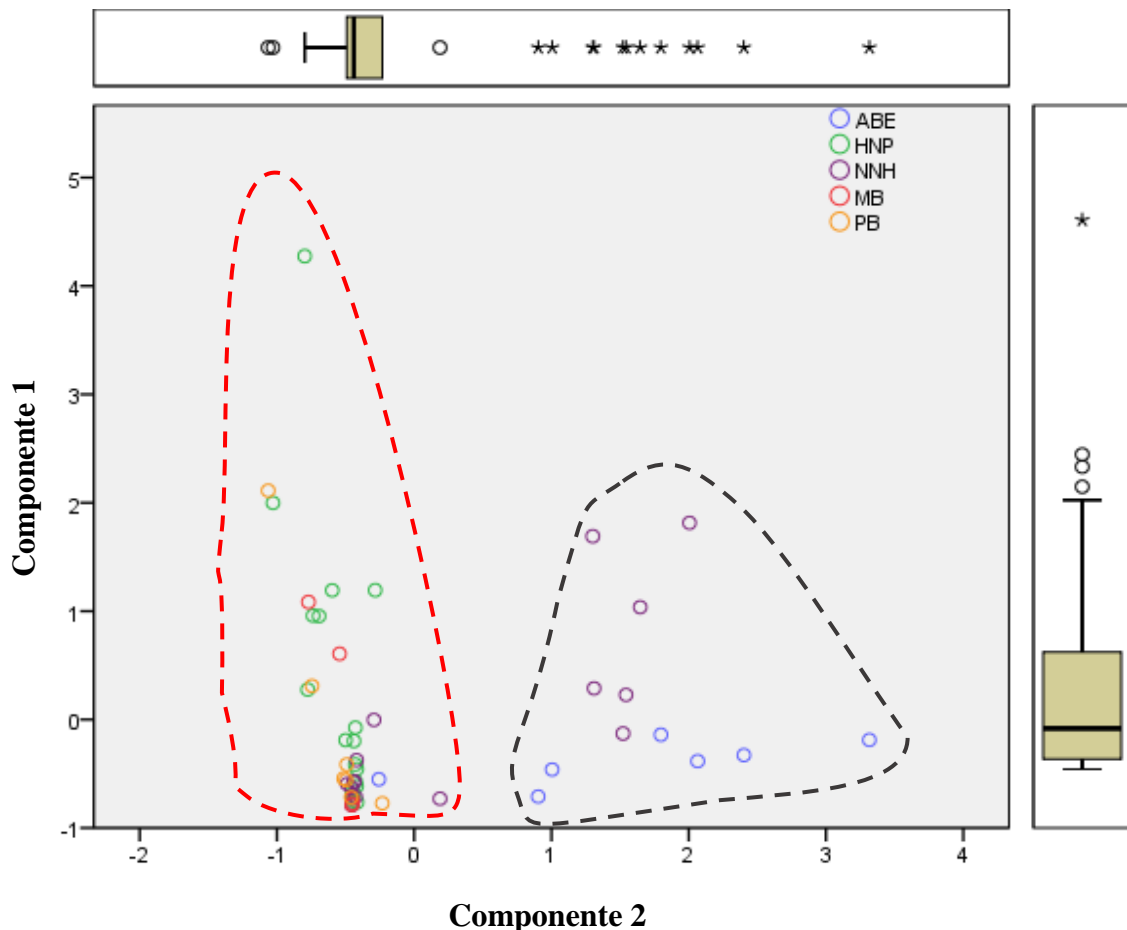
As quimiocinas IL-8, Proteína quimiotática de macrófago -1 (MCP-1) e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 1 β foram induzidas em níveis elevados e diferenças significativas foram observadas quando os grupos foram comparados entre si e com o grupo controle saudável (ABE). MIP- 1 β foi a quimiocina que apresentou maior número de diferenças significativas entre grupos, seguida de MCP-1.

Os resultados obtidos a partir das análises comparativas dos biomarcadores produzidos mostraram diferenças significativas entre os grupos, na presença dos diferentes estímulos. Ficou clara a necessidade de se utilizar uma metodologia capaz de resumir e esclarecer melhor se esses pontos seriam úteis para diferenciar os grupos de acordo com infecção, tipo de doença e forma clínica de hanseníase. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para reduzir a dimensionalidade dos dados obtidos com metodologia multiplex para detecção de citocinas, e para tentar identificar padrões de resposta associados a neuropatias inflamatórias não infecciosas e às diferentes formas de hanseníase. Foram realizadas PCAs de

respostas *in vitro* a dois tipos de estímulos, a proteína recombinante de *M. leprae* ML1419c, e um pool de peptídeos sintéticos *M. leprae*-específicos reconhecidos com restrição por HLA de classe I ou II (PCL).

Na resposta à proteína ML1419c a PCA permitiu a identificação de dois componentes principais responsáveis pela variação de respostas entre os grupos. O primeiro componente é formado por IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-17a, IL-2, TNF, GM-CS e G-CSF e explica 47,7% da variação total, o segundo componente é definido por MCP-1, MIP-1 β , IL-12p70, IL-6 e IL-8 e explica 25,4% da variação. Esses componentes explicam 73,1% da variação total observada por PCA nos níveis de biomarcadores induzidos por ML1419c (Fig. 7).

Figura 7 - PCA - Proteína recombinante ML1419c

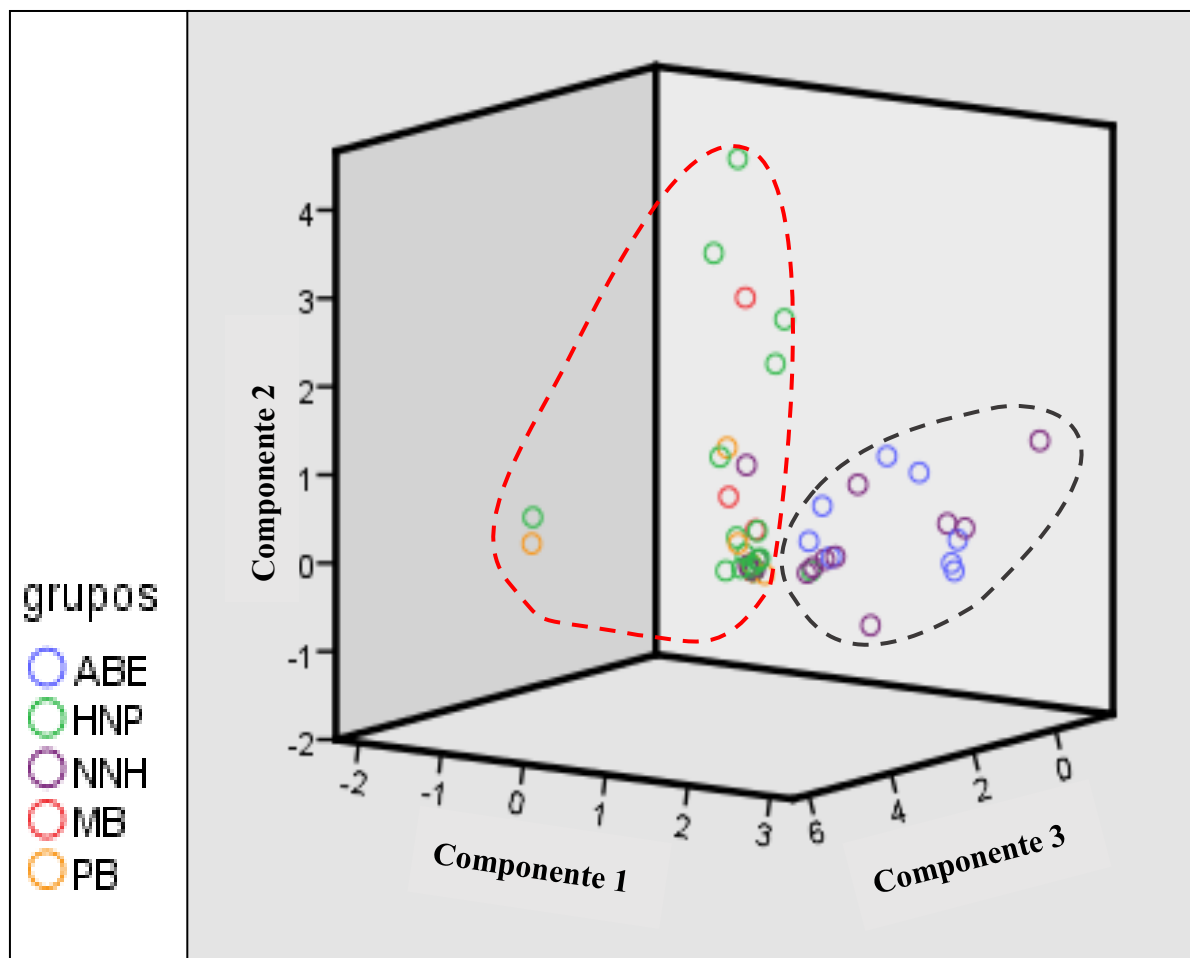


Legenda: Parcela do componente em espaço rotacionado. Análise de componentes principais das citocinas produzidas após estímulo com a proteína recombinante de *M. leprae* ML1419c. Grupos: ABE - controle saudável (círculos azuis); NNH - Neuropatia não hansênica (círculos magentas) HNP - Hanseníase neural pura (círculos verdes), PB - Hanseníase paucibacilar (círculos laranja), MB - Hanseníase multibacilar (círculos vermelhos), n=55. Foi utilizado o método de rotação ortogonal (VARIMAX). A medida de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) verificou a adequação amostral para à análise PCA. Essa medida varia entre 0 e 1, onde valores próximos a 1 representam maior adequação amostral. A correlação entre as variáveis foi verificada pelo teste de Bartlett, indicando que a correlação foi significativa. (n=55).

Na PCA das respostas ao pool de peptídeos sintéticos *M. leprae*-específicos, foram identificados três componentes. O primeiro componente (fator 1) é formado por MIP-1 β , MCP-1, IL-8, IL-12p70 e IL-6 e explica 53,6% da variação total, o segundo componente (fator 2) é definido por IFN- γ , IL-10, IL-17a, e GM-CSF e corresponde a 18% da variação observada, o terceiro componente é formado por IL-1 β , TNF e G-CSF e está relacionado a 8,6% da variação. Esses componentes explicam 80,2% da variação total observada.

As figuras 7 e 8 mostram as representações gráficas da análise. As amostras correspondentes a cada grupo estão representadas pelos círculos e cores. Foi observado que os símbolos relacionados aos controles (ABE e NNH) foram posicionados no canto inferior proximal ao eixo dos x, indicando uma distribuição linear, enquanto os grupos relacionados à doença, compostos por HNP, BP e MB foram distribuídos verticalmente acompanhando o eixo dos y. Houve uma separação clara na disposição dos grupos e não foram observados símbolos relacionados ao grupo com hanseníase entre os grupos controle na resposta a ML1419c (Fig 7).

Figura 8 - PCA – Pool de peptídeos *M. leprae*-específicos Classe I e II

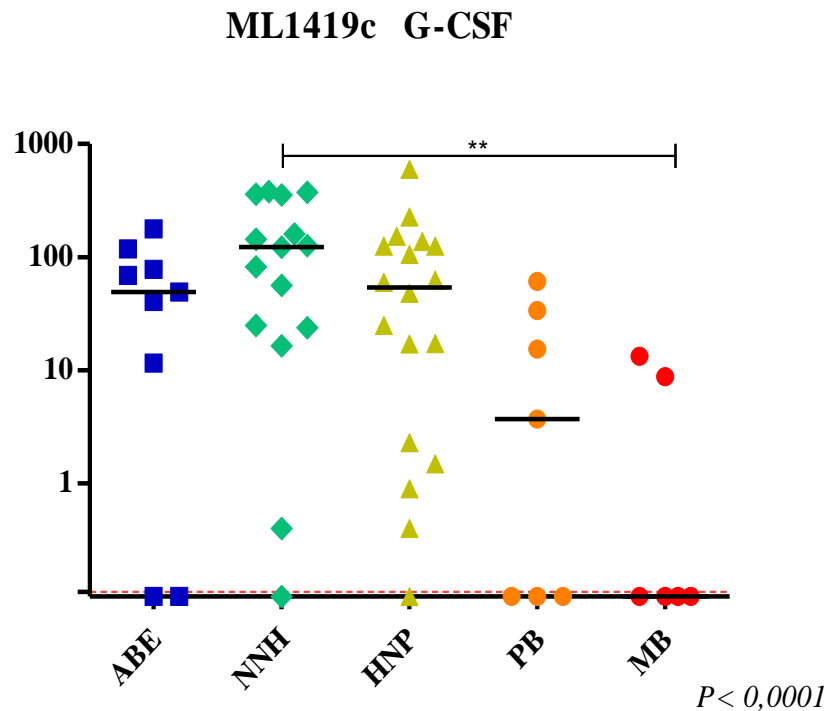


Legenda: PCA – Pool de peptídeos sintéticos *M. leprae*-específicos. Parcela do componente em espaço rotacionado Análise de componentes principais das citocinas produzidas em resposta a pool de peptídeos sintéticos *M. leprae*-específicos. Grupos: ABE- controle saudável (círculos azuis); NNH – Neuropatia não hansênica (círculos magentas) HNP – Hanseníase neural pura (círculos verdes), PB – Hanseníase paucibacilar (círculos laranja), MB – Hanseníase multibacilar (círculos vermelhos), n=55. A seta verde mostra um paciente com HNP no limite entre a área com predomínio do grupo ABE (tracejado negro) e a área com predomínio de pacientes com Hanseníase e NNH (tracejado vermelho). Foi utilizado o método de rotação ortogonal (VARIMAX). A medida de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) verificou a adequação amostral para PCA. Essa medida varia entre 0 e 1, e valores mais próximos de 1 representam maior adequação amostral. A correlação entre as variáveis foi verificada pelo teste de Bartlett, indicando que a correlação foi significativa.

As amostras estimuladas com os peptídeos apresentaram um perfil semelhante de distribuição, com apenas um paciente com HNP se localizando em área de amplo predomínio de ABE e NNH (Fig. 8).

No componente 1 das respostas a ML1419c, apenas o G-CSF mostrou significância estatística na análise comparativa entre os grupos NNH e MB (figura 9).

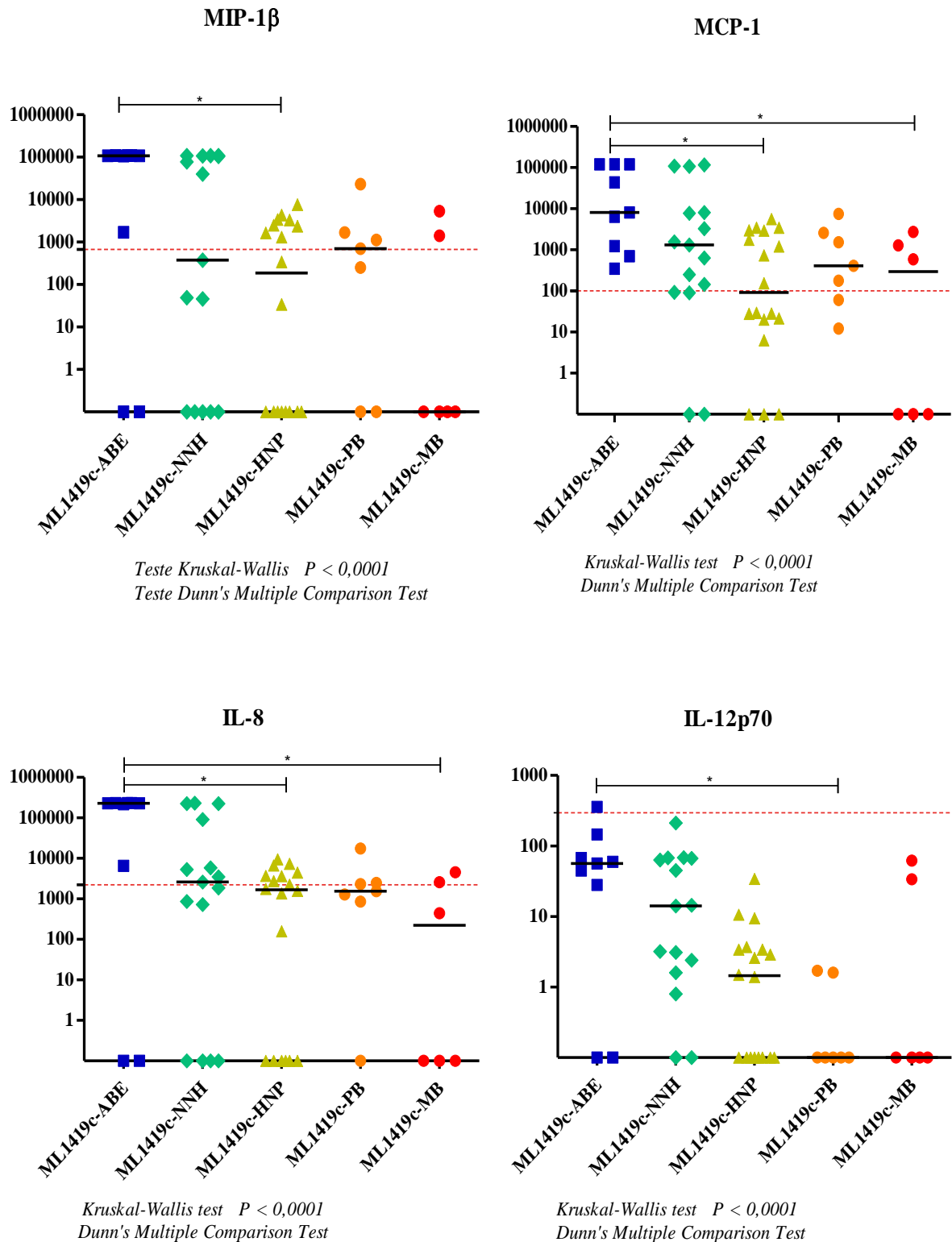
Figura 9 - PCA do componente 1 da ML1419c. Análise comparativa de G-CSF entre grupos



Legenda: Os níveis de citocinas foram determinados por ensaio multiplex em plasmas de cultura de 24 horas de sangue não fracionado, após estímulo com a ML1419c na concentração de 5 µg/1 mL. (ABE – controle saudável; NNH– neuropatia não hansênica; HNP – hansêníase neural pura; PB – hansêníase paucibacilar; MB – hansêníase multibacilar). Resultados expressos em pg/mL (n=55). [Mediana].

No componente 2 da resposta a ML1419c foram observadas 4 citocinas (MIP-1, MCP1, IL-8 e IL-12p70) capazes de diferenciar os grupos ABE e HNP; ABE e MB; ABE e PB. Três quimiocinas se mostraram capazes de diferenciar o grupo ABE do grupo HNP (figura 10), sugerindo um possível potencial como biomarcador quando analisados em conjunto, uma vez que já foi observado a presença de MCP-1 e outros marcadores envolvidos na lesão neural (46). Contudo são necessários estudos que esclarecem o papel das quimiocinas e fatores de crescimento na forma neural pura de hansêníase.

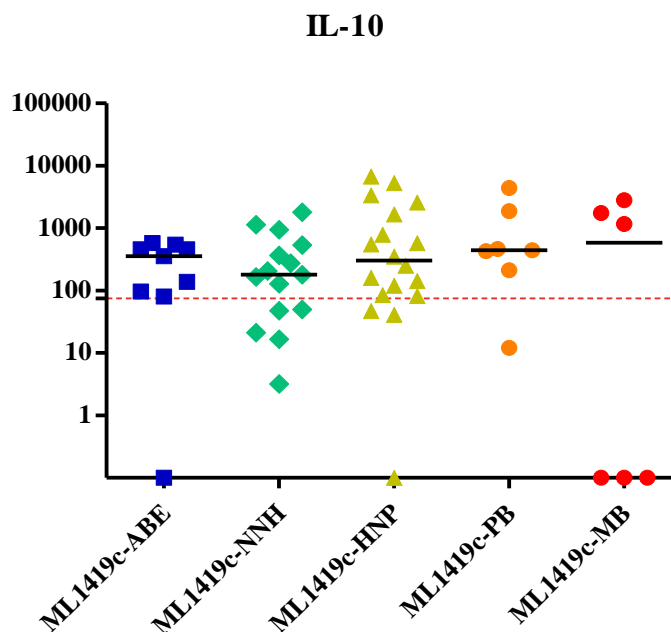
Figura 10 - PCA- componente 2 ML1419c análise comparativa



Legenda: Análise comparativa de MIP-1 β , MCP-1, IL-8 e IL-12p70 entre grupos. PCA do componente 2 da ML1419c. Os níveis de citocinas foram determinados por ensaio multiplex em plasmas de culturas de 24 horas de sangue não fracionado, estimuladas com ML1419c na concentração de 5 $\mu\text{g}/1 \text{ mL}$.

(ABE – controle saudável; NNH– neuropatia não hansênica; HNP – hanseníase neural pura; PB – hanseníase paucibacilar; MB – hanseníase multibacilar). Resultados expressos em pg/mL (n=55). A linha tracejada vermelha indica o ponto de corte correspondente ao dobro do desvio padrão das amostras não estimuladas (controle negativo).[Mediana].

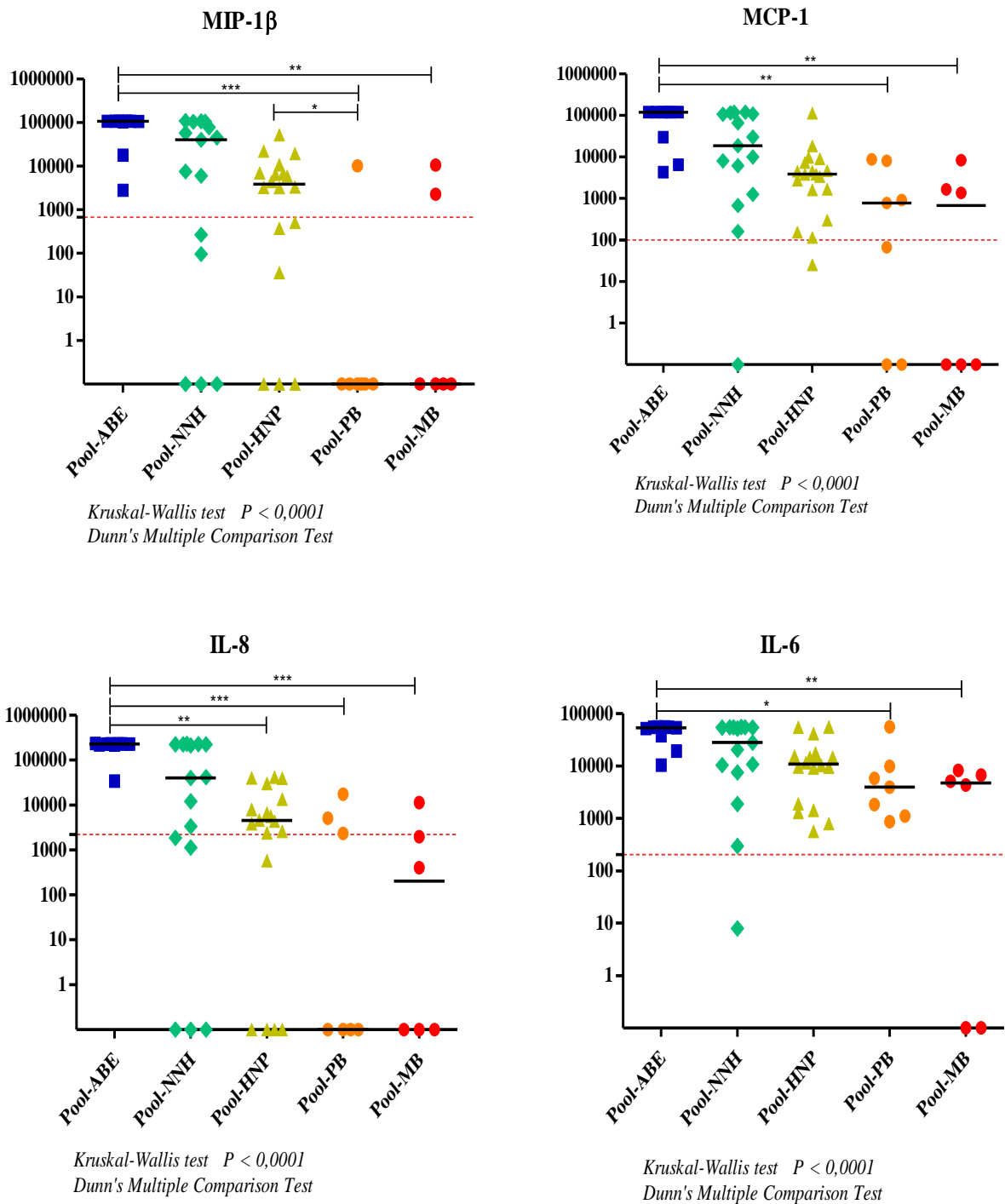
Figura 11 - PCA- componente 2 ML1419c análise comparativa de IL-10



Legenda: Análise comparativa de IL-10 entre grupos. Os níveis de citocinas foram determinados por ensaio multiplex em plasmas de cultura de 24 horas de sangue não fracionado, após estímulo com a ML1419c na concentração de 5 µg/1 mL. (ABE – controle saudável; NNH– neuropatia não hansênica; HNP – hanseníase neural pura; PB – hanseníase paucibacilar; MB – hanseníase multibacilar). Resultados expressos em pg/mL (n=55). [Mediana].

A ML1419c induziu respostas em pacientes com hanseníase e grupos-controle sem neuropatia e com NNH. A avaliação simultânea de um grupo de biomarcadores mostrou potencial para diferenciar os grupos analisados. Porém, os grupos sem hanseníase também são de área endêmica e respondem a antígenos de *M. leprae*. Na análise de componentes principais, realizada a partir das amostras estimuladas com o pool de peptídeos sintéticos *M. leprae*-específicos, foram observados três componentes que explicavam a variação das respostas obtidas.

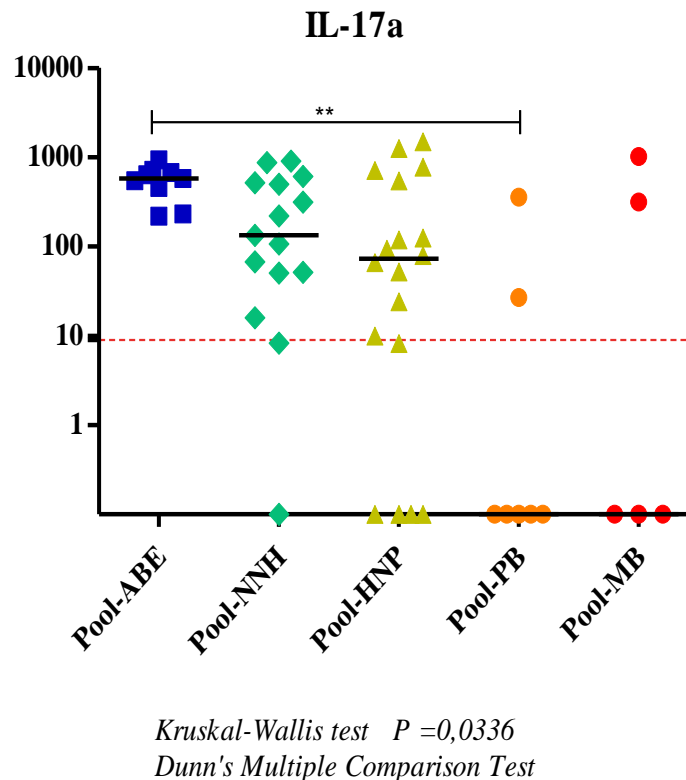
Figura 12 - PCA- componente 1 pool de peptídeos análise comparativa



Legenda: Análise comparativa de MIP-1 β , MCP-1, IL-8 e IL-6 entre grupos. PCA do componente 1 das amostras estimuladas com o pool de peptídeos. Os níveis de citocinas foram determinados por Quantificação através de ensaio luminex Bio-Rad em plasmas de cultura de 24 horas após estímulo com a ML1419c na concentração de 5 $\mu\text{g}/1 \text{ mL}$. (ABE – controle saudável; NNH– neuropatia não hansênica; HNP – hansêníase neural pura; PB – hansêníase paucibacilar; MB – hansêníase multibacilar). Resultados expressos em pg/mL (n=55). A linha tracejada vermelha indica o ponto de corte baseado no dobro do desvio padrão das amostras não estimuladas (controle negativo). [Mediana].

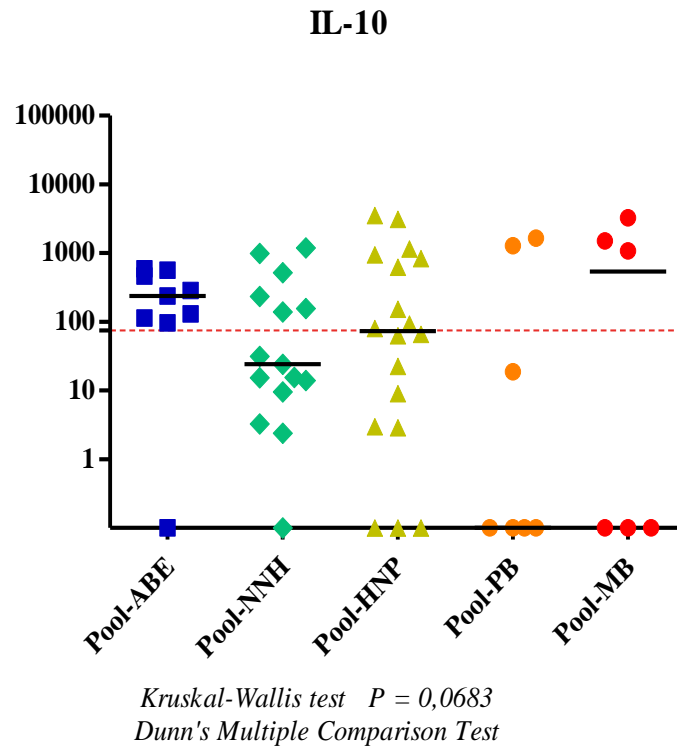
No componente um, três quimiocinas (MIP-1 β , MCP-1 e IL-8) e IL-6 foram induzidas em concentrações com diferenças significativas entre os grupos analisados. MIP-1 β mostrou haver diferenças significantes no grupo ABE em relação aos grupos PB e MB e o grupo HNP do grupo PB; na concentração de MCP-1 e IL-6 essa relação foi estabelecida entre o grupo ABE e os grupos PB e MB; IL-8 foi significativa entre o grupo ABE e os grupos com a doença estabelecida. Não foi observada produção significativa relacionada ao grupo NNH e os outros grupos neste componente.

Figura 13 - PCA- componente 2 pool de peptídeos análise comparativa de IL-10



Legenda: PCA do componente 2 das amostras estimuladas com o pool de peptídeos. Análise comparativa de IL-17a entre grupos. Os níveis de citocinas foram determinados por Quantificação através de ensaio luminex Bio-Rad em plasmas de cultura de 24 horas após estímulo com a ML1419c na concentração de 5 μ g/1 mL. (ABE – controle saudável; NNH– neuropatia não hansênica; HNP – hanseníase neural pura; PB – hanseníase paucibacilar; MB – hanseníase multibacilar). Resultados expressos em pg/mL (n=55). A linha tracejada vermelha indica o ponto de corte baseado no dobro do desvio padrão das amostras não estimuladas (controle negativo). [Mediana]

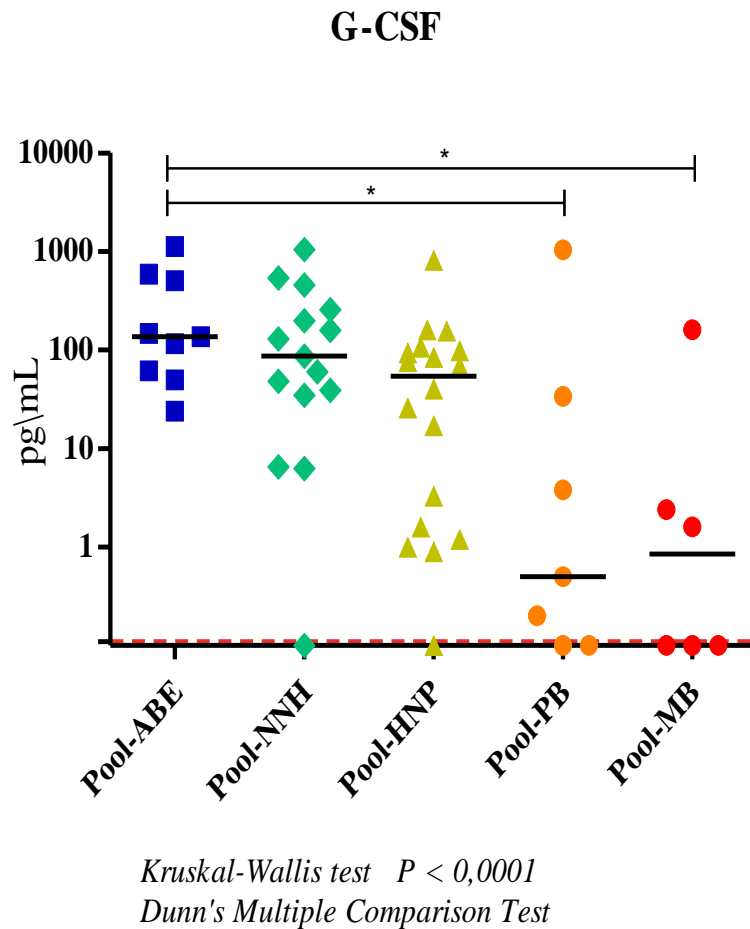
Figura 14 - PCA- componente 3 pool análise comparativa de G-CSF



Legenda: Análise comparativa de IL-10 entre grupos. Os níveis de citocinas foram determinados por Quantificação através de ensaio luminex Bio-Rad em plasmas de cultura de 24 horas após estímulo com a ML1419c na concentração de 5 µg/1 mL. (ABE – controle saudável; NNH– neuropatia não hansênica; HNP – hanseníase neural pura; PB – hanseníase paucibacilar; MB – hanseníase multibacilar). Resultados expressos em pg/mL (n=55). A linha tracejada vermelha indica o ponto de corte baseado no dobro do desvio padrão das amostras não estimuladas (controle negativo). [Mediana].

No componente 3, das citocinas induzidas pelo pool apenas a IL-17a mostrou ser significativa na comparação de ABE com PB.

Figura 15 - PCA do componente 3 das amostras estimuladas com o pool de peptídeos



Legenda: Análise comparativa de G-CSF entre grupos. Os níveis de citocinas foram determinados por Quantificação através de ensaio luminex Bio-Rad em plasmas de cultura de 24 horas após estímulo com a ML1419c na concentração de 5 $\mu\text{g}/1 \text{ mL}$. (ABE – controle saudável; NNH– neuropatia não hansênica; HNP – hanseníase neural pura; PB – hanseníase paucibacilar; MB – hanseníase multibacilar). Resultados expressos em pg/mL (n=55). A linha tracejada vermelha indica o ponto de corte baseado no dobro do desvio padrão das amostras não estimuladas (controle negativo). [Mediana].

Os níveis de citocinas observados em controles saudáveis e pacientes com neuropatias não hansênicas em resposta a antígenos expressos pelo *M. leprae* mostram que a presença de resposta antígeno-específica ao bacilo de Hansen indica a exposição-infecção, mas não hanseníase. A resposta de pacientes com HNP aos antígenos de *M. leprae* mostrou-se bastante elevada, inclusive com níveis de IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias mais elevados do que em outras formas de hanseníase. A presença de PCR positivo para *M. leprae* no nervo pacientes com HNP não se correlacionou com um padrão diferenciado de resposta a antígenos

do *M. leprae* por linfócitos T (ensaio em sangue não fracionado) ou linfócitos B (Anti-LID-1 e anti-PGL-1). Porém, o paciente com HNP e níveis mais elevados de anticorpos anti-LID-1 e anti-PGL-1 tinha PCR positivo em nervo para DNA específico de *M. leprae*. Além disto, teste de níveis de anti-PGL-I e anti-LID-1 em dois pacientes com HNP mostrou queda nos níveis séricos destes anticorpos após final de tratamento dos pacientes com poliquimioterapia. Esta observação sugere o uso de níveis destes anticorpos para avaliação de redução de carga bacilar e resposta terapêutica em HNP.

4 DISCUSSÃO

PGL-I facilita a ligação dos bacilos aos macrófagos e às células de Schwann, promove a sobrevivência de *M. leprae* em macrófagos de seres humanos e inibe a proliferação de células T murinas e humanas. Foi sugerido que PGL-1 modula a indução de TNF e IL-1 β a em células mononucleares de sangue periférico humano em resposta a estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) (31). A resposta humoral à proteína de fusão LID-1 foi observada em mais de 95% dos pacientes LL. PGL-I e LID-1 são reconhecidos em indivíduos infectados por *M. leprae* por anticorpos IgM e IgG respectivamente, em concentrações elevadas na maioria dos pacientes MB (59). Entretanto estes marcadores têm aplicação limitada para o diagnóstico das demais formas clínicas de hanseníase. Grande parte dos pacientes PB possui níveis indetectáveis de anti-PGL-I. Contudo, vários autores sugerem a associação de anti-PGL-I com outros biomarcadores sorológicos como LID-1. Essa associação pode ser promissora na classificação simples de hanseníase PB e MB (60). Os resultados obtidos a partir de amostras de soro pacientes HNP mostram que estes dois marcadores não teriam grande utilidade diagnóstica nesta forma de hanseníase. Porém, em pacientes com HNP com positividade para anti-PGL-I e anti-LID-1, talvez a sorologia pré e pós-tratamento por poliquimioterapia possa ser um elemento de avaliação de resposta terapêutica, como pode ser visto em dois pacientes que estudamos neste trabalho.

Um dos objetivos iniciais do trabalho foi avaliar se antígenos de *M. leprae*, como a proteína recombinante ML1419c, induziriam produção de citocinas em CMS de pacientes com HNP. A capacidade destes indivíduos de montar uma resposta imune ao *M. leprae* ainda é pouco conhecida, em parte devido à dificuldade de diagnóstico deste grupo de pacientes. Para demonstrar que os pacientes HNP eram capazes de responder aos estímulos com a produção de citocinas em culturas de CMS, foi realizada a quantificação de biomarcadores em sobrenadantes de culturas estimuladas com antígenos de *M. leprae*. A ML1419c foi capaz de induzir níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias em CMS dos pacientes com HNP (figura 5).

O ensaio em sangue não fracionado permite avaliar níveis de biomarcadores sem necessidade do processamento do sangue, o que diminui os custos do método, além de facilitar a utilização do ensaio como fundamento de teste diagnóstico para uso pelo sistema único de saúde (SUS). Assim podemos considerar a avaliação da resposta ao *M. leprae* em

sangue não fracionado como potencialmente um estágio inicial para desenvolvimento de teste diagnóstico para hanseníase em suas diferentes formas clínicas.

Quando a resposta *in vitro* a antígenos de *M. leprae* foi medida por teste multiplex com capacidade para detecção de 17 biomarcadores, os níveis destes biomarcadores foram examinados através da análise de componentes principais, para uma avaliação exploradora da capacidade destas citocinas de distinguir grupos de indivíduos com diferentes níveis de exposição ao *M. leprae*, bem como pacientes com hanseníase neural pura de indivíduos com outras neuropatias periféricas não hansênicas. Na resposta à proteína ML1419c foram identificados dois componentes que explicam 73,1% da variação total e sugerem que 13 citocinas e quimiocinas são importantes para detecção desta variação. Para o pool de peptídeos *M. leprae*-específicos foram resumidos três componentes que explicam 80,2% da variação total. Estes três componentes sugerem que 12 das 17 citocinas são importantes para explicar a variação observada nas respostas.

A detecção de resposta imune celular específica para antígenos do *M. leprae* foi extremamente sensível em nossa avaliação de indivíduos de área endêmica para hanseníase e pacientes com HNP. Esta observação sugere que, com um refinamento um pouco maior desta avaliação multiparamétrica, possamos alcançar um nível de discriminação entre os pacientes com HNP ou outras formas de hanseníase e pacientes com outras neuropatias, suficiente para aplicações práticas em diagnóstico diferencial de HNP.

A avaliação de marcadores de regulação negativa de resposta imune celular contra o *M. leprae* é uma possibilidade promissora, uma vez IFN- γ e diversos outros biomarcadores de ativação funcional de linfócitos T mostraram redução progressiva quando indivíduos expostos sem hanseníase foram comparados com pacientes, estes biomarcadores se reduziram ainda mais acentuadamente com o aumento de carga bacilar dos grupos de pacientes avaliados. No mesmo grupos de indivíduos, IL-10, uma citocina inibidora de resposta imune e inflamatória, estava presente em níveis elevados em resposta aos antígenos de *M. leprae*, e alcançava os níveis mais elevados em pacientes multibacilares em resposta a peptídeos específicos do *M. leprae*.

Os níveis elevados de IL-10 em pacientes, especialmente multibacilares, são consistentes com um papel para esta citocina na inibição de resposta imune celular observada na hanseníase. O fato de que a produção de IL-10 em maior nível em pacientes multibacilares é desencadeada por estímulo antigênico é consistente com um mecanismo de inibição de resposta imune e inflamatória pela IL-10 dependente de linfócitos T. Monócitos, linfócitos T reguladores Foxp3-positivos e linfócitos T_{H2} são fontes potenciais desta citocina nos

pacientes hansenianos. No caso dos linfócitos T_{H2} , uma diferenciação tardia destas células para um fenótipo regulador, com perda de capacidade de produção de IL-4, e alta produção de IL-10 é uma possibilidade a ser investigada (61). É digno de nota o fato de que os pacientes com HNP mostraram os níveis mais elevados de resposta imune celular a antígenos de *M. leprae* entre os pacientes que avaliamos, semelhantes a pacientes com formas PB da doença e indivíduos assintomáticos expostos à infecção pelo *M. leprae*.

CONCLUSÕES

- a) A análise comparativa das citocinas induzidas *in vitro* após estímulo com a proteína ML1419c mostrou que, as culturas de CMS, os leucócitos de sangue não fracionado de pacientes HNP e foram capazes de produzir altos níveis de citocinas e quimiocinas em resposta a esta proteína do *M. leprae*, com papel potencial relevante no estado patológico da hanseníase;
- b) Leucócitos sanguíneos dos pacientes com HNP foram capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e IL-10 em resposta a antígenos específicos do *M. leprae* em níveis semelhantes aos pacientes com as formas paucibacilares de hanseníase;
- c) A análise comparativa dos níveis de resposta *in vitro* a antígenos *M. leprae*-específicos dos grupos avaliados sugere que a maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* desenvolve resposta imune contra o bacilo. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas foram induzidos em resposta a antígenos de *M. leprae* no grupo controle saudável (ABE) e estes níveis diminuem gradativamente no espectro de formas até o polo LL. O grupo HNP demonstrou uma resposta comparável às formas PB da hanseníase. Este trabalho auxiliou na caracterização da resposta *in vitro* ao *M. leprae* de pacientes com HNP, fornecendo subsídios para melhor compreensão desta forma de hanseníase, e desenvolvimento de novas ferramentas para diagnóstico desta doença.

Perspectivas

A hanseníase é uma doença que ocasiona algum tipo de comprometimento neural. A inflamação perineural é o achado histológico muito comum na lesão observada na biopsia de pele.

A comunicação no sistema imune ocorre através do contato célula-célula e no sistema nervoso ocorre através do impulso elétrico. Geralmente ambos os sistemas são estudados separadamente, contudo estudos recentes sugerem uma participação bem estabelecida de ambos na proteção contra agentes infecciosos através do compartilhamento de moléculas e receptores de sinalização celular (62).

Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF contribuem para o estabelecimento de sensibilização periférica através da indução de fator de crescimento neural. A IL-1 β pode atuar diretamente nos neurônios sensoriais primários, proporcionando o aumento da atividade excitatória, assim como o TNF tem ação excitatória sobre os neurônios nociceptores, receptores de alto limiar que geram impulsos nervosos que o cérebro interpreta como dor (63).

Neurônios sensoriais contribuem para o estabelecimento do processo inflamatório através de reflexo axonal, eles podem atuar de forma a favorece tanto um ambiente pró-inflamatório quanto anti-inflamatório.

Os neurônios nociceptivos regulam a imunidade inata e adaptativa e a dor neuropática através do adaptador do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), expresso na maioria dos neurônios dos gânglios da raiz dorsal, assim como os receptores de Toll-like, conhecidos por regular a imunidade inata (64). Trabalhos recentes demonstram que os neurônios sensoriais ativados liberam neuropeptídeos, para os quais muitas células do sistema imune expressam receptores. São importantes no controle da inflamação, alguns podem atuar contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A ausência de inervação pode inibir o processo inflamatório na pele (62). Na HNP é observado um comprometimento neural devido basicamente à presença de neuropatia periférica, característica que dificulta o diagnóstico. A hipótese de que uma lesão grave no nervo poderia levar à redução da resposta inflamatória na pele, inibindo o recrutamento de células imunocompetentes para a área com restrição neural e, conseqüentemente a uma ausência de lesão na pele deve ser considerada, principalmente em casos de HNP onde um longo período de evolução é observado. Finalmente, a combinação da detecção de resposta antígeno-específica ao *M. leprae* associada a indicadores de lesão em células de Schwann e em nervos periféricos pode ser um caminho promissor para um teste de diagnóstico precoce de hanseníase, inclusive em HNP.

REFERÊNCIAS

1. Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS One*. 2009;4(5):e5669.
2. Han XY, Silva FJ. On the age of leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2):e2544.
3. Mendum TA, Schuenemann VJ, Roffey S, Taylor GM, Wu H, Singh P, et al. *Mycobacterium leprae* genomes from a British medieval leprosy hospital: towards understanding an ancient epidemic. *BMC Genomics*. 2014;15:270.
4. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009;41(12):1282-9.
5. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med*. 2011;364(17):1626-33.
6. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(6):856-64.
7. Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science*. 2016;354(6313):744-7.
8. Wheat WH, Casali AL, Thomas V, Spencer JS, Lahiri R, Williams DL, et al. Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cysts. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(12):e3405.
9. Jay V. The legacy of Armauer Hansen. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(4):496-7.
10. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409(6823):1007-11.
11. Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol*. 2011;6(1):57-71.
12. Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(14):4459-64.
13. Noordeen SK. Elimination of leprosy as a public health problem. *Indian J Lepr*. 1994;66(1):1-10.
14. Vidal Pessolani MC, de Melo Marques MA, Reddy VM, Locht C, Menozzi FD. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes and Infection*. 2003;5(7):677-84.

15. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4):e2655.
16. Martins MVSB, Guimarães MMdS, Spencer JS, Hacker MAVB, Costa LS, Carvalho FM, et al. Pathogen-Specific Epitopes as Epidemiological Tools for Defining the Magnitude of *Mycobacterium leprae* Transmission in Areas Endemic for Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(4):e1616.
17. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet*. 2004;363(9416):1209-19.
18. Jopling R, D.S. R, W.H. J. Classification of leprosy according to immunity a five-group system. *International Journal lepre* 1966;25573. 1966;34:255-73.
19. S T, PK J, VD T. Neuritic leprosy: epidemiology and therapeutic responsiveness. *Leprosy review*. 1992;3(3):263-8, :263-8.
20. Rabello F, Bechelli L, Rotberg A, editors. [Propositions of a group of leprologists of Madrid regarding the classification of leprosy]. *Sexto Congresso Internacional de Lepra em Madrid*; 1953 Jun; Madrid - Espanha: 1953.
21. Kaur G, Girdhar BK, Girdhar A, Malaviya GN, Mukherjee A, Sengupta U, et al. A clinical, immunological, and histological study of neuritic leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1991;59(3):385-91.
22. Pimentel MI, Sampaio EP, Nery JA, Gallo ME, Saad MH, Machado AM, et al. Borderline--tuberculoid leprosy: clinical and immunological heterogeneity. *Lepr Rev*. 1996;67(4):287-96.
23. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):338-81.
24. Araujo S, Rezende MM, Sousa DC, Rosa MR, Santos DC, Goulart LR, et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(6):739-45.
25. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *British Medical Bulletin*. 2006;77-78(1):103-21.
26. Lockwood DN, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients--searching for the perfect solution? *Lepr Rev*. 2007;78(4):317-20.
27. Sinan S-M. Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase Brasil 2000 - 2014. In: Saúde SdveS-Sd, editor. Tabela elaborada pela CGHDE/DEVIT/SVS-MS Disponível em 18.06.2015 ed. Brasil: 2015; 2015. p. 1.
28. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the Cell Wall Phenolic Glycolipid-1 in the Peripheral Nerve Predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000;103(3):511-24.

29. Jardim MR, Antunes SL, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JA, Illarramendi X, et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Lepr Rev.* 2005;76(3):232-40.
30. Lockwood DNJ, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bulletin of world health organization - WHO* [Internet]. 2005; 83(Bulletin of the World Health Organization Past issue):[161-240 pp.].
31. Manca C, Peixoto B, Malaga W, Guilhot C, Kaplan G. Modulation of the cytokine response in human monocytes by mycobacterium leprae phenolic glycolipid-1. *J Interferon Cytokine Res.* 2012;32(1):27-33.
32. Amorim FM, Nobre ML, Ferreira LC, Nascimento LS, Miranda AM, Monteiro GR, et al. Identifying Leprosy and Those at Risk of Developing Leprosy by Detection of Antibodies against LID-1 and LID-NDO. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0004934.
33. Meeker HC, Levis WR, Sersen E, Schuller-Levis G, Brennan PJ, Buchanan TM. ELISA detection of IgM antibodies against phenolic glycolipid-I in the management of leprosy: a comparison between laboratories. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1986;54(4):530-9.
34. Mizoguti DeF, Hungria EM, Freitas AA, Oliveira RM, Cardoso LP, Costa MB, et al. Multibacillary leprosy patients with high and persistent serum antibodies to leprosy IDRI diagnostic-1/LID-1: higher susceptibility to develop type 2 reactions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(7):914-20.
35. Freitas MR, Nascimento OJ, Hahn MD. Isolated superficial peroneal nerve lesion in pure neural leprosy: case report. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004;62(2B):535-9.
36. Antunes SL, Chimelli L, Jardim MR, Vital RT, Nery JA, Corte-Real S, et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(2):246-53.
37. Jardim MR, Chimelli L, Faria SCR, Fernandes PV, Neri JAD. Clinical, electroneuromyographic and morphological studies of pure neural leprosy in a Brazilian referral centre. *Leprosy Review.* 2004;75(3):242-53.
38. Nascimento OJ. Leprosy neuropathy: clinical presentations. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013;71(9B):661-6.
39. Freitas MR, Nascimento OJ, Quaglino EA, Oliveira A, Hahn MD. Small-fiber polyneuropathy in leprosy without skin changes: study of 17 cases. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61(3A):542-6.
40. Jardim MR, Antunes SL, Santos AR, Nascimento OJ, Nery JA, Sales AM, et al. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol.* 2003;250(7):806-9.
41. Skacel M, Antunes SL, Rodrigues MM, Nery JA, Valentim VD, Morais RP, et al. The diagnosis of leprosy among patients with symptoms of peripheral neuropathy without cutaneous lesions: a follow-up study. *Arq Neuropsiquiatr.* 2000;58(3B):800-7.

42. Bezerra Da Cunha FM, Werneck MC, Scola RH, LC. W. Pure neural leprosy: diagnostic value of the polymerase chain reaction. *American Journal of Anatomy*. 2006;131(1):409-14
43. Brophy PJ. *Microbiology*. Subversion of Schwann cells and the leper's bell. *Science*. 2002;296(5569):862-3.
44. Spierings E, de Boer T, Wieles B, Adams LB, Marani E, Ottenhoff TH. Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy. *J Immunol*. 2001;166(10):5883-8.
45. Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raaum R, Rambukkana A. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell*. 2013;152(1-2):51-67.
46. Medeiros MF, Rodrigues MM, Vital RT, da Costa Nery JA, Sales AM, de Andrea Hacker M, et al. CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(3):220-9.
47. Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol*. 2015;33(1):46-54.
48. Andrade PR, Jardim MR, da Silva AC, Manhaes PS, Antunes SL, Vital R, et al. Inflammatory Cytokines Are Involved in Focal Demyelination in Leprosy Neuritis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016;75(3):272-83.
49. Geluk A, van den Eeden SJ, Dijkman K, Wilson L, Kim HJ, Franken KL, et al. ML1419c peptide immunization induces Mycobacterium leprae-specific HLA-A*0201-restricted CTL in vivo with potential to kill live mycobacteria. *J Immunol*. 2011;187(3):1393-402.
50. Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Esquenazi DA, Guimarães MM, Martins MV, Bekele Y, et al. Peptides Derived from Mycobacterium leprae ML1601c Discriminate between Leprosy Patients and Healthy Endemic Controls. *J Trop Med*. 2012;2012:132049.
51. Geluk A, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Spencer JS, Banu S, Martins MV, et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. *J Immunol*. 2012;188(10):4782-91.
52. Geluk A, van der Ploeg-van Schip JJ, van Meijgaarden KE, Commandeur S, Drijfhout JW, Benckhuijsen WE, et al. Enhancing sensitivity of detection of immune responses to Mycobacterium leprae peptides in whole-blood assays. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(6):993-1004.
53. Bobosha K, Tang ST, van der Ploeg-van Schip JJ, Bekele Y, Martins MV, Lund O, et al. Mycobacterium leprae virulence-associated peptides are indicators of exposure to M. leprae in Brazil, Ethiopia and Nepal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107 Suppl 1:112-23.
54. Agrawal A, Pandit L, Dalal M, Shetty JP. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2005;107(6):445-54.

55. Teles RM, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science*. 2013;339(6126):1448-53.
56. Chemouilli P, Woods S, Said G, Cole ST. Detection of *Mycobacterium leprae* in nerve lesions by the polymerase chain reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1996;64(1):1-5.
57. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP, Martelli CM, et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(11):1400-8.
58. Field A, Miles J, Field Z. *Discovering Statistics Using R*. 1 ed. Library fcB, editor: SAGE; 2012. 992 p.
59. Geluk A, Duthie MS, Spencer JS. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. *Lepr Rev*. 2011;82(4):402-21.
60. Duthie MS, Raychaudhuri R, Tutterrow YL, Misquith A, Bowman J, Casey A, et al. A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79(2):233-9.
61. Mahata B, Zhang X, Kolodziejczyk AA, Proserpio V, Haim-Vilmovsky L, Taylor AE, et al. Single-cell RNA sequencing reveals T helper cells synthesizing steroids de novo to contribute to immune homeostasis. *Cell Rep*. 2014;7(4):1130-42.
62. Talbot S, Foster SL, Woolf CJ. Neuroimmunity: Physiology and Pathology. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:421-47.
63. Binshtok AM, Wang H, Zimmermann K, Amaya F, Vardeh D, Shi L, et al. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *J Neurosci*. 2008;28(52):14062-73.
64. Liu XJ, Zhang Y, Liu T, Xu ZZ, Park CK, Berta T, et al. Nociceptive neurons regulate innate and adaptive immunity and neuropathic pain through MyD88 adapter. *Cell Res*. 2014;24(11):1374-7.

ANEXO A -Termo de consentimento e livre esclarecimento dos participantes

Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento Para Participação em Projeto – Pacientes portadores de neuropatias não hansênicas.

Prezado participante;

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa de “**Investigação da resposta imune *in vitro* a antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* em pacientes com forma neural pura de hanseníase**”, sob a responsabilidade da Dra. Márcia Maria Jardim Rodrigues.

Nosso objetivo é realizar um estudo da resposta imunológica de indivíduos que apresentam neuropatias periféricas (portadores de hanseníases ou não), comparando com indivíduos saudáveis. A finalidade é contribuir para o desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico de formas de hanseníase, especialmente para a exclusão da hipótese de hanseníase em pacientes com neuropatias periféricas.

É importante por isso, que você leia esse documento com atenção e calma para decidir se você quer ser incluído no grupo que vai participar desse estudo. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será totalmente respeitada e o seu tratamento médico acontecerá normalmente como o de todos os pacientes que frequentam esse serviço clínico, não havendo nenhum prejuízo para a sua assistência médica enquanto durar o seu tratamento. Da mesma forma, se você aceitar participar e a qualquer momento desistir dessa participação, a sua assistência médica continuará acontecendo normalmente como a de todos os pacientes deste serviço. O participante não terá direito à compensação financeira em face de sua participação no presente projeto. Não haverá também despesa pessoal para o participante em qualquer etapa do estudo.

Além do exame clínico ao qual você será submetido, pedimos que você nos forneça 35 mL de sangue. Esse material será armazenado no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, podendo ser utilizado para outras pesquisas de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, instituição colaboradora do presente projeto. O motivo para que esse material seja armazenado é que os experimentos serão feitos gradativamente e não todos de uma só vez. Além disso, muitas perguntas científicas aparecem entre os pesquisadores que necessitam de material adicional dos próprios pacientes para serem esclarecidas. As amostras biológicas já armazenadas serão utilizadas para responder a estas perguntas, quando possível.

Procedimento e métodos usados

Coleta de sangue: Uma pessoa bem treinada neste procedimento fará a punção da veia do seu antebraço, mantendo todas as recomendações para evitar desconfortos. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico aqueles usados por médicos quando retiram sangue para testes e exames. A quantidade de sangue retirada será de 35 mL. Esta quantidade é um limite bem saudável estipulado pelo NIH (Clinical Center Guidelines).

Riscos e desconfortos: Esta investigação não oferece riscos diretos à saúde dos participantes. Entretanto, a coleta de sangue pode causar dor leve e passageira no local da punção, com possibilidade de vermelhidão ou hematoma que desaparecerá em poucos dias. A formação de possíveis hematomas é devido ao possível extravasamento de sangue que pode ocorrer da veia ocasionada pela agulha. A fim de evitar ou sanar possíveis desconfortos, será recomendado ao participante a não carregar peso por pelo menos algumas horas no mesmo lado do braço que foi puncionado; e a não massagear o local que foi puncionado. Em caso de eventual formação de hematoma, o participante será orientado a usar compressa de gelo o mais rápido possível. Caso o hematoma persista após o uso da compressa de gelo, o participante será orientado a entrar em contato com o Laboratório. Todo material utilizado para punção venosa será estéril e descartável. O material utilizado será descartado em recipiente apropriado, para posterior coleta pública de material hospitalar.

Benefícios: Não há benefício direto, porém, esse estudo beneficiará futuramente toda a população, já que a investigação da modulação da resposta imune possui relevâncias terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas como a hanseníase.

Confiabilidade: As pessoas que vão puncionar o seu sangue e os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constarão o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra. As informações obtidas neste estudo talvez sejam publicadas em jornais científicos, mas a sua identidade não será revelada.

Responsabilidade: A comissão de Ética responsabilizará o coordenador responsável pelo estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o estudo. O médico responsável se coloca à disposição para responder as perguntas sempre que houver novas dúvidas. O participante tem total liberdade para contactar a pesquisadora responsável pela pesquisa. O presente documento será redigido em duas vias, contendo as mesmas informações, após o consentimento e assinatura deste termo o participante receberá um via com igual teor. O participante poderá recorrer ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) para dúvidas e esclarecimentos eventuais quanto à eticidade da pesquisa.

Nome do pesquisador responsável: Dra. Marcia Maria Jardim Rodrigues.

Nomes e telefones de contato para questões e problemas: Dra. Marcia Maria Jardim Rodrigues; telefone: 21-2562-1594. E-mail: mmjardim@ioc.fiocruz.br

Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo seres humanos – FIOCRUZ/IOC

Avenida Brasil, 4036, sala 705, Expansão Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, CEP:21040-360. Telefone: 21 3882-9011. E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Financiador do projeto: FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e Fundação Oswaldo Cruz.

Participação: Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para recusar a participar no estudo, ou me retirar em qualquer fase da pesquisa. Ao assinar este documento significa que você leu as informações deste termo de consentimento, datou e recebeu uma via do mesmo.

Nome: _____ Data: _____

Assinatura: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento Para Participação em Projeto – Voluntários saudáveis

Prezado participante;

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa de “**Investigação da resposta imune *in vitro* a antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* em pacientes com forma neural pura de hanseníase**”, sob a responsabilidade da Dra. Márcia Maria Jardim Rodrigues.

Nosso objetivo é realizar um estudo da resposta imunológica de indivíduos que apresentam neuropatias periféricas (portadores de hanseníases ou não), comparando com indivíduos saudáveis. A finalidade é contribuir para o desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico de formas de hanseníase, especialmente para a exclusão da hipótese de hanseníase em pacientes com neuropatias periféricas.

É importante por isso, que você leia esse documento com atenção e calma para decidir se você quer ser incluído no grupo que vai participar desse estudo. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será totalmente respeitada e o seu tratamento médico acontecerá normalmente como o de todos os pacientes que frequentam esse serviço clínico, não havendo nenhum prejuízo para a sua assistência médica enquanto durar o seu tratamento. Da mesma forma, se você aceitar participar e a qualquer momento desistir dessa participação, a sua assistência médica continuará acontecendo normalmente como a de todos os pacientes deste serviço. O participante não terá direito à compensação financeira em face de sua participação no presente projeto. Não haverá também despesa pessoal para o participante em qualquer etapa do estudo.

Além do exame clínico ao qual você será submetido, pedimos que você nos forneça 35 mL de sangue. Esse material será armazenado no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, podendo ser utilizado para outras pesquisas de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, instituição colaboradora do presente projeto. O motivo para que esse material seja armazenado é que os experimentos serão feitos gradativamente e não todos de uma só vez. Além disso, muitas perguntas científicas aparecem entre os pesquisadores que necessitam de material adicional dos próprios pacientes para serem esclarecidas. As amostras biológicas já armazenadas serão utilizadas para responder a estas perguntas, quando possível.

Procedimento e métodos usados

Coleta de sangue: Uma pessoa bem treinada neste procedimento fará a punção da veia do seu antebraço, mantendo todas as recomendações para evitar desconfortos. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico aqueles usados por médicos quando retiram sangue para testes e exames. A quantidade de sangue retirada será de 35 mL. Esta quantidade é um limite bem saudável estipulado pelo NIH (Clinical Center Guidelines).

Riscos e desconfortos: Esta investigação não oferece riscos diretos à saúde dos participantes. Entretanto, a coleta de sangue pode causar dor leve e passageira no local da punção, com possibilidade de vermelhidão ou hematoma que desaparecerá em poucos dias. A formação de possíveis hematomas é devido ao possível extravasamento de sangue que pode ocorrer da veia ocasionada pela agulha. A fim de evitar ou sanar possíveis desconfortos, será recomendado ao participante a não carregar peso por pelo menos algumas horas no mesmo lado do braço que foi puncionado; e a não massagear o local que foi puncionado. Em caso de eventual formação de hematoma, o participante será orientado a usar compressa de gelo o mais rápido possível. Caso o hematoma persista após o uso da compressa de gelo, o participante será orientado a entrar em contato com o Laboratório. Todo material utilizado para punção venosa será estéril e descartável. O material utilizado será descartado em recipiente apropriado, para posterior coleta pública de material hospitalar.

Benefícios: Não há benefício direto, porém, esse estudo beneficiará futuramente toda a população, já que a investigação da modulação da resposta imune possui relevâncias terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas como a hanseníase.

Confiabilidade: As pessoas que vão puncionar o seu sangue e os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constarão o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra. As informações obtidas neste estudo talvez sejam publicadas em jornais científicos, mas a sua identidade não será revelada.

Responsabilidade: A comissão de Ética responsabilizará o coordenador responsável pelo estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o estudo. O médico responsável se coloca à disposição para responder as perguntas sempre que houver novas dúvidas. O participante tem total liberdade para contactar a pesquisadora responsável pela pesquisa. O presente documento será redigido em duas vias, contendo as mesmas informações, após o consentimento e assinatura deste termo o participante receberá um via com igual teor. O participante poderá recorrer ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) para dúvidas e esclarecimentos eventuais quanto à eticidade da pesquisa.

Nome do pesquisador responsável: Dra. Marcia Maria Jardim Rodrigues.

Nomes e telefones de contato para questões e problemas: Dra. Marcia Maria Jardim Rodrigues; telefone: 21-2562-1594. E-mail: mmjardim@ioc.fiocruz.br

Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo seres humanos – FIOCRUZ/IOC

Avenida Brasil, 4036, sala 705, Expansão Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, CEP:21040-360. Telefone: 21 3882-9011. E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Financiador do projeto: FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e Fundação Oswaldo Cruz.

Participação: Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para recusar a participar no estudo, ou me retirar em qualquer fase da pesquisa. Ao assinar este documento significa que você leu as informações deste termo de consentimento, datou e recebeu uma via do mesmo.

Nome: _____ Data: _____

Assinatura: _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento Para Participação em Projeto – Pacientes portadores de hanseníase

Prezado participante;

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa de “**Investigação da resposta imune *in vitro* a antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* em pacientes com forma neural pura de hanseníase**”, sob a responsabilidade da Dra. Márcia Maria Jardim Rodrigues.

Nosso objetivo é realizar um estudo da resposta imunológica de indivíduos que apresentam neuropatias periféricas (portadores de hanseníases ou não), comparando com indivíduos saudáveis. A finalidade é contribuir para o desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico de formas de hanseníase, especialmente para a exclusão da hipótese de hanseníase em pacientes com neuropatias periféricas.

É importante por isso, que você leia esse documento com atenção e calma para decidir se você quer ser incluído no grupo que vai participar desse estudo. Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será totalmente respeitada e o seu tratamento médico acontecerá normalmente como o de todos os pacientes que frequentam esse serviço clínico, não havendo nenhum prejuízo para a sua assistência médica enquanto durar o seu tratamento. Da mesma forma, se você aceitar participar e a qualquer momento desistir dessa participação, a sua assistência médica continuará acontecendo normalmente como a de todos os pacientes deste serviço. O participante não terá direito à compensação financeira em face de sua participação no presente projeto. Não haverá também despesa pessoal para o participante em qualquer etapa do estudo.

Além do exame clínico ao qual você será submetido, pedimos que você nos forneça 35 mL de sangue. Esse material será armazenado no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, podendo ser utilizado para outras pesquisas de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz, instituição colaboradora do presente projeto. O motivo para que esse material seja armazenado é que os experimentos serão feitos gradativamente e não todos de uma só vez. Além disso, muitas perguntas científicas aparecem entre os pesquisadores que necessitam de material adicional dos próprios pacientes para serem esclarecidas. As amostras biológicas já armazenadas serão utilizadas para responder a estas perguntas, quando possível.

Procedimento e métodos usados

Coleta de sangue: Uma pessoa bem treinada neste procedimento fará a punção da veia do seu antebraço, mantendo todas as recomendações para evitar desconfortos. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico aqueles usados por médicos quando retiram sangue para testes e exames. A quantidade de sangue retirada será de 35 mL. Esta quantidade é um limite bem saudável estipulado pelo NIH (Clinical Center Guidelines).

Riscos e desconfortos: Esta investigação não oferece riscos diretos à saúde dos participantes. Entretanto, a coleta de sangue pode causar dor leve e passageira no local da punção, com

possibilidade de vermelhidão ou hematoma que desaparecerá em poucos dias. A formação de possíveis hematomas é devido ao possível extravasamento de sangue que pode ocorrer da veia ocasionada pela agulha. A fim de evitar ou sanar possíveis desconfortos, será recomendado ao participante a não carregar peso por pelo menos algumas horas no mesmo lado do braço que foi puncionado; e a não massagear o local que foi puncionado. Em caso de eventual formação de hematoma, o participante será orientado a usar compressa de gelo o mais rápido possível. Caso o hematoma persista após o uso da compressa de gelo, o participante será orientado a entrar em contato com o Laboratório. Todo material utilizado para punção venosa será estéril e descartável. O material utilizado será descartado em recipiente apropriado, para posterior coleta pública de material hospitalar.

Benefícios: Não há benefício direto, porém, esse estudo beneficiará futuramente toda a população, já que a investigação da modulação da resposta imune possui relevâncias terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas como a hanseníase.

Confiabilidade: As pessoas que vão puncionar o seu sangue e os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constarão o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra. As informações obtidas neste estudo talvez sejam publicadas em jornais científicos, mas a sua identidade não será revelada.

Responsabilidade: A comissão de Ética responsabilizará o coordenador responsável pelo estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o estudo. O médico responsável se coloca à disposição para responder as perguntas sempre que houver novas dúvidas. O participante tem total liberdade para contactar a pesquisadora responsável pela pesquisa. O presente documento será redigido em duas vias, contendo as mesmas informações, após o consentimento e assinatura deste termo o participante receberá um via com igual teor. O participante poderá recorrer ao Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) para dúvidas e esclarecimentos eventuais quanto à eticidade da pesquisa.

Nome do pesquisador responsável: Dra. Marcia Maria Jardim Rodrigues.

Nomes e telefones de contato para questões e problemas: Dra. Marcia Maria Jardim Rodrigues; telefone: 21-2562-1594. E-mail: mmjardim@ioc.fiocruz.br

Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo seres humanos – FIOCRUZ/IOC

Avenida Brasil, 4036, sala 705, Expansão Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, CEP:21040-360. Telefone: 21 3882-9011. E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Financiador do projeto: FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e Fundação Oswaldo Cruz.

Participação: Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para recusar a participar no estudo, ou me retirar em qualquer fase da pesquisa. Ao assinar este documento significa que você leu as informações deste termo de consentimento, datou e recebeu uma via do mesmo.

Nome: _____ Data: _____

Assinatura: _____

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

10

Rio de Janeiro, 11 de dezembro de 2009.

Carta: 113/09

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Euzenir Nunes Sarno e
- Dra. Helene Santos Barbosa

Prezadas Senhoras,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **538/09** intitulado **“A lesão neural da hanseníase: análise da expressão de mediadores imunoinflamatórios e do seu papel na patogenia da doença”** com a deliberação de **APROVADO**.

Atenciosamente


Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: A lesão neural da hanseníase: análise da expressão de mediadores imunoinflamatórios e do seu papel na patogenia da doença

Pesquisador Responsável Euzenir Nunes Sarno

Data da Versão 09/11/2009

Cadastro 538/09

Data do Parecer 07/12/2009

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Estudo em 100 pacientes do ambulatório Souza Araújo do IOC, envolvendo os procedimentos diagnósticos de rotina (coleta de sangue, biópsias de pele e nervo somente em caso de lesão nos pacientes com Hanseníase, exame clínico dermatológico e neurológico, e exame eletroneuromiográfico. Este material será utilizado para o estudo da expressão de mediadores lesão. Serão 25 pacientes em cada um dos 4 grupos (forma neural pura da doença, forma neural reacional, forma não reacional com lesões cutâneas e forma reacional com lesões cutâneas. Além disso 10 controles normais submetidos à cirurgia reparadora e que concordarem em doar material para ser utilizado nesta pesquisa totalizando: 10 fragmentos de pele, 10 fragmentos de nervo e 10 amostras de 5 ml de sangue.

Analisar mRNA por PCR e proteínas produtos dos genes por imunohistoquímica, para avaliar a expressão de:

- 1) genes e proteínas envolvidos na desmielinização: Krox 20, Sox 10, Sox 2, c-jun, Oct6, HMG CoA, escaleno sintase, proteína mielinica zero e básica, conexina 32, periaxina
- 2) componentes da família Rho GTPases: enzimas ROCK, rac1, cdc42: avaliação da diferenciação e mobilidade das células de Schwann
- 3) genes e proteínas envolvidos na degeneração axonal: proteínas de neurofilamento fosforilado e fosforilase de neurofilamento e genes e proteínas envolvidos na regeneração axonal: GAP43
- 4) mediadores inflamatórios: metaloproteinases MMP2 e MMP9 e seus inibidores TACE e TIMP1
- 5) concentração plasmática de interleucinas (TNF α , TGF β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-7, IFN γ , IL-5, IL-6, assim como expressão de mRNA no tecido
- 6) identificação das subpopulações celulares nas biópsias (CD3, CD4, CD8, CD68, CD45RA, CD45RO)
- 7) estudo de anticorpos anti-gangliosídeos da bainha da mielina
- 8) correlacionar desmielinização (exame eletroneuromiográfico rotineiro) com resultados encontrados e a forma clínica dos pacientes (TT, BT, BB, BL, LL)

Sumário do Projeto

O projeto pretende estudar a destruição neuro-cutânea na hanseníase, estudando os mediadores da desmielinização, degeneração axonal e inflamação com destruição da estrutura neuro-cutânea. Pretende-se identificar mediadores / grupos de mediadores mais propícios para intervenção terapêutica e preventiva, e compreender melhor os mecanismos da patogenia.

O material a ser usado é sangue e fragmentos de tecido colhidos para diagnóstico da hanseníase, pacientes de 1ª visita, com lesões cutâneas, acometimento do nervo periférico, com episódios reacionais (=já tratados "curados" com nova sintomatologia).

Pretende-se analisar mRNA por PCR e proteínas por imunohistoquímica.

Os mediadores a serem estudados são:

- 1) genes e proteínas envolvidos na desmielinização: Krox 20 (codificado pelo gene Egr no início da mielinização), Sox 10, Sox 2, c-jun (os 2 últimos são genes das células de Schwann imatura envolvidos na desmielinização), Oct6 (fator da família SCIP [suppressed cAMP-induced POU transcription factor]), HMG CoA, escaleno sintase, proteína mielinica zero MPZ, MAG e básica MBP, PMP22, conexina 32, periaxina (alvos da Krox 20)

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Após análise por este colegiado, das respostas às pendências no parecer emitido em 16/11/09, tendo por referência as normas e diretrizes da Resolução 196/96, foi decidido pela **APROVAÇÃO** do referido protocolo.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais/anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz

**Patricia Bozza**

**Coordenadora Interina do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz**



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da resposta imune em pacientes com forma neural pura de hanseníase.

Pesquisador: Marcia Maria Jardim Rodrigues

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 56674316.6.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.870.154

Apresentação do Projeto:

O presente projeto de pesquisa tem duração aproximada de 4 (quatro) anos e o recrutamento dos participantes será realizado por período aproximado devido a dificuldade de diagnóstico no caso dos pacientes portadores de hanseníase neural pura. Serão incluídos neste estudo indivíduos sadios que residem em áreas específicas do Rio de Janeiro ou outros municípios com baixa incidência de casos de hanseníase (de acordo dados epidemiológicos atuais), com histórico conhecido de exposição persistente a hanseníase ou contato domiciliar com pacientes hansenianos, recrutados através de contatos com a equipe de profissionais de saúde lotados na LAMICEL - Laboratório de Microbiologia Celular e ASA - Ambulatório Souza Araújo; pacientes com neuropatias periféricas que não sejam provenientes de hanseníase; pacientes diagnosticados com hanseníase neural pura através de biópsia de nervo e/ou através de PCR e pacientes com outras formas de hanseníase (lepromatosa multibacilar e borderline-tuberculoide paucibacilar).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar se os níveis de IFN- induzidos por peptídeos sintéticos do Mycobacterium leprae podem

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Mangunhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.870.154

ser uma ferramenta de diagnóstico de formas de hanseníase especialmente para a exclusão da hipótese de hanseníase em pacientes com neuropatias periféricas.

Objetivos Secundários:

- 1- Avaliar níveis de IFN- produzidos in vitro por células de pacientes com HNP, específicas para o M. leprae;
- 2- Comparar os níveis de resposta in vitro de pacientes com HNP a antígenos de M. leprae com outros grupos de pacientes com hanseníase (multibacilar e paucibacilar) e controles saudáveis, assim como em pacientes com outras neuropatias periféricas de origem não hansênica;
- 3- Analisar comparativamente os níveis de IFN- induzidos in vitro em ensaio com células mononucleares de sangue e também com sangue não fracionado, como uma etapa inicial para desenvolvimento de teste diagnóstico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Esta investigação não oferece riscos diretos à saúde dos participantes. Entretanto, a coleta de sangue pode causar dor leve e passageira no local da punção, com possibilidade de vermelhidão ou hematoma que desaparecerá em poucos dias. A formação de possíveis hematomas é devido ao possível extravasamento de sangue que pode ocorrer da veia ocasionada pela agulha. A fim de evitar ou sanar possíveis desconfortos, será

recomendado ao participante a não carregar peso por pelo menos algumas horas no mesmo lado do braço que foi puncionado; e a não massagear o local que foi puncionado. Em caso de eventual formação de hematoma, o participante será orientado a usar compressa de gelo o mais rápido possível. Caso o hematoma persista após o uso da compressa de gelo, o participante será orientado a entrar em contato com o Laboratório. Todo material utilizado para punção venosa será estéril e descartável.

Benefícios:

O presente estudo poderá contribuir para uma melhor compreensão da forma neural pura de hanseníase, assim como ajudar a elucidar o padrão de resposta imune que está envolvido no adoecimento de pessoas expostas ao M. leprae. Baseado no fato de que o diagnóstico da hanseníase é realizado a partir das manifestações clínicas e de que a escassez de sinais iniciais e sintomas levam ao atraso no diagnóstico e tratamento

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.870.154

apropriados.

tratamento precoce dos pacientes e redução das sequelas e incapacidades físicas comuns na hanseníase neural pura. Ensaios a partir de sangue

não-fracionado são uma etapa inicial para o desenvolvimento de um teste diagnóstico que possa ser utilizado pelo Sistema Único

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo de relevante para a saúde pública, onde o conhecimento gerado e sua aplicação poderão ser de extrema importância para o diagnóstico e prevenção de deformidades e comprometimento neural dos pacientes com hanseníase causadoras de neuropatias periféricas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1- Ajustar cronograma - atendido.
- 2- Inclusão no projeto dos riscos para os voluntários conforme descritos no TCLE - atendido.
- 3- TCLE dos voluntários saudáveis - atendido (retirada do texto ... enquanto durar o seu tratamento ...).
- 4- TCLE dos voluntários em investigação - atendido
- 5- Esclarecer como serão recrutados os indivíduos saudáveis - atendido.
- 6- Critério de inclusão - atendido.

Recomendações:

O projeto deverá ser desenvolvido na forma que foi aprovado, qualquer alteração deverá ser informada ao CEP Fiocruz/IOC via Plataforma Brasil.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/2012, manifesta-se por APROVAR o projeto de pesquisa CAAE 56674316.6.0000.5248, após a deliberação do Comitê na 222ª Reunião Ordinária, comunicando que:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.870.154

apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

O participante de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Nenhuma pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser iniciada sem o parecer final do CEP Fiocruz-IOC e/ou da CONEP quando for este o caso.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_684462.pdf	01/12/2016 19:23:36		Aceito
Outros	20161022_Carta_resposta_ao_CEP.doc	01/12/2016 19:21:14	Marcia Maria Jardim Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	20161022_TCLE_individuos_em_investigacao_II.docx	01/12/2016 19:18:36	Marcia Maria Jardim Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	20161022_TCLE_individuos_saudaveis_II.docx	01/12/2016 19:18:26	Marcia Maria Jardim Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	20161022_projeto_HNP_II.docx	01/12/2016 19:17:52	Marcia Maria Jardim Rodrigues	Aceito
Cronograma	20161022_Cronograma_II.docx	01/12/2016 19:17:40	Marcia Maria Jardim Rodrigues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes_com_hanseniose.docx	05/09/2016 12:54:27	Marcia Maria Jardim Rodrigues	Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.870.154

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	07/04/2016 17:57:00	Marcia Maria Jardim Rodrigues	Aceito
----------------	--------------------	------------------------	----------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 16 de Dezembro de 2016

Assinado por:
Maria Regina Reis Amendoeira
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br