

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA CAMPUS GOVERNADOR  
VALADARES  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR - PMBQBM**

**Lorena Bruna Pereira de Oliveira**

**Identificação de parâmetros imunológicos, nutricionais e parasitológicos (*S. mansoni*)  
em um estudo caso-controle associado à hanseníase**

Governador Valadares

2020

**Lorena Bruna Pereira de Oliveira**

**Identificação de parâmetros imunológicos, nutricionais e parasitológicos (*S. mansoni*)  
em um estudo caso-controle associado à hanseníase**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora *campus* Governador Valadares como requisito para obtenção de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga  
Co-orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria

Governador Valadares

2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira, Lorena Bruna Pereira de.

Identificação de parâmetros imunológicos, nutricionais e parasitológicos (*S. mansoni*) em um estudo caso-controle associado à hanseníase / Lorena Bruna Pereira de Oliveira. -- 2020.

150 f.

Orientadora: Lucia Alves de Oliveira Fraga

Coorientadora: Ana Maria Caetano de Faria

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2020.

1. Hanseníase. 2. Esquistossomose. 3. Co-infecção. I. Fraga, Lucia Alves de Oliveira, orient. II. Faria, Ana Maria Caetano de, coorient. III. Título.

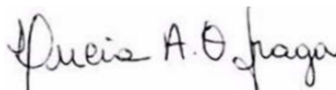
**Lorena Bruna Pereira de Oliveira**

**Identificação de parâmetros imunológicos, nutricionais e parasitológicos (*S. mansoni*)  
em um estudo caso-controle associado à hanseníase.**

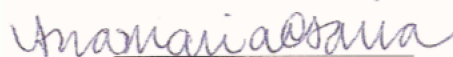
Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares como requisito para obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 03 de Fevereiro de 2020.

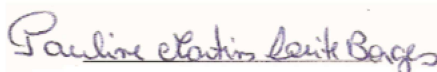
**BANCA EXAMINADORA**



Dr.(a) Lúcia Alves de Oliveira Fraga - Orientador(a)  
Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares



Dr.(a) Ana Maria Caetano de Faria - Coorientador(a)  
Universidade Federal de Minas Gerais



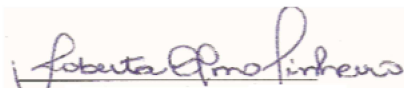
Dr.(a) Pauline Martins Leite Borges - Membro titular interno  
Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares



Dr.(a) Gabriella Freitas Ferreira - Membro titular interno  
Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares



Dr.(a) Maria Aparecida de Faria Grossi - Membro titular externo  
Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais





Dedico esse trabalho a Deus, família e amigos.  
“Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha  
fortaleza, e nele confiarei.” (SALMOS, 91:2)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

A minha família e amigos, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este estudo.

A Profa. Lucia, por ter sido minha orientadora e cumprido essa missão com muita dedicação e companheirismo.

A todos que participaram, direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

## RESUMO

Hanseníase, doença milenar e estigmatizante apresentou em 2017, prevalência global de 192.713 casos, sendo o Brasil o segundo país com maior número de casos novos. As ações de controle estão baseadas no diagnóstico, tratamento e vigilância dos contatos. Entretanto, essa enfermidade exige abordagens mais inovadoras para o real controle. Sabe-se que infecções causadas por parasitos bem como deficiências de micronutrientes podem coexistir com a hanseníase em áreas endêmicas no Brasil. Infecções crônicas por helmintos e má nutrição parecem estar associadas à supressão da resposta imunológica. Dessa forma, propõe-se determinar fatores de risco associados à hanseníase em um grupo de estudo considerando variáveis sócio-demográficas, imunológicas, hematológicas, parasitológicas (*S. mansoni*) e nutricionais. Foram incluídos 3 grupos, casos (com hanseníase PB, MB, n=79), contatos (assintomáticos, convivência com paciente, n=97) e controle negativo (assintomáticos sem história de hanseníase, n=81), atendidos nas ESF de Gov. Valadares e Limeira de Mantena. Foram aplicados questionários estruturados e após coleta de sangue e fezes foram realizados exames laboratoriais para avaliação da reatividade sorológica (IgG4Swap), determinação do perfil imunológico, hemograma e quantificação de micronutrientes. Foram aplicados diferentes testes estatísticos para análise. Destacou-se o baixo grau de escolaridade dos participantes. 75% (33) dos co-infectados apresentavam nível básico de escolaridade e apenas 7,9% (14) do grupo controle (contatos e controle negativo) possuíam ensino superior. 70% dos contatos residiam com o doente e 68% dos co-infectados não tinham hábito de tratar água para consumo. Não foi mostrada associação entre hanseníase da forma clínica multibacilar e esquistossomose, entretanto constatamos uma forte correlação entre hanseníase e infecção pelo *S. mansoni* com um aOR de 3,37 comparando o grupo de casos e controles e ainda mais forte, um aOR de 8,33 comparando casos e contatos. Provavelmente, nossa limitação em constatar associação entre a forma multibacilar e esquistossomose se deve ao pequeno número de casos com IB positivo, e também o pequeno número de participantes com esquistossomose ativa e ainda apresentando baixa carga parasitária. No painel de citocinas verificou-se que IL-10, citocina imunoreguladora, apresentou associação com o grupo de infectados pelo *S. mansoni*, bem como com o grupo co-infectado x controle negativo (estímulo ML) e mono infectado (SE, PHA e ML). A IL-4 também apresentou associação com o grupo co-infectado x contato (SE) e mono-infectado (ML). Esses dados reforçam a presença de citocinas imunoreguladoras e relacionadas à resposta Th2 no grupo co-infectado. Uma correlação positiva entre perfil de citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-2) e grupo controle foi constatada, como também

com o mono-infectado. Associação das quimiocinas IL-8 e IP-10 com o mono-infectado foi detectada. Indivíduos co-infectados apresentaram concentrações inadequadas de vitamina D. Concentrações adequadas de vitamina A foram observadas nos grupos controle negativo e contato. A deficiência de ferro associada a uma dieta pouco diversificada, juntamente com co-infecção, podem ser a causa da anemia observada em 55% dos indivíduos do grupo co-infectado que apresentaram parâmetros hematológicos (hemácia, hemoglobina, hematócrito) abaixo dos valores normais. Acreditamos que a continuidade desses estudos e o acompanhamento dos contatos são relevantes para melhor delinear fatores de risco.

Palavras-chave: Hanseníase. Esquistossomose. Co-infecção.

## ABSTRACT

Leprosy, an age-old and stigmatizing disease presented in 2018 a global prevalence of 184.212 cases, with Brazil being the second country with the highest number of new cases. Control actions are based on the diagnosis, treatment and surveillance of contacts. However, this disease requires more innovative approaches to real control. It is known that infections caused by parasites as well as micronutrient deficiencies can coexist with leprosy in endemic areas in Brazil. Chronic helminth infections and malnutrition appear to be associated with suppression of the immune response. Thus, it is proposed to determine risk factors associated with leprosy in a study group considering socio-demographic, immunological, hematological, parasitological (*S. mansoni*) and nutritional variables. Three groups were included, cases (with leprosy PB, MB, n = 79), contacts (asymptomatic, history of living with the patient, n = 97) and negative control (asymptomatic without history of leprosy, n = 81), attended at ESF in Gov. Valadares and Limeira de Mantena. Structured questionnaires were applied and after collection of blood and feces, laboratory tests were carried out to assess serological reactivity (IgG4-Swap), determine the immunological profile, blood count and micronutrient quantification. Different statistical tests were applied for analysis. The low level of education of the participants was highlighted. 75% (33) of the co-infected individuals had a basic level of education and only 7.9% (14) of the control group (contacts and negative control) had higher education. 70% of the individuals in the contact group lived with the patient and 68% of the individuals in the co-infected group were not in the habit of treating drinking water. There was no association between leprosy of the multibacillary clinical form and schistosomiasis, however we found a strong correlation between leprosy and infection by *S. mansoni* with an aOR of 3.37 comparing the group of cases and controls and even stronger, an aOR of 8, 33 comparing cases and contacts. Probably, our limitation in finding an association between leprosy in the multibacillary form and schistosomiasis is due to the small number of cases with positive BI and also the small number of participants with active schistosomiasis and still presenting low parasitic burden. In the cytokine panel, it was found that IL-10, an immunoregulatory cytokine, was associated with group of infected individuals (*S. mansoni*) as well as with the co-infected group x negative control (ML stimulus) and mono infected (SE, PHA and ML). IL-4 was also associated with the co-infected x contact (SE) and mono-infected (ML) group. These data reinforce the presence of immunoregulatory and Th2-related cytokines in the co-infected group. Furthermore, through logistic regression, a positive correlation between pro-inflammatory cytokine profile (IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-2) and control group was found. When the

group of co-infected and mono-infected was compared, an association of these cytokines with the mono-infected was detected. An association of chemokines IL-8 and IP-10 with the group of mono-infected was observed. Co-infected had inadequate concentrations of vitamin D, and adequate concentrations of vitamin A were observed in the negative control and contact groups. Iron deficiency associated with a poorly diversified diet, together with co-infection, may be the cause of anemia seen in 55% of individuals in the co-infected group who had hematological parameters (red blood cells, hemoglobin and hematocrit) below normal values. We believe that the continuity of these studies and the monitoring of contacts are relevant to better delineate risk factors.

Keywords: Leprosy. Schistosomiasis. Co-infection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Total de números de casos novos detectados de hanseníase no mundo. ....	22
Figura 2	- Classificação clínica, biológica e terapêutica da hanseníase .....	23
Figura 3	- Cinética das respostas de células T na infecção natural por <i>Schistosoma mansonii</i> em humanos.....	32
Figura 4	- O paradigma clássico da imunidade aos helmintos .....	33
Figura 5	- Distribuição da esquistossomose em área endêmica, por faixa de positividade, por município. Brasil, 2009 – 2017.....	37
Figura 6	- Metabolismo e sinalização da vitamina A .....	39
Figura 7	- O papel do ácido retinóico (AR) na modulação das respostas das células T auxiliares no intestino .....	41
Figura 8	- Via CD163 para captação de complexos hemoglobina-haptoglobina (HGB-Hp) .....	44
Figura 9	- A via intracelular para a degradação do heme subsequente à endocitose mediada por CD163 em macrófagos .....	45
Figura 10	- O IFN- $\gamma$ induz uma via antimicrobiana em monócitos/macrófagos humanos	48
Figura 11	- Via de ativação comum para macrófagos humanos estimulada pelo receptor da imunidade inata Toll Like-2 (TLR2) ou pelo receptor da imunidade adquirida, IFN- $\gamma$ .....	49
Figura 12	- Vitamina D e o eixo regulador do ferro hepcidina-ferroportina.....	50
Figura 13	- Limiar de reatividade para anticorpo IgG4 anti-SWAP .....	61
Figura 14	- Representação dos quadrantes no plano cartesiano .....	64
Figura 15	- Disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, comparando grupos de doentes e sadios por meio da análise de PCA.....	75
Figura 16	- Caracterização dos grupos doentes e sadios em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA .....	77
Figura 17	- Disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, comparando grupos de infectados e não infectados pelo <i>S. mansonii</i> por meio da análise de PCA .....	83
Figura 18	- Caracterização dos grupos de infectados e não infectados pelo <i>S. mansonii</i> em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais	

	por meio da análise de PCA .....	84
Figura 19	- Disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, comparando grupos de co-infectados e controle negativo por meio da análise de PCA.....	97
Figura 20	- Caracterização do grupo co-infectado e controle negativo em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA .....	98
Figura 21	- Disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, comparando grupo co-infectado e contato por meio da análise de PCA .....	99
Figura 22	- Caracterização do grupo co-infectado e contato em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA .....	100
Figura 23	- Disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, comparando grupo co-infectado e mono-infectado por meio da análise de PCA.....	101
Figura 24	- Caracterização dos grupos de co-infectados e mono-infectados em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA .....	102



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Caracterização do grupo de estudo.....	68
Tabela 2	- Caracterização do grupo de doentes e de sadios por meio dos dados sócio-demográficos e parâmetros laboratoriais .....	72
Tabela 3	- Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais dos grupos de doentes versus sadios.....	74
Tabela 4	- Caracterização do grupo infectado e não infectado pelo <i>S. mansoni</i> através dos dados sócio-demográficos e parâmetros laboratoriais .....	79
Tabela 5	- Comparação da produção de citocinas e quimiocinas nos grupos infectados e não infectados pelo <i>S. mansoni</i> .....	81
Tabela 6	- Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais nos grupos infectado e não infectado pelo <i>S. mansoni</i> .....	82
Tabela 7	- Análise das características do grupo co-infectado versus controle negativo por meio do teste qui-quadrado .....	87
Tabela 8	- Análise das características do grupo co-infectado versus contato por meio do teste qui-quadrado .....	90
Tabela 9	- Análise das características do grupo co-infectado versus mono-infectado por meio do teste qui-quadrado .....	93
Tabela 10	- Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais nos grupos co-infectados e controle negativo.....	95
Tabela 11	- Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais nos grupos co-infectado e contato .....	96
Tabela 12	- Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais nos grupos co-infectado e mono-infectado.....	96
Tabela 13	- Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e controle negativo.....	103
Tabela 14	- Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e controle negativo .....	104
Tabela 15	- Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e controle negativo .....	105
Tabela 16	- Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e contato .....	106
Tabela 17	- Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e contato .....	107
Tabela 18	- Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e contato .....	108

Tabela 19	-	Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e mono-infectado	109
Tabela 20	-	Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e mono-infectado	109
Tabela 21	-	Análise de regressão logística entre o grupo co-infectado e mono-infectado	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25D	1,25-dihidroxitamina D
25D	1,25-dihidroxitamina D
Ad	<i>Ancylostoides duodenale</i>
ADH	Álcool desidrogenase
AIC	<i>Akaike</i>
Al	<i>Ascaris lumbricoides</i>
ALDH	Retinaldeído desidrogenase
ALDH1 $\alpha$	Enzima retinaldeído desidrogenase 1 $\alpha$
AR	Ácido retinóico
AsHb	Antígeno de <i>Ascaris</i>
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	Borderline Borderline
BCG	Bacilo Calmette-Guérin.
BL	Borderline Lepromatoso
BSA	Albumina de soro bovino a 1%
BT	Borderline Tuberculoide
CBA	Cytometric Bead Array
CCL2/MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
CCL5/RANTES	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
CD163	<i>Cluster of Differentiation 163</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CO	Monóxido de carbono
CRABPII	Ácido retinóico celular
CREDEN-PES	Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Controle Especial
CREDEN-PES	Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais
<i>Cut off</i>	Limiar da reatividade
CXCL10/IP-10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10/Interferon Gamma-Induced Protein 10</i>
CXCL8/IL-8	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 8/Interleucina-8</i>

CXCL9/MIG	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9)/Monokine induced by gamma interferon</i>
CYP27B1	Citocromo P27B1
DCs	Células dendríticas
DEFB4	$\beta$ -defensina 2
Dim-1	Dimensão 1
Dim-2	Dimensão 2
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
ESF	Estratégia da Saúde da Família
ESF	Estratégia de Saúde da Família
FABP5	Proteína de ligação a ácidos graxos
Fp:	Ferroportina
HAMP-Fp	Hepcidina-ferroportina
HCT	Hematócrito
HEMAC	Hemácia
HGB	Hemoglobina
HGB-Hp	Hemoglobina-haptoglobina
HO-1	Heme oxigenase-1
Hp	Haptoglobina
IB	Índice baciloscópio
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenase
IFN- $\beta$	Interferon- $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-15	Interleucina-15
IL-17	Interleucina-17
IL-17A	Interleucina-17 <sup>a</sup>
IL-17F	Interleucina-17F
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-21	Interleucina-21
IL-22	Interleucina-22

IL-23	Interleucina-23
IL-35	Interleucina-35
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
LID-1	Leprosy Infectious Disease Research Institute Diagnostic-1
LL	Lepra Lepromatosa
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MB	Multibacilar
MBA	<i>Multiplex Bead Assays</i>
ML	<i>M. leprae</i>
MS	Ministério da Saúde
Na	<i>Necator americanus</i>
NDO	<i>Natural Octyl Disaccharide</i>
NIE	Antígeno de <i>S. stercoralis</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
OPG	Ovos por grama de fezes
PB	Paucibacilar
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	Análise de componentes principais
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGL-I	Glicolípido fenólico-I
PHA	Fitohemaglutinina
PPAR $\beta/\delta$	Receptor proliferador ativado por peroxissomo
PQT	Poliquimioterapia
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RAR	Receptor do ácido retinóico
RARE	Elementos de respostas do retinol
RR	Reação Reversa
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SEA	<i>Soluble egg antigen</i>

Sm	Salário mínimo
<i>SmCB</i>	<i>S. mansoni</i> - catepsina B1
SMS/GV	Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares
Ss	<i>Strongyloides stercoralis</i>
STRA6	Receptor estimulador do ácido retinóico 6
SUS	Sistema Único de Saúde
SWAP	<i>Soluble antigen preparation of adult schistosomes</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de célula T
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento- $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
Treg	Células T reguladora
TRL-2	Toll Like-2
TT	Tuberculoide
UV	Luz ultravioleta
UV	Ultravioleta
VDR	Receptor de vitamina D

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1	EPIDEMIOLOGIA .....	21
2.2	CLASSIFICAÇÃO.....	22
2.3	TRANSMISSÃO E DIAGNÓSTICO .....	24
2.4	RESPOSTA IMUNE.....	26
<b>2.4.1</b>	<b>Quimiocinas .....</b>	<b>29</b>
2.5	CO-INFECÇÃO POR HELMINTOS E HANSENÍASE.....	31
<b>2.5.1</b>	<b>Epidemiologia da Esquistossomose.....</b>	<b>36</b>
2.6	DEFICIÊNCIA DE MICRONUTRIENTES E HANSENÍASE .....	37
<b>2.6.1</b>	<b>Vitamina A.....</b>	<b>38</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Ferro e ferritina.....</b>	<b>42</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Vitamina D.....</b>	<b>46</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>52</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>54</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	54
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	54
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>55</b>
5.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO .....	55
<b>5.1.1</b>	<b>Desenho do estudo .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Considerações éticas.....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Confidencialidade.....</b>	<b>57</b>
5.2	COLETA DE SANGUE PARA OS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS .....	57
<b>5.2.1</b>	<b>Separações de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....</b>	<b>58</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Obtenção de sobrenadantes de cultura de PBMC.....</b>	<b>58</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Antígeno .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Ensaio de citocinas e quimiocinas .....</b>	<b>59</b>
5.3	EXAME DE FEZES E ENSAIO SOROLÓGICO PARA <i>S. mansoni</i> .....	60
5.4	AVALIAÇÃO DE MICRONUTRIENTES E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	61
<b>6</b>	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>62</b>
6.1	TESTE DE MANN-WHITNEY .....	62
6.2	TESTE T STUDENT .....	62

6.3	TESTE QUI QUADRADO .....	62
6.4	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) .....	63
<b>7</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
7.1	TÓPICO I CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO .....	66
7.2	TÓPICO II CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO <i>M. leprae</i> .....	70
7.2.1	Avaliação dos parâmetros laboratoriais dos grupos de doentes <i>versus</i> sadios por meio do teste <i>Mann-Whitney</i> .....	74
7.2.2	Características do grupo de doentes <i>versus</i> sadios por meio da análise de PCA.....	74
7.3	TÓPICO III CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO POR <i>S. mansoni</i> .....	78
7.3.2	Análise das características do grupo infectado e não infectado pelo <i>S. mansoni</i> por meio da análise de PCA .....	82
7.4	TÓPICO IV ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS À CO-INFECÇÃO (HANSENÍASE + ESQUISTOSSOMOSE).....	85
7.4.1	Teste qui-quadrado análise das características do grupo co-infectado <i>versus</i> controle negativo.....	86
7.4.2	Análise de PCA análise das características do grupo co-infectado <i>versus</i> controle negativo.....	97
7.4.3	Regressão logística análise das características do grupo co-infectado <i>versus</i> controle negativo.....	103
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>117</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>118</b>
	<b>APÊNDICE A – Questionário .....</b>	<b>138</b>
	<b>APÊNDICE B - Parecer consubstanciado do CEP .....</b>	<b>143</b>
	<b>APÊNDICE C - Contribuição das variáveis para dimensão 1 e 2 na análise de PCA ...</b>	<b>144</b>
	<b>APÊNDICE D – Execução do trabalho .....</b>	<b>147</b>
	<b>APÊNDICE E - Co-autoria em artigos publicados na área .....</b>	<b>148</b>
	<b>APÊNDICE F – Participação em eventos científicos .....</b>	<b>149</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica, infectocontagiosa, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), bactéria intracelular obrigatória com uma predileção por infectar nervos periféricos e pele. O *M. leprae* causa uma infecção complexa com um espectro de diferentes manifestações clínicas e respostas imunológicas (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015). A hanseníase multibacilar (MB), é notável por uma fraca resposta Th1 e pela presença de citocinas associadas ao perfil Th2. Acredita-se que os casos MB sejam a fonte de infecções para outros indivíduos suscetíveis, enquanto os casos paucibacilares (PB) têm uma resposta Th1 característica e são considerados menos infectados (NATH; SAINI; VALLURI, 2015). Ainda não está bem compreendido porque alguns pacientes desenvolvem a forma PB e outros a forma MB, mas, acredita-se que este fato esteja relacionado à suscetibilidade do hospedeiro, envolvendo fatores imunológicos e genéticos (SAPKOTA *et al.*, 2010; SCHREUDER; NOTO; RICHARDUS, 2016; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

O baixo poder aquisitivo também está associado à infecção, mas a maneira como isso contribui para transmissão é desconhecido. Alguns fatores têm sido propostos e incluem superpopulação, solo contaminado e desnutrição (CABRAL-MIRANDA *et al.*, 2014; FEENSTRA *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2014). As infecções por helmintos são predominantemente relacionadas à pobreza e condições sanitárias afetando cerca de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo (BRASIL, 2014; OPAS, 2017). Além disso, co-infecções por helmintos têm se mostrado associadas à doença multibacilar em alguns estudos, com a hipótese de que a ativação crônica da resposta imune Th2 por helmintos torna o indivíduo mais propenso a desenvolver a forma mais grave da doença (DINIZ *et al.*, 2001, 2010). Portanto, a manutenção do *M. leprae* na comunidade pode aumentar quando as co-infecções estão presentes. A sobreposição espacial de infecções por helmintos e hanseníase, poderia dar suporte a essa hipótese e apoiar mais estudos e expandir estratégias de controle (FEENSTRA *et al.*, 2011).

No Brasil, esforços coordenados para combater as infecções por helmintos e hanseníase ocorreram em 2013 como parte do “Plano Estratégico Integrado de Ação para a eliminação da hanseníase, filariose linfática, oncocercose, esquistossomose, tracoma como causa da cegueira e controle das geohelmintíase”. Este programa caracteriza-se principalmente pela proposição de estratégias de busca ativa de casos e tratamento oportuno, considerando-se, neste contexto, quando indicado, as intervenções de tratamento coletivo. Além da busca ativa o programa realiza campanhas de administração de medicamentos em massa em crianças em idade escolar (BRASIL, 2012).

A escassez de alimentos tem sido associada a fatores que poderiam contribuir para o desenvolvimento da hanseníase (FEENSTRA *et al.*, 2011). Sabe-se que essa escassez piora a ingestão de micronutrientes. As deficiências nutricionais prejudicam o sistema imunológico e, portanto, a defesa do organismo contra infecções. O risco de contrair a infecção subclínica pelo *M. leprae* não é necessariamente aumentada pela escassez de alimentos, mas pode facilitar a progressão da infecção para o desenvolvimento das formas clínicas da hanseníase (WINTERGERST; MAGGINI; HORNIG, 2007).

A deficiência nutricional pode afetar a resposta imune, uma vez que certos micronutrientes são importantes para a manutenção da integridade das barreiras naturais, bem como, o funcionamento adequado dos diferentes componentes do sistema imunológico, como resposta celular e produção de anticorpos (MAGGINI *et al.*, 2007). Como os nutrientes têm um efeito regulador nas respostas imunes inatas e adaptativas, um equilíbrio perfeito em suas concentrações é importante para melhorar a resposta imune contra os patógenos (VÁZQUEZ *et al.*, 2014).

Diante do exposto, o presente estudo pretende analisar a associação entre hanseníase, infecções parasitárias e deficiências de micronutrientes, na transmissão e manifestações clínicas da hanseníase.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Nessa seção serão apresentados o embasamento teórico do trabalho.

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA

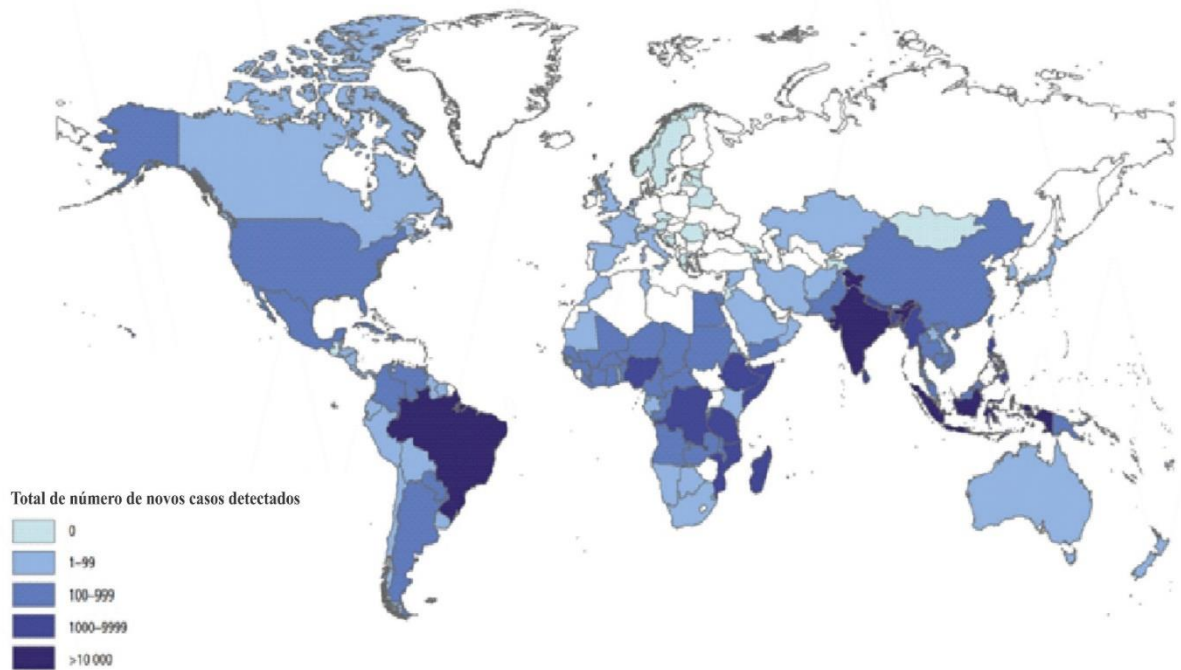
A hanseníase é endêmica em países tropicais, especialmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Sua prevalência diminuiu acentuadamente desde a introdução da poliquimioterapia (PQT) no início da década de 1980. No entanto, em 2018 a prevalência global registrada da doença foi 184.212 casos (0,24 /10.000 habitantes) (WHO, 2016).

O Brasil ocupa o segundo lugar em número absoluto de casos, com a Índia sendo o primeiro país no ranking mundial (FIGURA 1). De acordo com os dados publicados em 2018 pelo Ministério da Saúde (MS), o Brasil no período de 2012 a 2016, registrou 151.764 casos novos de hanseníase, o que equivale a uma taxa média de detecção de 14,97 casos novos para cada 100 mil habitantes. Entre estes, 84.447 casos novos ocorreram no sexo masculino, o que corresponde a 55,6% do total. A análise dos indicadores por macrorregião mostrou que a doença está distribuída de forma desigual pelas diferentes regiões do país, com as seguintes prevalências por 10.000 habitantes: 3,72 no Centro-Oeste, 3,42 no Norte, 2,34 no Nordeste, 0,53 no Sudeste e 0,37 no Sul (BRASIL, 2018).

No Estado de Minas Gerais em 2016, foram notificados 1.106 novos casos de hanseníase. A situação da doença no estado apresenta-se de forma bastante heterogênea com 45 municípios hiperendêmicos, 56 de muito alta endemia, 74 de alta endemia, 121 de média endemia e 22 de baixa endemia. Ainda no ano de 2016, o coeficiente de detecção de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes foi de 5,7. A proporção de casos novos em menores de 15 anos e de casos novos de hanseníase com grau 2 de incapacidade no momento do diagnóstico foi de 5,1% e 13,9%, respectivamente. De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), as incapacidades físicas na hanseníase são importantes sinalizadores do diagnóstico tardio (WHO, 2016). Além disso, a identificação de casos de hanseníase em crianças menores de 15 anos de idade pode ajudar a fornecer estimativas de transmissão contínua e a presença de focos ativos de doença na comunidade (EZENDUKA *et al.*, 2012).

No contexto epidemiológico do Estado de Minas Gerais, destaca-se a cidade de Governador Valadares, considerada hiperendêmica (taxa de prevalência, em 2001, de 11,3 casos/10.000 habitantes), de acordo com parâmetros do Ministério da Saúde e da Organização Mundial de Saúde (MINAS GERAIS, 2002).

Figura 1 - Total de números de casos novos detectados de hanseníase no mundo



Fonte: WHO (2016).

Nota: Os dados são reportados pela OMS e correspondem ao ano de 2017.

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO

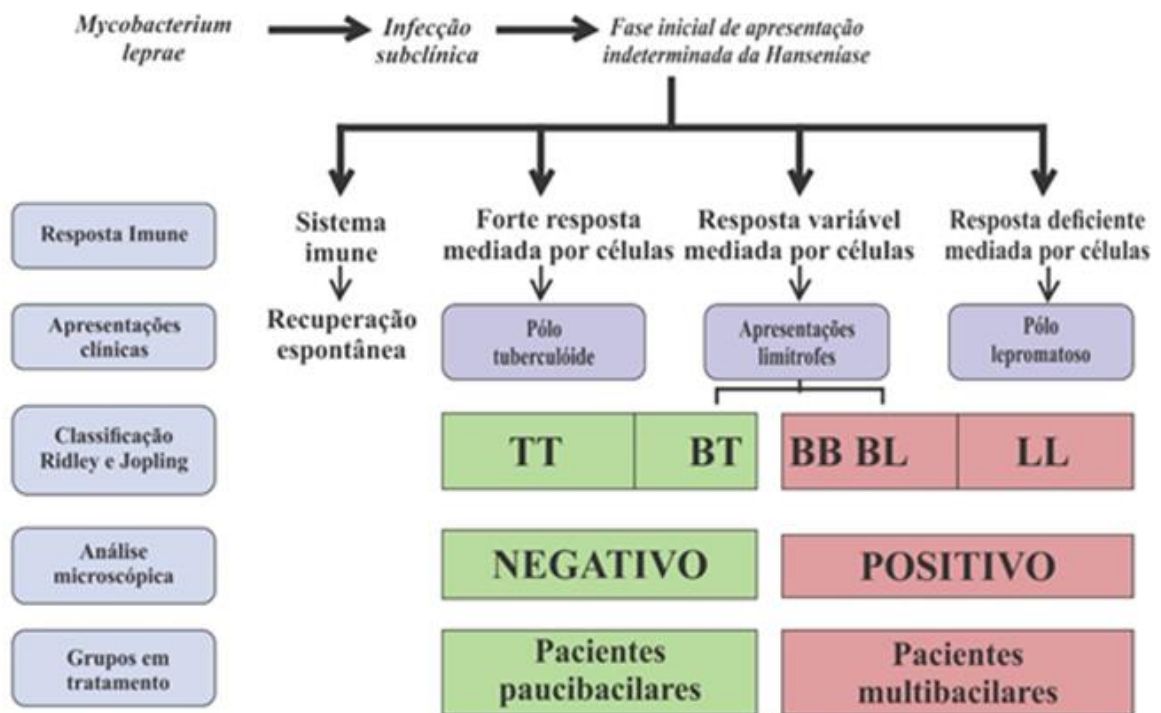
A hanseníase é uma doença de nervos periféricos e pele, causada pelo *M. leprae*, bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (SAINI *et al.*, 2017). A variabilidade clínica da hanseníase é essencialmente determinada pelo tropismo do microrganismo pela pele, pelo tecido nervoso periférico e pela suscetibilidade geneticamente determinada e individualmente variável do paciente ao *M. leprae* (FISCHER *et al.*, 2008).

No contexto científico, a classificação de Ridley & Jopling tem sido usada desde 1966 e está baseada no quadro histológico. Além das duas formas polares de hanseníase tuberculóide (paucibacilar) e lepromatosa (multibacilar), inclui um estágio intermediário amplo (tipo borderline). Dependendo da proximidade clínica e histológica de uma das duas formas polares, esse estágio intermediário é subdividido em três subgrupos: borderline tuberculóide (BT), borderline borderline (BB) e borderline lepromatosa limítrofe (BL), figura 2.

Para fins de tratamento, deve-se utilizar a classificação operacional de caso de hanseníase, que se baseia no número de lesões cutâneas. De acordo com essa classificação, são considerados pacientes com doença paucibacilar (PB), aqueles que apresentam até cinco lesões, enquanto que pacientes que apresentam mais de cinco lesões são classificados como multibacilar (MB). Além disso, um resultado positivo de esfregaço cutâneo e a presença de

mais de um nervo comprometido resultam na classificação do caso como MB, independentemente do número de lesões cutâneas (BRASIL, 2016).

Figura 2 - Classificação clínica, biológica e terapêutica da hanseníase



Legenda: TT: tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: lepromatosa limítrofe; LL: lepromatosa.

Fonte: REIBEL; CAMBAU; AUBRY (2015).

Os indivíduos com diagnóstico de hanseníase podem apresentar antes, durante ou mesmo após o tratamento as reações hansênicas (tipos 1 e 2). As reações são alterações do sistema imunológico que se exteriorizam como manifestações inflamatórias agudas e subagudas, podendo ocorrer em qualquer paciente, porém são mais frequentes nos pacientes MB (MOTTA *et al.*, 2012; SCOLLARD; JOYCE; GILLIS, 2006).

A Reação Tipo 1 ou Reação Reversa (RR) caracteriza-se pelo aparecimento de novas lesões dermatológicas (manchas ou placas), infiltração, alterações de cor e edema nas lesões antigas, com ou sem espessamento e dor de nervos periféricos (neurite). A Reação Tipo 2, cuja manifestação clínica mais frequente é o Eritema Nodoso Hansênico (ENH), caracteriza-se pelo aparecimento de nódulos subcutâneos dolorosos, acompanhados ou não de manifestações sistêmicas como febre, dor articular, mal-estar generalizado, orquite (inflamação dos

testículos), iridociclites (inflamação da parte anterior do olho), com ou sem espessamento e dor de nervos periféricos (neurite) (SCOLLARD *et al.*, 2011).

### 2.3 TRANSMISSÃO E DIAGNÓSTICO

Acredita-se que a transmissão da hanseníase ocorre pelo convívio próximo e prolongado entre um indivíduo suscetível e um paciente infectado pelo bacilo, por meio da inalação de bacilos contidos na secreção nasal. A principal via de transmissão é a mucosa nasal (DA COSTA MARTINS *et al.*, 2010; JOB *et al.*, 2008; KLATSER *et al.*, 1993; SHEPARD, 1962). O contato estreito e contínuo de um indivíduo saudável com um paciente sem tratamento é o principal determinante na transmissão da hanseníase, não sendo esta proximidade limitada apenas a contatos domiciliares, mas também a vizinhos e pessoas com relações sociais próximas. Pesquisas demonstraram que a maioria dos novos casos de hanseníase teve contato com doentes sem tratamento (DOUGLAS *et al.*, 2004; MOET *et al.*, 2006).

Em 2017 Romero-Montoya, realizando um estudo transversal com objetivo de avaliar a transmissão familiar da hanseníase na Colômbia, verificaram que 4,1% dos 543 contatos domiciliares apresentavam títulos de anticorpos IgM anti-PGL-I e 16% apresentavam o DNA do *M. leprae*, além disso, dois novos casos de hanseníase foram detectados entre os contatos domiciliares.

O MS por meio da Secretaria de Vigilância em Saúde (2016) estabelece o monitoramento dos contatos domiciliares e sociais por meio da avaliação dermatológica e a vacinação com o Bacilo Calmette-Guérin (BCG), como estratégia para o controle da hanseníase. Devido ao longo período de incubação do *M. leprae* no hospedeiro, a população em geral deve ser mantida sob constante vigilância, particularmente em áreas endêmicas (DE SOUZA *et al.*, 2016).

Supõe-se que indivíduos infectados, mesmo aqueles que não desenvolveram a doença, podem ter um período transitório de liberação nasal de bacilos (KATSER *et al.*, 1993; HATTA *et al.*, 1995; VAN BEERS, 1996). A presença de seqüências específicas de DNA do *M. leprae* em swabs ou biópsias nasais e a soropositividade para antígenos específicos do bacilo em indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas sugerem que o portador desempenha um papel na transmissão da hanseníase (FINE *et al.*, 1997; GROSSI *et al.*, 2008; JOB *et al.*, 2008; MOET *et al.*, 2006; PATTYN *et al.*, 1993).

Outro fator importante na transmissão da hanseníase é o tipo de forma clínica e a carga bacilar do paciente (MARTINS *et al.*, 2012). Foi demonstrado que contatos com maior risco de

contrair hanseníase são próximos a pacientes multibacilares (MB), uma vez que, apresentam alta carga bacilar (MOET *et al.*, 2004; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015)

Historicamente, o diagnóstico da hanseníase baseia-se na avaliação clínica da hanseníase em lesões suspeitas e o uso de um teste de raspado de pele denominado baciloscopia, o que permite o profissional de saúde determinar o índice bacteriológico (IB), que determina a carga bacteriana. De fato, diretrizes da OMS existentes referem-se às avaliações dos sintomas clínicos e a classificação como principais ferramentas para o diagnóstico, mas esses métodos apresentam deficiências (WHO, 2016).

Avaliação clínica detecta a doença já instalada, e não detecta uma infecção subclínica. Sendo assim, não consegue diagnosticar os indivíduos infectados, mas ainda assintomáticos. Além disso, a baciloscopia é um método invasivo e não possui sensibilidade suficiente para detectar a hanseníase paucibacilar (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).

Existe uma clara necessidade de testes de diagnósticos com preço acessível, altamente específicos e sensíveis que sejam capazes de detectar infecção subclínica e, que poderiam ser usados tanto para confirmar o diagnóstico em pessoas com lesão suspeita de hanseníase bem como para rastrear contatos assintomáticos de pacientes (BAHMANYAR *et al.*, 2016; CORSTJENS *et al.*, 2016).

Os kits de testes sorológicos geralmente contam com a medição de anticorpos contra o glicolípido fenólico-I (PGL-I), antígeno específico do *M. leprae*. No entanto, as concentrações de anticorpos anti-PGL-I são frequentemente detectadas em baixos títulos em pacientes com hanseníase paucibacilar (GELUK; DUTHIE; SPENCER, 2011).

A atualmente está disponível o teste de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) baseado no conjugado NDO-LID. O antígeno *natural octyl disaccharide* (NDO) é análogo do PGL-I. Neste teste o NDO está associado a uma proteína recombinante que representa a fusão dos genes MI0405 e MI2331, que é denominada LID por ser produzida no *Leprosy Infectious Disease Research Institute* Diagnostic-1 (LID-1). Duthie (2014) demonstra que o teste para a maioria dos pacientes com hanseníase multibacilar apresentou resultado positivo.

Estudos de pacientes com hanseníase na Colômbia e nas Filipinas sugeriram que este teste poderia eventualmente substituir a baciloscopia para confirmar a hanseníase multibacilar por causa de sua boa sensibilidade (95,7%) e especificidade (93,2%) (DUTHIE *et al.*, 2014, 2016).

Testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos da subclasse IgG1 antígeno-específicos também tem se apresentado como uma ferramenta útil para diferenciar pacientes

MB de PB, e indicam o melhor desempenho dos antígenos LID-1 e NDO-LID no sorodiagnóstico da hanseníase (MARÇAL *et al.*, 2018).

Considera-se que os esforços para interromper a cadeia de transmissão da hanseníase se beneficiariam muito por meio de uma ferramenta de diagnóstico que pudesse diagnosticar precocemente a infecção ao invés da doença já instalada (DUTHIE *et al.*, 2016).

A caracterização do genoma do *M. leprae* tornou possível o desenvolvimento de técnicas como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR-reação em cadeia da polimerase) que pode amplificar diferentes regiões genômicas. O aumento da confiabilidade e eficiência técnica da *quantitative PCR* (qPCR) a torna uma ferramenta promissora para o diagnóstico precoce da hanseníase (GOULART; GOULART, 2008; KAMPIRAPAP *et al.*, 1998; KANG *et al.*, 2003). Gama (2018), avaliando 43 casos e 113 contatos domiciliares, verificaram que 23,89% dos contatos domiciliares assintomáticos apresentaram DNA bacilar em amostras de raspado dérmico e sangue utilizando a qPCR. Considerando que os contatos domiciliares compreendem um grupo reconhecível de indivíduos com alto risco de adoecer, uma vez que vivem próximo a uma fonte de infecção, os autores concluem que a qPCR pode ser usada para estimar o risco de adoecimento entre contatos domiciliares e além disso, ser empregada como método de triagem para protocolo quimioprofilático.

## 2.4 RESPOSTA IMUNE

A diferenciação de células TCD4+*naive* em células T auxiliares efetoras é iniciada pelo acoplamento de seu receptor de célula T (TCR) e moléculas co-estimulatórias, na presença de citocinas específicas produzidas pelo sistema imune inato, após o processamento de patógenos pelas células apresentadoras de antígeno (APC). As citocinas interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-12 (IL-12) iniciam a diferenciação de células Th1, que são caracterizadas pela alta produção de IFN- $\gamma$  e são indispensáveis para a remoção de patógenos intracelulares. Em contraste, interleucina-4 (IL-4) desencadeia a diferenciação das células T *naive* em células Th2. As células Th2 são fundamentais na organização da defesa contra patógenos extracelulares e, auxiliam as células B a produzir anticorpos. Para que ocorra a diferenciação de ambas as células Th1 e Th2, é necessário que as células do sistema imune inato respondam a antígenos microbianos, antígenos parasitários ou alérgenos. Sabe-se que as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 antagonizam-se. Este paradigma da diferenciação de células T auxiliares Th1/Th2, que foi introduzido por Mosmann & Coffman (1989), ajudou a explicar muitos fenômenos na imunidade adaptativa.



Recentemente, o paradigma Th1/Th2 foi expandido e, a descoberta de células TCD4+ caracterizadas por secreção de interleucina-17 (IL-17) e a célula TCD4 FOXP3+ reguladora (Treg) teve um grande impacto na compreensão dos processos imunológicos inicialmente explicados pelo paradigma Th1/Th2 (SAINI; RAMESH; NATH, 2013).

As células CD4+Th17 têm papel importante na inflamação autoimune, na eliminação de patógenos e na patologia tecidual (BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007; CURTIS; WAY, 2009; PARK *et al.*, 2005). O desenvolvimento de células Th17 é dependente de várias citocinas que podem agir isoladamente ou em sinergismo com outras citocinas (MCGEACHY *et al.*, 2007). As citocinas pró-inflamatórias, interleucina-6 (IL-6), interleucina-21 (IL-21) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), juntamente com concentrações mínimas de fator de transformação de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), direcionam as células T na diferenciação de Th17 e inibem a diferenciação de Treg (DEENICK; TANGYE, 2007; MCGEACHY *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2007). Vários estudos vêm demonstrando que a interleucina-23 (IL-23) é necessária para manutenção de células Th17 (BETTELLI *et al.*, 2006; MANGAN *et al.*, 2006; STRITESKY; YEH; KAPLAN, 2008; VELDHOEN *et al.*, 2006). Essas células produzem interleucina-17A (IL-17A), interleucina-17F (IL-17F) e interleucina-22 (IL-22), que levam à inflamação e destruição tecidual (OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008; ZHENG *et al.*, 2007).

Por outro lado, as células Treg têm um papel supressor e regulam a inflamação, mantendo a tolerância (BETTELLI *et al.*, 2006; SAKAGUCHI, 2004, 2008). As células Treg são células imunossupressoras e exercem sua ação através da produção de IL-10, interleucina-35 (IL-35) e TGF- $\beta$  (KUMAR *et al.*, 2013; SAINI; RAMESH; NATH, 2014; TARIQUE *et al.*, 2017). Alguns estudos mostraram que o aumento de Tregs em pacientes com hanseníase, resultou na supressão da resposta imune do hospedeiro. A produção de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- $\beta$  por células Th2 e Tregs podem promover alteração na resposta para o *M. leprae* (SAINI; RAMESH; NATH, 2014; TARIQUE *et al.*, 2017).

Sabe-se que a IL-10 secretada por diferentes células desempenha um papel importante na patogenia da hanseníase (KUMAR *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2013). Exerce função imunossupressora em vários níveis do sistema imune, incluindo a modulação de apresentação de antígeno pelas células apresentadoras de antígenos (APC), a inibição da proliferação de células T, aumentando e mantendo a função de células Tregs (DE WAAL MALEFYT; YSSEL; DE VRIES, 1993; MURAI *et al.*, 2009). Um estudo realizado por Tarique *et al.*, (2017), demonstraram que a IL-10 secretada por células B reguladoras (B regs), aumenta a diferenciação e a função de Tregs. Esses mesmos autores, também mostraram que o aumento

de células produtoras de TGF- $\beta$  e IL-10 está associado à supressão mediada por células T reguladoras.

O TGF- $\beta$  é uma citocina importante para a atividade imunorreguladora de células Tregs (MASSAGUÉ, 2012). Desempenha um papel importante em doenças causadas por microrganismos intracelulares. Estudos *in vitro* e *in situ* confirmam maior produção de TGF- $\beta$  em pacientes lepromatosos, o que contribui para o meio anti-inflamatório e a persistência bacilar observados neste pólo (AARÃO *et al.*, 2014; PETITO *et al.*, 2013; SAINI; RAMESH; NATH, 2014; VENTURINI *et al.*, 2011). Um estudo realizado por Saini *et al.*, 2016, mostraram que pacientes com reações hansênicas apresentam um desequilíbrio nas populações Th17 e Treg, verificando uma redução na atividade das células Treg associada à maior atividade da célula Th17. O efeito combinado de baixa concentração de TGF- $\beta$  e o aumento das citocinas IL-6 e IL-21 influencia o equilíbrio entre as células Th17 e Treg nas reações da hanseníase. O aumento das citocinas associadas às células Th17 pode contribuir para a inflamação.

A polarização da resposta imune específica ao *M. leprae* é um elemento importante na patogênese da hanseníase e na determinação da manifestação clínica. A resposta de citocinas do tipo Th1 foi demonstrada em lesões de pacientes tuberculóides (TT), enquanto uma resposta de citocinas do tipo Th2 foi associada a formas lepromatosas (LL) (MODLIN, 2002; SALGAME *et al.*, 1992). A resposta imune de pacientes com a forma TT é caracterizada por uma resposta de citocinas Th1, como IFN- $\gamma$ , interleucina-2 (IL-2), interleucina-15 (IL-15) e fator de necrose tumoral (TNF), representando uma resposta com capacidade de contenção dos bacilos em granulomas bem formados (BHAT; PRAKASH, 2012; SALGAME *et al.*, 1992). Em contraste, a resposta imune de pacientes com a forma LL é caracterizada por um perfil Th2 com produção de IL-4 e IL-10 e ativação de células Treg, produção de anticorpos incluindo formação de complexos imunes e falha em restringir o crescimento do *M. leprae*. Palermo *et al.*, (2012) relataram um número maior de Tregs, maior expressão de IL-10 e antígeno de linfócito T citotóxico-4 (CTLA-4) em lesões da forma LL do que lesões da forma TT.

O equilíbrio das respostas Th1/Th2, por si só, não explica totalmente a resposta na hanseníase. As células Tregs produtoras de TGF- $\beta$  podem suprimir a função das células T efetoras. Essas células estavam aumentadas em pacientes da forma LL estáveis, o que pode explicar a anergia associada com essa forma clínica da hanseníase (SADHU *et al.*, 2016). Por outro lado, as células Th17 leva à inflamação e destruição tecidual, recrutamento de neutrófilos, ativação de macrófagos e aumento das células efetoras Th1 (SAINI *et al.*, 2016; BUHL *et al.*, 2015). Embora vários estudos tenham demonstrado um papel protetor da IL-17 contra outros patógenos intracelulares e doenças associadas, relativamente poucos trabalhos investigaram o

papel dessas citocinas na hanseníase (OKADA *et al.*, 2015). Sadhu *et al.* (2016) demonstraram que as células Th17 são mais frequentes em pacientes borderline tuberculóide (BT) e TT, em comparação com pacientes borderline lepromatosos (BL) e LL, e estas células potenciam a produção de IFN- $\gamma$  e inibem a produção de IL-10 pelas células T reguladoras. Isto sugere que as células Th17 também têm uma função protetora contra a infecção pelo *M. leprae* (SALGAME *et al.*, 1992).

Azevedo (2017) realizou um estudo com o objetivo de avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas associado às respostas do tipo Th1, Th2, Th17 e Treg em lesões de pele e amostras de soro de pacientes com hanseníase correlacionando com as formas clínicas da doença. Esses autores verificaram que as citocinas relacionadas com a população de células Th17 apresentaram um perfil misto, com um aumento significativo de IL-17A em pacientes TT, IL-21 em TT/BT, IL-22 e IL-23 em pacientes BB/BL/LL. Nos resultados apresentados pelo estudo, não foi possível determinar a predominância do perfil Th17 nos grupos TT ou TT/BT quando comparado com LL ou BB/BL/LL. Além disso, é importante mencionar que Saini (2013), demonstrou em biópsias de pele de pacientes, um aumento significativo de IL-17A em pacientes BT em comparação com os pacientes LL, mas não houve diferença para as outras isoformas de IL-17, IL-21 e IL-22.

#### 2.4.1 Quimiocinas

As quimiocinas formam uma grande família de pequenas citocinas e são capazes de controlar a migração e a residência de todas as células imunes. Algumas quimiocinas são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos, enquanto outras são consideradas pró-inflamatórias e sua liberação pode ser induzida durante uma resposta imune em um sítio de infecção (PALOMINO; MARTI, 2015).

Sabe-se que a formação de granulomas é fundamental para a restrição da infecção por micobactérias. Além disso, as citocinas TNF e IFN- $\gamma$  desempenham um papel central na formação do granuloma, mediante ativação e regulação de quimiocinas como a quimiocina C-C ligante-2 (CCL2) e CXC ligante-10 (CXCL10) (QIU *et al.*, 2001; ROACH *et al.*, 2002). O CCL2, também conhecido como proteína quimiotática macrófago-1 (MCP-1), é o quimiotático mais potente e ativador de monócitos, atraindo linfócitos TCD4 e  $\gamma$ - $\delta$ . As células de Schwann também são fonte de CCL2, que medeia o recrutamento de macrófagos após a lesão experimental do nervo (FISCHER *et al.*, 2008; TOFARIS *et al.*, 2002). Um estudo realizado

por Kirkaldy (2003), observou que a expressão de CCL2 e CCL5 está elevada nas lesões de pacientes BT que apresentavam reação hansênica em comparação com os pacientes BT que não apresentavam reação.

Outra quimiocina importante é a CXCL10, também conhecida como *Interferon Gamma-Induced Protein 10* (IP-10), uma pequena proteína secretada por monócitos, células endoteliais e fibroblastos em resposta ao IFN- $\gamma$  (LUSTER; UNKELESS; RAVETCH, 1985). Seu efeito é mediado pelo receptor CXCR3 e correlaciona com doenças infecciosas inflamatórias e tumores (LIU *et al.*, 2011). O CXCL10 induz o recrutamento de células efetoras Th1 para locais de hipersensibilidade do tipo tardio e têm sido identificadas em lesões de pacientes TT (KAPLAN *et al.*, 1986). Stefani (2009) relataram que níveis séricos elevados de CXCL10 são observados em pacientes com reações hansênicas do tipo I, enquanto Scollard (2011) correlacionaram o aumento da expressão de CXCL10 no soro e em biópsias de pele de pacientes com reações hansênicas do tipo I, sugerindo um potencial papel dessa quimiocina como ferramenta de diagnóstico. Assim como a CXCL10, a quimiocina CXCL9/MIG é um membro da família CXC e, tem um papel importante na quimiotaxia de células imunes. É secretado por vários tipos de células, incluindo células imunes (linfócitos T, células NK, células dendríticas, macrófagos e eosinófilos) e células não imunes (células estreladas hepáticas, pré-adipócitos, células da tireóide, células endoteliais, células tumorais e fibroblastos) (ANTONELLI *et al.*, 2009; HOLT *et al.*, 2009; IKEDA *et al.*, 2014; MUTHUSWAMY *et al.*, 2008; SMIT *et al.*, 2003; TWOREK *et al.*, 2013). Geluk (2014) com o objetivo de promover diagnóstico precoce de reações hansênicas com a finalidade de prevenir danos teciduais, selecionaram citocinas e quimiocinas como biomarcadores e, verificaram que a IL-10 apresentava-se diminuída durante reações hansênicas do tipo 1, enquanto IFN- $\gamma$ , IP-10, CXCL9 e IL-17A apresentavam-se aumentados, esses dados indicam possíveis candidatos a biomarcadores associados à inflamação.

A quimiocina CXCL8/IL-8 recruta predominantemente neutrófilos, mas também monócitos e linfócitos T, que expressam os receptores IL-8, CXCR1 e CXCR2 (MOSER *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2003). Níveis circulantes de CXCL8 e CCL2 são encontrados na hanseníase lepromatosa (HASAN *et al.*, 2004; LEW; TADA, 2002).

Um estudo realizado por Kirkaldy (2003), ao investigar a expressão de quimiocinas e seus receptores em lesões cutâneas de hanseníase usando imunohistoquímica, demonstrou a presença de IL-8 nas lesões de hanseníase que não apresentavam neutrófilos. Este trabalho sugere o papel desta quimiocina, também como recrutadora de monócitos e linfócitos.

Apesar dos diversos estudos a respeito da resposta imunológica frente ao *M. leprae*, ainda se fazem necessárias mais pesquisas para compreender melhor a interação do *M. leprae* e a resposta imunológica montada pelo hospedeiro frente ao bacilo.

## 2.5 CO-INFECÇÃO POR HELMINTOS E HANSENÍASE

Sabe-se que as infecções por helmintos coexistem com a hanseníase em muitas regiões endêmicas, como no Brasil. No entanto, poucos estudos relatam sobre as interações entre hanseníase e helmintos. Estimativas sugerem que aproximadamente um terço da população humana global pode estar infectada com helmintos, causando importantes problemas de saúde pública, especialmente em regiões com falta de saneamento ou acesso limitado a água potável. Os helmintos são comumente referidos como vermes e incluem os nematóides, como *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis*, os trematódeos, como *Schistosoma mansoni*, e os cestóides, como as tênias. Muitos desses parasitas são transmitidos pelo solo e causam infecções gastrointestinais após a ingestão de alimentos ou água contaminada com seus ovos (GERBE *et al.*, 2016; MABBOTT, 2018).

A defesa do hospedeiro contra helmintos é orquestrada pela imunidade mediada por células Th2, caracterizada pelo aumento da expressão de citocinas como IL-4 e IL-13, além da produção de IgE e um aumento do número de eosinófilos (ALLEN; MAIZELS, 2011).

Um estudo realizado no Oeste da África, por Prost em 1979, com o objetivo de comparar a prevalência da hanseníase em bairros com alta e baixa prevalência de oncocercose, demonstrou que existia maior frequência de hanseníase lepromatosa em áreas onde o verme filarial, *Onchocerca volvulus*, era hiperendêmico. Este achado sugere que indivíduos com imunidade reduzida devido à infecção por oncocercose possuem maior chance de desenvolver a forma mais grave da hanseníase e qualquer outra infecção.

Em 1999, avaliando a resposta imune de crianças expostas tanto ao parasita, *Onchocerca volvulus*, como às infecções micobacterianas, *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae*, na República de Camarões, Stewart, verificaram um aumento da expressão de citocinas Th2 em crianças infectadas com oncocercose, assim, sugerindo que a infecção pelo helminto interferiu na resposta imunológica normal à infecção por micobactérias.

Em um estudo transversal retrospectivo posterior no Brasil, em 2001, Diniz e cols demonstraram uma associação entre infecções helmínticas transmitidas pelo solo e uma mudança para o pólo lepromatoso do espectro.

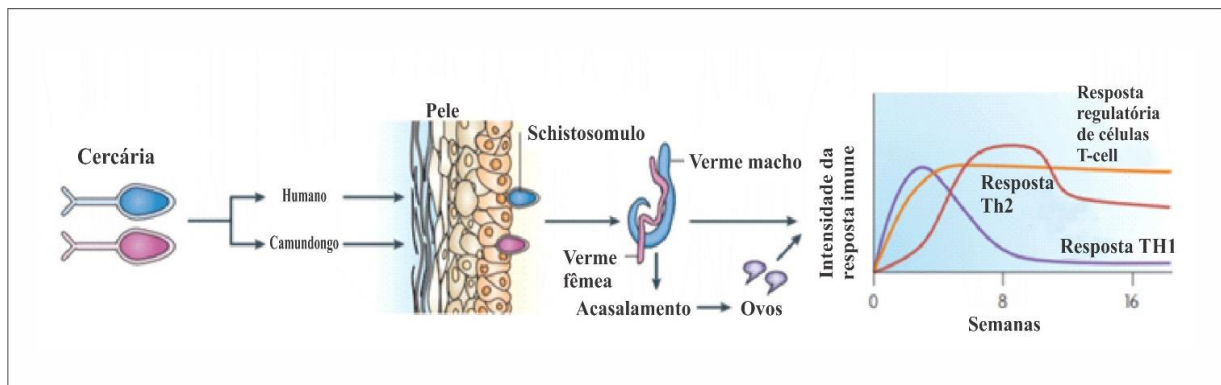
Por fim, um estudo de caso-controle do mesmo grupo confirmou essa associação em 2010 e, mostrou uma maior prevalência de helmintos transmitidos pelo solo em indivíduos com Hanseníase lepromatosa em comparação com os que apresentavam a forma clínica tuberculóide ou contatos domiciliares saudáveis.

Recentemente, Oktaria (2016), observaram que as infecções por helmintos transmitidas pelo solo podem ter um papel na progressão para a forma mais grave da Hanseníase, assim como, o desenvolvimento da reação Hansênica do tipo II.

Além da infecção por helmintos estar sendo associada à reação Hansênica, as helmintíases também têm sido demonstradas serem capazes de alterar a resposta imune do hospedeiro e, portanto, podem ter um papel importante no curso de várias doenças (MANGAN *et al.*, 2006).

Os helmintos são potentes moduladores da imunidade, como mostrado em humanos e estudos experimentais em animais. Tem sido mostrado que vários helmintos são capazes de induzir a ocorrência de células Tregs CD4+CD25+ (MAIZELS *et al.*, 2004; MAIZELS; YAZDANBAKHSI, 2003). Na esquistossomose, essas células T reguladoras controlam a resposta Th2, como mostra a figura 3 (HESSE *et al.*, 2004; MCKEE; PEARCE, 2004).

Figura 3 - Cinética das respostas de células T na infecção natural por *Schistosoma mansoni* em humanos



Fonte: FALLON; MANGAN (2007).

As cercárias masculinas e femininas penetram na pele do hospedeiro e, vermes machos e fêmeas adultos, residentes na veia mesentérica, copulam para eliminar ovos após 4-5 semanas. A intensidade da resposta imune durante o curso da infecção envolve uma resposta inicial Th1, que é substituída por resposta Th2 estimulada pelos antígenos de ovos ao mesmo tempo que ocorre o surgimento de um ambiente regulador de células T. As pessoas podem ficar infectadas

de forma crônica, desenvolvendo uma resposta moduladora prolongada, uma vez que, a expectativa de vida do verme em humanos é estimada em 5-10 anos (FIGURA 3).

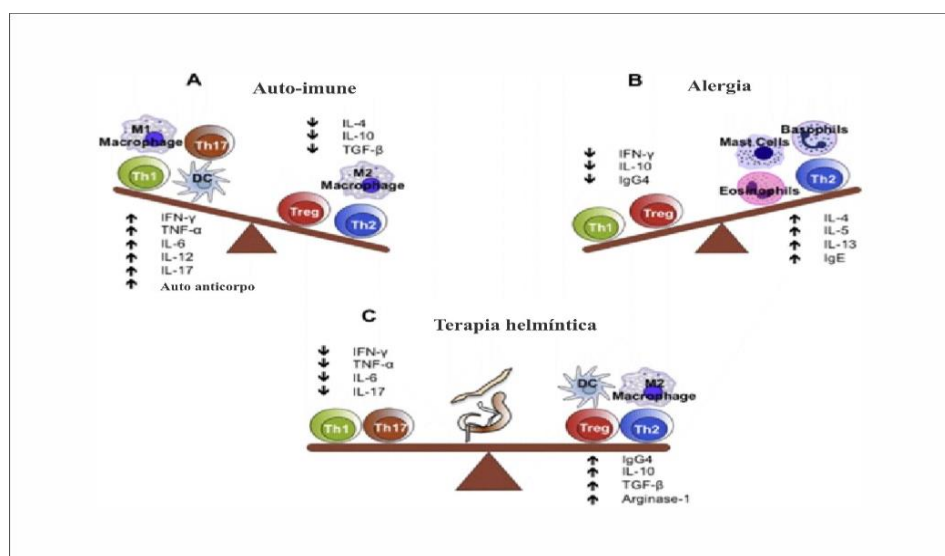
A IL-10 tem papel importante na imunopatologia da esquistossomose, e é produzida por células Treg e por linfócitos B. Essa citocina proporciona a regulação da resposta imunológica durante a infecção (HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000; JANKOVIC *et al.*, 1998; MANGAN *et al.*, 2004; VELUPILLAI *et al.*, 1997).

Um estudo observacional realizado por Khan & Fallon em 2013, objetivou relacionar as pesquisas dos últimos 20 anos que demonstram a utilização de helmintos como terapia para doenças alérgicas. Embora os méritos da *Hipótese da Higiene* estejam abertos ao debate, diversos autores argumentam que a ausência de infecções por helmintos nas sociedades desenvolvidas contribui para o aumento na incidência de doenças alérgicas e auto-imunes observado durante as últimas décadas (ALLEN; MAIZELS, 2011; OKADA 2010; YAZDANBAKHSH; KREMSNER; VAN REE, 2002).

Vários mecanismos imuno-regulatórios são induzidos por uma variedade de infecções por helmintos que podem melhorar as condições inflamatórias do hospedeiro mesmo não relacionadas. Isso levou a um paradigma imunológico na imunidade aos helmintos (FALLON *et al.*, 2000; KREIDER *et al.*, 2007; TAYLOR; VAN DER WERF; MAIZELS, 2012)

Assim, a introdução de helmintos levaria à resposta modificada de Th2 e indução de células reguladoras com equilíbrio homeostático entre as respostas Th1/Th17 (autoimunes) ou Th2 (alérgicas), contribuindo para suprimir doenças, bem como, reparar/reverter danos nos tecidos como ilustrado na Figura 4 (KHAN; FALLON, 2013).

Figura 4 - O paradigma clássico da imunidade aos helmintos



Fonte: KHAN; FALLON (2013).

(A) O desequilíbrio na imunidade que pode levar à autoimunidade é impulsionado principalmente pelas células Th1 e Th17 com macrófagos e células dendríticas (DCs) auxiliando-as através de uma abundância de citocinas pró-inflamatórias. (B) Em indivíduos alérgicos, há uma maior frequência de células Th2, com menor frequência das células Th1 e uma redução nas células Tregs. A secreção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, por Th2, promove IgE total elevada e específica para alérgenos, eosinofilia e aumentos do número de mastócitos e basófilos. (C) O uso de helmintos como estratégia terapêutica criará um equilíbrio homeostático entre respostas Th1/Th17 (autoimunes) e Th2 (alérgicas) através da indução de um ambiente regulado com dano e reparo do tecido atingido (FIGURA 4).

Com base na literatura atual sobre esquistossomose, Lacorcia & Prazeres da Costa (2018), revisaram diversos estudos que demonstram que a infecção materna por esquistossomose pode levar a mudanças no desenvolvimento do sistema imunológico dos filhos.

Em 2005, Elias, demonstrou que a infecção experimental por *S. mansoni* reduz a eficácia da vacina protetora BCG contra *M. tuberculosis*, possivelmente pela atenuação da resposta imune protetora (Th1) a antígenos micobacterianos e pela polarização da resposta Th2.

Não há estudos publicados sobre a infecção pelo *S. mansoni* e hanseníase ou se a infecção prévia por helmintos está associada à uma alteração na resposta imune ao *M. leprae*.

No entanto, como a esquistossomose compartilha as mesmas características de ativação imunológica de outras infecções por helmintos em relação a uma resposta reguladora aumentada na infecção crônica, faria sentido que também pudesse alterar a resposta imune à infecção pelo *M. leprae*.

Nesse sentido, nosso grupo em trabalhos anteriores, com foco na esquistossomose experimental e humana, reforça os conceitos de que a maioria dos pacientes crônicos apresentam um perfil Th2 com baixa produção de IFN- $\gamma$  e a intensidade da infecção favorece a produção de IL-10 (SILVEIRA *et al.*, 2002; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2008).

Em modelo experimental, demonstrou-se que o *S. mansoni* estabelece um ambiente imunológico no hospedeiro onde células TCD4<sup>+</sup> e basófilos são capazes de produzir IL-4 mesmo antes da eliminação dos ovos sugerindo que os vermes desempenham um papel importante no estabelecimento da resposta Th2 que é crítica para a sobrevivência do hospedeiro e transmissão do parasita (DE OLIVEIRA FRAGA *et al.*, 2010a; SILVEIRA *et al.*, 2002).

Por outro lado, a análise em indivíduos residentes em áreas endêmicas sugere que a *SmCBI* (*S. mansoni*, catepsina B1) uma enzima proteolítica importante para o metabolismo do



verme, também é alvo de respostas de IgE em humanos. Juntos, nossos dados sugerem que, como os ovos de schistosoma, os vermes adultos também induzem respostas do tipo 2 e que uma cisteína-protease do *S. mansoni* está envolvida na indução do perfil Th2 (DE OLIVEIRA FRAGA *et al.*, 2010b).

Em 2017 um estudo de coorte foi realizado por Hagge e cols para avaliar as fezes de 145 pacientes com hanseníase, sendo 21% PB e 79% MB, por meio de testes moleculares (qPCR) para a verificação de co-infecção por helmintos transmitidos pelo solo, como *Ascaris lumbricoides* (Al), *Strongyloides stercoralis* (Ss), *Ancylostoides duodenale* (Ad) e *Necator americanus* (Na). Os testes moleculares por qPCR, identificaram que 55% (79) dos pacientes apresentaram resultado positivo para infecções por helmintos transmitidos pelo solo. Além disso, 65% (96,  $p=0,023$ ) dos pacientes co-infectados apresentaram reação hansênica.

Recentemente nosso grupo realizou ensaios sorológicos utilizando os antígenos da hanseníase, como o LID-1, um antígeno específico do *M. leprae*, para avaliar se comorbidades e outros fatores estão associados a reações em pacientes com hanseníase multibacilar (dados não mostrados, manuscrito em preparação). As amostras de soro de 74 casos de hanseníase, 83 contatos domiciliares e 65 controles negativos foram testadas no ensaio multiplex de beads (esferas de poliacrilamida) denominado *Multiplex Bead Assays* - MBA, quanto à reatividade de IgG contra LID-1, e IgG4 contra os antígenos de SEA (*soluble egg antigen*), NIE (antígeno de *S. stercoralis*) e AsHb (antígeno de *Ascaris*). As amostras de fezes foram avaliadas para a identificação de ovos dos helmintos por meio do método Kato Katz. Os resultados preliminares demonstraram que 34 (15,3%) dos participantes apresentaram reatividade LID-1 e metade apresentaram evidências sorológicas de infecção por helmintos, sendo 29,7% *Schistosoma mansoni*, 19,8% de *Strongyloides stercoralis* e 8,1% *Ascaris sp.* A infecção por helmintos no exame de fezes foi detectada em 8,1% e significativamente associada aos casos de hanseníase em comparação aos contatos domiciliares (OR = 5,37, IC 95% 1,11, 25,8). O LID-1 teve uma sensibilidade geral para a hanseníase de 30,1%, mas aumentou para 40% nos casos MB. A positividade do LID-1 foi associada à NIE (OR 2,66, IC 95% 1,20, 5,92) e também fortemente associada ao índice baciloscópico (IB)<sup>1</sup> positivo. Embora a sensibilidade para o LID-1 foi menor do que o esperado, isso ocorreu provavelmente pela baixa porcentagem (27%) de casos com IB positivo na amostra do estudo, entretanto, obtivemos uma porcentagem relativamente alta de contatos positivos ao LID-1. As diferentes associações entre a positividade do LID-1 e

---

<sup>1</sup> O Índice Baciloscópico (IB), proposto por Ridley em 1962, baseia-se em uma escala logarítmica com variação de 0 a 6. É o método de avaliação quantitativo mais correto e utilizado na leitura da baciloscopia em hanseníase. Fonte: Brasil (2010).

a reatividade por helminto estão sendo avaliadas pelo nosso grupo em um estudo de acompanhamento (dados não mostrados).

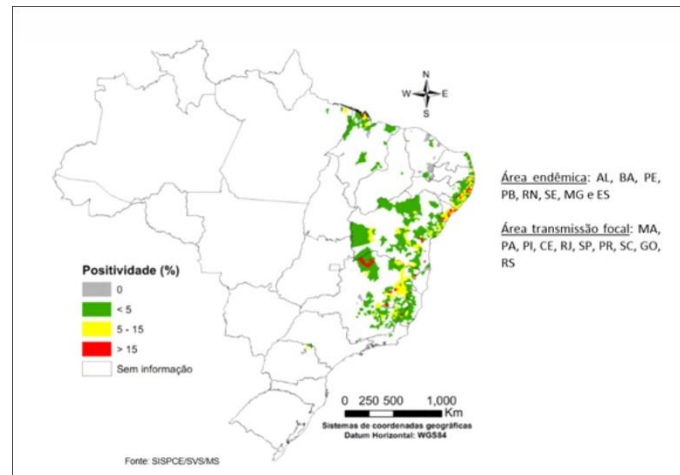
Considerando que os espectros clínicos da hanseníase representam a resposta imune do hospedeiro contra *M. leprae*, acredita-se que a co-infecção por helmintos, mais especificamente pelo *S. mansoni* nesse estudo, também pode desempenhar um papel importante na determinação das manifestações clínicas da hanseníase, alterando a resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae*.

### **2.5.1 Epidemiologia da Esquistossomose**

A esquistossomose é uma doença de ocorrência tropical, registrada em 54 países, principalmente na África e Leste do Mediterrâneo. Nas Américas, a esquistossomose atinge a América do Sul, destacando-se a região do Caribe, Venezuela e Brasil. No Brasil estima-se que cerca de 1,5 milhões de pessoas vivem em áreas sob o risco de contrair a doença. Os estados das regiões nordeste e sudeste são os mais afetados sendo que a ocorrência está diretamente ligada à presença dos moluscos transmissores. Atualmente, a doença é detectada em todas as regiões do país. As áreas endêmicas e focais abrangem os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais. No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (Figura 5) (CARVALHO *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2017).

O estado de Minas Gerais representa uma das maiores áreas endêmicas para esquistossomose no Brasil, com regiões de más condições sociais e sanitárias que favorecem a transmissão de parasitas. É o caso da comunidade rural de Limeira de Mantena e demais localidades ao entorno do município de Governador Valadares, que foram o foco do presente estudo (GAZZINELLI *et al.*, 2006; KATZ; ALMEIDA, 2003; ZONI; CATALÁ; AULT, 2016).

Figura 5 - Distribuição da esquistossomose em área endêmica, por faixa de positividade, por município. Brasil, 2009 – 2017



Fonte: Brasil (2019).

## 2.6 DEFICIÊNCIA DE MICRONUTRIENTES E HANSENÍASE

Embora os programas de controle tenham contribuído para a redução da prevalência de hanseníase em todo o mundo, novos casos ainda são detectados. Portanto, para um controle mais eficaz é imprescindível conhecer que fatores desempenham papel importante na transmissão da doença (WHO, 2016).

Um estudo de caso controle realizado por Kerr-Pontes (2006) no estado do Ceará, teve como objetivo identificar os fatores socioeconômicos, ambientais e comportamentais associados à ocorrência de hanseníase. Nesse estudo, os pesquisadores avaliaram 226 casos e 857 controles e, verificaram que o baixo nível de escolaridade, banhar-se semanalmente em locais como riacho, rio e/ou lago, a baixa frequência na troca de roupa de cama e escassez de alimentos estavam associados com a hanseníase. Em contrapartida, ter uma cicatriz de BCG foi considerado um importante fator protetor.

Em 2011, Feenstra, realizando um estudo caso-controle em Bangladesh, avaliaram 90 casos e 199 controles e, dentre os fatores socioeconômicos avaliados verificaram que a desnutrição teve papel importante no desenvolvimento dos sinais clínicos da hanseníase.

Recentemente em Bangladesh, Wagenaar *et al.*, (2015), também em estudo caso controle, verificaram que deficiência nutricional é um importante fator de risco para a suscetibilidade à hanseníase.

A escassez de alimentos é uma característica típica das famílias de baixa renda. Esse fator poderia estar mais diretamente relacionado à hanseníase, já que os indivíduos que sofreram fome pelo menos uma vez, provavelmente, experimentaram deficiências nutricionais em

períodos anteriores de sua vida. É concebível que uma nutrição inadequada enfraqueça a competência imunológica contra as infecções e, assim, a infecção pelo *M. leprae* (KERR-PONTES *et al.*, 2004; VAN BEERS; DE WIT; KLATSER, 1996).

Existem poucos dados sobre o impacto das deficiências nutricionais na hanseníase. No entanto, deficiências de micronutrientes, particularmente aqueles com reconhecido potencial antioxidante, como o retinol (vitamina A),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), 25-hidroxivitamina (vitamina D), zinco, magnésio e selênio, têm sido observadas apresentando baixos níveis nas diferentes formas clínicas da hanseníase (VÁZQUEZ *et al.*, 2014).

### 2.6.1 Vitamina A

A vitamina A, também denominada ácido retinóico, é uma vitamina lipossolúvel que é necessária para o funcionamento adequado de um conjunto diversificado de atividades fisiológicas, dentre elas a visão, hematopoiese, desenvolvimento embrionário, diferenciação de células da pele, transcrição gênica e função do sistema imunológico (CHAPMAN, 2012).

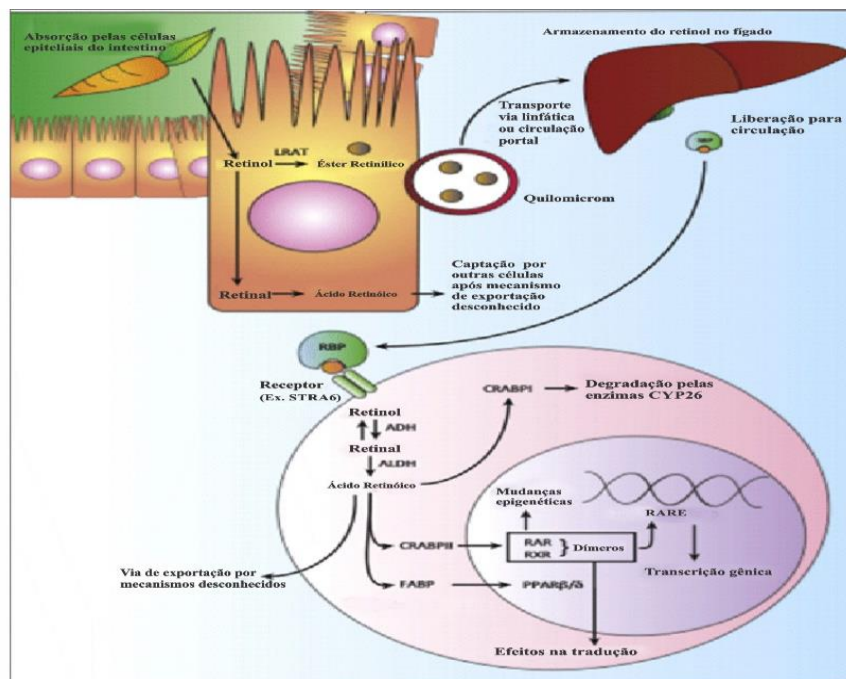
Para manter níveis suficientes de vitamina A, o corpo precisa absorver o retinol proveniente da dieta. Durante o processo de absorção, as células intestinais são capazes de metabolizar o retinol a éster de retinol e estocar em vesículas, denominadas quilomicrons. Em seguida, o retinol é exportado para o sistema linfático e fígado. O retinol circulante é absorvido no citosol por meio do receptor denominado estimulador do ácido retinóico 6 (STRA6). Nas células, o retinol será metabolizado pelas enzimas álcool desidrogenase (ADH) e retinaldeído desidrogenase (ALDH) à ácido retinóico. Após a metabolização o ácido retinóico poderá ligar-se às proteínas de ligação do ácido retinóico celular (CRABPII) ou proteína de ligação a ácidos graxos (FABP5), ambas encontradas no citosol. Em seguida, o ácido retinóico será translocado ao núcleo para ligar-se ao seu receptor nuclear, onde atuará como um regulador da transcrição gênica, como mostra figura 6 (HARRISON; HUSSAIN, 2001; KASHYAP *et al.*, 2013; KAWAGUCHI *et al.*, 2007, 2015; URVALEK; GUDAS, 2014, 2014).

O microambiente intestinal pode ser uma boa fonte de ácido retinóico, uma vez que, a vitamina A é absorvida no intestino. A presença de ácido retinóico e citocinas no microambiente é importante para a expressão da enzima retinaldeído desidrogenase 1 $\alpha$  (ALDH1 $\alpha$ ) nas células do sistema imunológico para o metabolismo do retinol (HURST; ELSE, 2013). Estudos mostram que as células dendríticas e os macrófagos presentes no intestino são as principais fontes de ácido retinóico para os linfócitos T e B, e portanto, essas células

expressariam a enzima ALDH1 $\alpha$  (JAENSSON-GYLLENBÄCK *et al.*, 2011; MCDONALD *et al.*, 2012; MOLENAAR *et al.*, 2011)

O ácido retinóico metabolizado pelas células dendríticas inibe a diferenciação de células T *naive* em células Th17 por meio do bloqueio da sinalização das citocinas IL-6 e IL-21. Além disso, o ácido retinóico bloqueia a produção de IL-4, IL-21 e IFN- $\gamma$  pelas células CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>. Esses estudos demonstram que a diferenciação de células T *naive* em células Tregs ocorre pela estimulação do ácido retinóico (BETTELLI *et al.*, 2006; MUCIDA *et al.*, 2007; XIAO *et al.*, 2008). Foi verificado que as células dendríticas estimulada pelo ácido retinóico poderiam induzir as células Tregs a secretar IL-10 (BAKDASH *et al.*, 2015).

Figura 6 - Metabolismo e sinalização da vitamina A



Fonte: ERKELENS; MEBIUS (2017).

O retinol é retirado do lúmen pelas células epiteliais intestinais. O retinol é então metabolizado a ésteres de retinol e estocado em quilomícrons e transportado para o sistema linfático e fígado. A partir do fígado o retinol ligado pode ser absorvido pelas células via receptor estimulador do ácido retinóico 6 (STRA6). Após a entrada na célula, o retinol pode ligar a seus receptores (receptor do ácido retinóico – RAR; receptor retinóide X – RXR; receptor proliferador ativado por peroxissomo – PPAR $\beta/\delta$ ). Esses receptores podem atuar como fatores de transcrição ao se ligarem aos elementos de respostas do retinol (RARE) nos genes alvos (FIGURA 6).

Em 2009 Mucida, verificou que o ácido retinóico associado com TGF- $\beta$  pode promover a conversão de células T naíve em células Tregs. Como o TGF- $\beta$  também pode induzir células Th17, em combinação com IL-6, e sabendo que o ácido retinóico é capaz de bloquear a sinalização de IL-6, alguns estudos mostram, que o ácido retinóico parece ser uma molécula determinante na manutenção do equilíbrio Treg-Th17 (MANEL; UNUTMAZ; LITTMAN, 2008; SUN *et al.*, 2007; UEMATSU *et al.*, 2008). Em conjunto esses trabalhos demonstram o papel central do ácido retinóico no equilíbrio das respostas Th17 e Treg, como mostra a figura 7.

Assim, a deficiência de vitamina A está correlacionada com a diminuição das respostas do tipo Th2 (IWATA; ESHIMA; KAGECHIKA, 2003; NIKAWA *et al.*, 1999; WIEDERMANN *et al.*, 1993). Na verdade, o ácido retinóico promove diferenciação de células Th2 ao induzir a expressão do gene IL4 (LOVETT-RACKE; RACKE, 2002).

Avaliando o papel da vitamina A na ativação das células T, (DAWSON *et al.*, 2008), sugeriram que a estimulação do receptor RAR $\alpha$  e a presença de IL-4 resultaria em um fenótipo Th2.

Um estudo realizado por Sher (1981), verificando os níveis séricos de zinco, cobre, ferro e vitamina A em pacientes com hanseníase e controles saudáveis, demonstraram que os níveis de vitamina A foram significativamente menores no grupo de pacientes da forma lepromatosa quando comparado com o grupo de pacientes com a forma clínica tuberculóide. Além disso, o grupo de pacientes com a forma clínica LL também apresentavam níveis séricos de ferro e zinco significativamente mais baixos e níveis elevados de cobre. Esses autores, concluem que a baixa concentração no soro de zinco, ferro e vitamina A pode contribuir para o desenvolvimento das manifestações clínicas observadas na hanseníase.

Em 1988 Rao, avaliando 67 pacientes com hanseníase nas diferentes formas clínicas e 55 indivíduos controles, identificaram reduções significativas nos níveis séricos das vitaminas A e E nos casos quando comparados aos indivíduos saudáveis. Em conclusão os autores consideram esses achados importantes no delineamento das alterações na causa ou efeito da doença. Em 2007, Lima, demonstraram níveis significativamente mais baixos de vitamina A nos indivíduos com a forma clínica LL do que nos controles.

A descoberta de que o ácido retinóico apresenta atividade moduladora do sistema imunológico revela que a vitamina A é um componente essencial da dieta. O papel dos metabólitos da vitamina A no sistema imune, requer mais estudos para a identificação de novas terapias para combater doenças infecciosas (LARANGE; CHEROUTRE, 2016).



### 2.6.2 Ferro e ferritina

O ferro é um mineral vital para a homeostase celular. É essencial para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e metabolismo energético. É um cofator importante para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e na fixação do nitrogênio. Nos mamíferos é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (HGB) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (HAMAÏ; MEHRPOUR, 2017). Um indivíduo adulto tem no seu organismo de 4 a 5 g de ferro, sendo que cerca de 2,5 g na forma de Hb (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2001).

A deficiência de ferro acarreta consequências para todo o organismo, sendo a anemia uma manifestação considerada relevante (CHIFMAN; LAUBENBACHER; TORTI, 2014).

Em 1991, Sen, realizando um estudo a respeito da hanseníase avaliaram 128 pacientes paucibacilares e multibacilares quanto a anemia ferropriva. Nesse estudo, esses pesquisadores verificaram que os pacientes paucibacilares apresentaram grau leve a moderado de anemia, enquanto que nos pacientes multibacilares foi observado grau severo de anemia.

Os mecanismos responsáveis pela anemia na hanseníase foram estudados por Lapinsky, em 1992. Participaram do estudo 56 pacientes com hanseníase para avaliação dos índices hematológicos, concentração de ferro, marcadores inflamatórios e níveis de eritropoietina. A anemia foi mais comum nos pacientes com a forma clínica LL (85,7%) do que o grupo controle (19%). O grupo LL exibiu um nível médio de ferro sérico significativamente menor e uma concentração de ferritina sérica levemente aumentada.

Recentemente, um estudo caso-controle realizado por Oktaria (2018), avaliando 100 casos e 200 controles, com o objetivo de verificar possíveis associações da deficiência de micronutrientes, fatores demográficos e socioeconômicos com a hanseníase, observaram que dentre os micronutrientes avaliados os níveis séricos de ferro eram mais baixos nos pacientes (23%) do que nos controles (9%). Em contrapartida, altos níveis de ferritina foram encontrados nos pacientes (37%) em relação aos controles (16%). Esses autores concluem que uma alimentação inadequada pode ser um importante risco para a suscetibilidade à hanseníase, embora, esses pesquisadores, proponham investigações de outros fatores de risco como alteração da composição da microbiota do intestino como possível causa relacionada à dieta que pode resultar no desenvolvimento da hanseníase.

Nesses estudos a anemia foi um achado comum nos pacientes multibacilares. No entanto, o mecanismo exato subjacente à redução do ferro sérico e o efeito da redução dos níveis



de ferro na hanseníase precisam ser melhores elucidados (FREDERICK; MAYFIELD; DUBOIS, 2009).

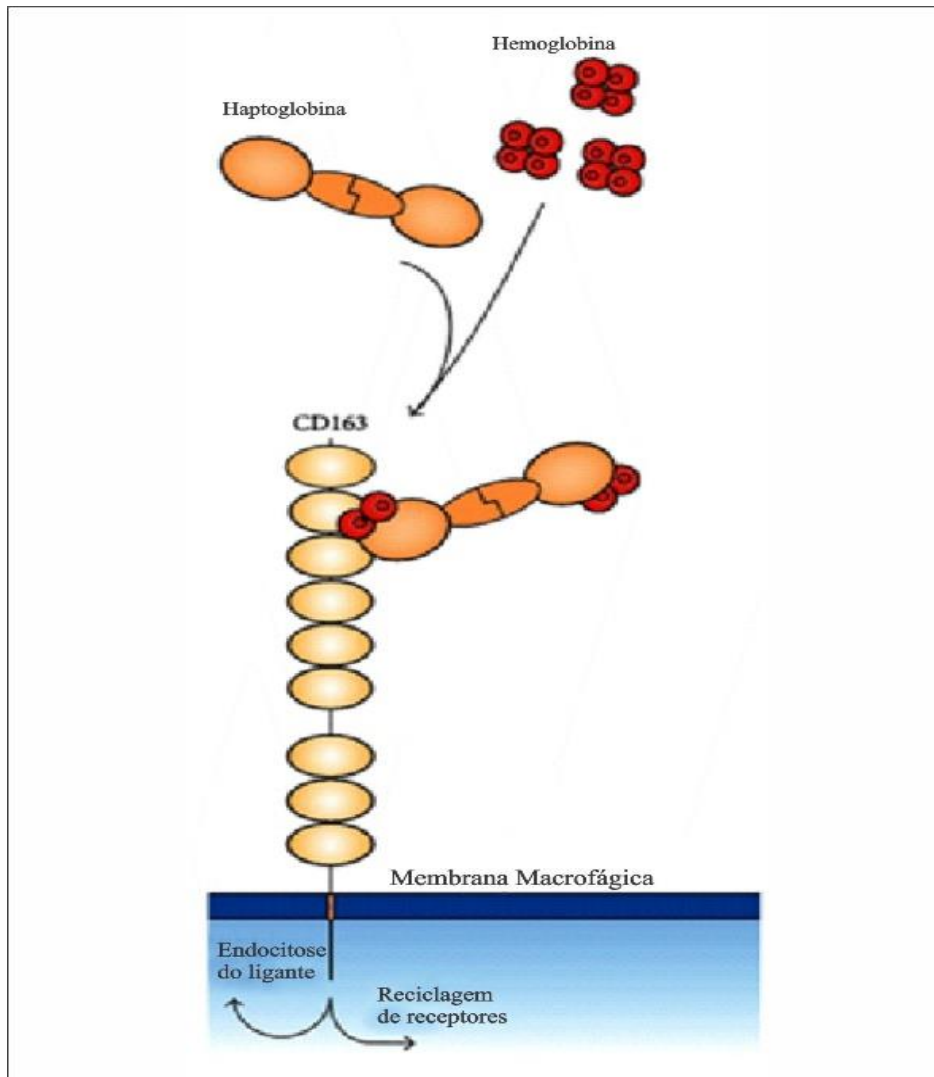
O ferro pode ser armazenado na ferritina, que está presente em todas as células e fluidos corporais. A ferritina é uma proteína de grande peso molecular e suas maiores concentrações são encontrados no fígado, baço e medula óssea. Cada molécula de ferritina consiste de uma proteína esférica cujo peso molecular é de aproximadamente 460.000 Daltons, composta de 24 subunidades com uma quantidade variável de ferro como centro do óxido de ferro-fosfato (CRICHTON, 1971).

Já foi demonstrado que o peso da molécula de ferritina, quando totalmente saturada, pode consistir em mais de 20% de ferro (FAIRBANKS; FAHEY; BEUTLER, 1971). Esses locais de armazenamento de ferro servem como um reservatório para atender à demanda futura. Cerca de dois-terços do ferro armazenado no corpo humano existe sob a forma de ferritina. Embora a maior parte da ferritina seja intracelular, uma pequena quantidade pode ser encontrada no soro, que se correlaciona com as reservas totais de ferro (PERCY; MANSOUR; FRASER, 2017).

Como a maior parte do ferro no organismo está associada à molécula de hemoglobina (HGB), a fagocitose e degradação de hemácias senescentes representam uma importante fonte de ferro, representando cerca de 25 a 30 mg/dia. Macrófagos e células de *Küpfper* no fígado reconhecem modificações bioquímicas na membrana da hemácia senescente. Essas alterações sinalizam para que o macrófago elimine essas células. Após a interação de receptores específicos nos macrófagos com as hemácias, inicia-se o processo de fagocitose, seguido da degradação dos componentes da hemácia.

Alguns estudos mostram que monócitos e macrófagos expressam o receptor CD163 (NIELSEN; MOESTRUP, 2009). De acordo com esses autores, esse receptor seria responsável por reconhecer a hemoglobina associada a haptoglobina (HGB-Hp) para a realização da endocitose desses complexos, como mostra a figura 8 (ALAYASH *et al.*, 2013; BANERJEE *et al.*, 2012; LEVY *et al.*, 2010).

Figura 8 - Via CD163 para captação de complexos hemoglobina-haptoglobina (HGB-Hp)

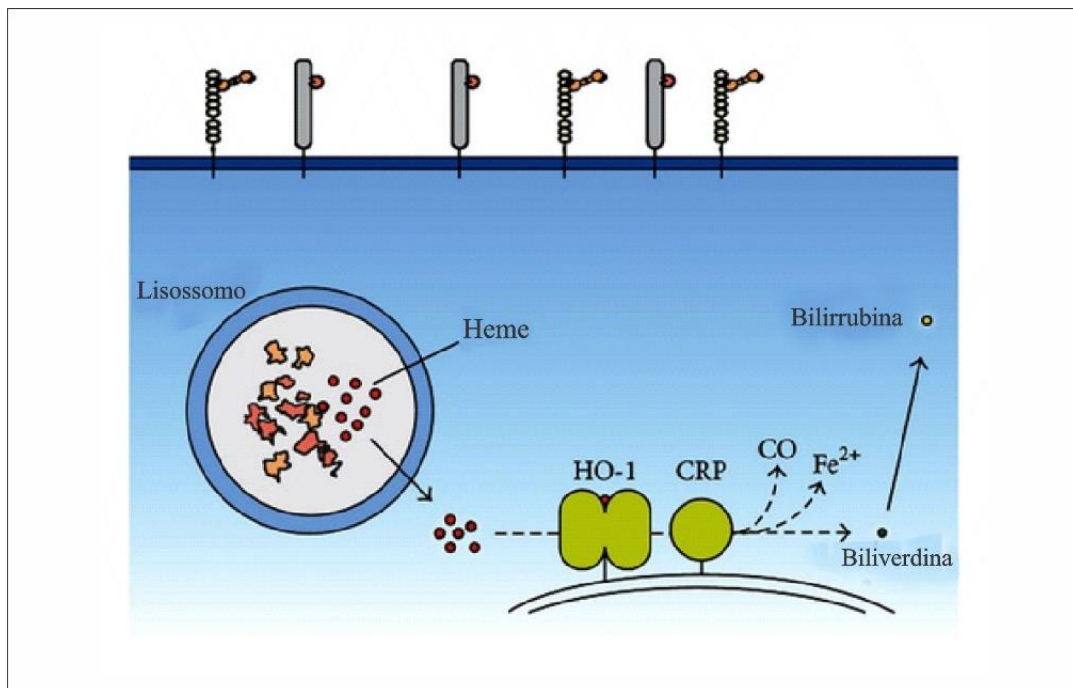


Fonte: THOMSEN *et al.* (2013).

Nota: A endocitose do ligante leva à degradação nos lisossomos enquanto o receptor é reciclado e volta à membrana plasmática.

A via haptoglobina-CD163-heme é um sistema eficiente para contornar a toxicidade induzida pela Hb e o heme durante as hemólises fisiológicas e patológicas. Nessa via, a HGB se liga firmemente à Hp, levando à captação do complexo mediada pelo CD163 em macrófagos. Uma vez dentro do macrófago, o complexo Hb-Hp sofre a ação das enzimas lisossomais, assim, o heme metabolizado pela enzima heme oxigenase-1 (HO-1), gera metabólitos como o monóxido de carbono (CO), biliverdina e ferro livre que pode induzir a produção de ferritina. Os metabólitos do heme, incluindo bilirrubina convertida a partir de biliverdina, têm um efeito anti-inflamatório geral e, assim, reforçam a eficácia anti-inflamatória da via haptoglobina-CD163-heme. A figura 9 representa esquematicamente a metabolização do heme (NIELSEN; MOESTRUP, 2009).

Figura 9 - A via intracelular para a degradação do heme subsequente à endocitose mediada por CD163 em macrófagos



Fonte: THOMSEN *et al.* (2013).

Nota: O heme livre é degradado em biliverdina, CO e ferro no estado ferroso pela enzima heme oxigenase-1 (HO-1). A biliverdina é reduzida a bilirrubina pela biliverdina redutase e transportada para o fígado ligada à albumina.

Um estudo realizado por Moura, em 2012, demonstrou que uma maior expressão de CD163 contribuiu para o aumento do armazenamento de ferro em macrófagos dos pacientes LL, bem como, favoreceu a captação do *M. leprae*. Em contrapartida, o bloqueio do CD163 reduziu a captação de *M. leprae* nos monócitos. Além disso, esses autores demonstraram que a IL-10 pode regular a expressão da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) nos macrófagos dos pacientes LL. Esses autores sugerem que a expressão de CD163 induzida pelo *M. leprae* modula o fenótipo da célula hospedeira para criar um ambiente favorável à entrada e sobrevivência de microrganismos.

A IDO é uma das enzimas responsável por metabolizar o L-triptofano. Vários estudos demonstraram o envolvimento da enzima IDO como mediadora da supressão da resposta das células T, indicando ainda que alterações bioquímicas devido ao catabolismo do L-triptofano podem afetar a proliferação dessas células (MELLOR; MUNN, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2011; POPOV; SCHULTZE, 2008; SCHRÖCKSNADDEL *et al.*, 2006).

Em 2017 De Mattos Barbosa, verificaram maior concentração de ferro nas biópsias de pele dos pacientes LL do que nas lesões dos pacientes TT. É importante notar que altas

quantidades de ferro foram encontradas apenas nos macrófagos LL e nenhuma concentração de ferro foi detectada nos macrófagos epitelioides. Além disso, verificaram também que o CD163 contribui para a captação de *M. leprae* e o aumento da quantidade de ferro, favorecendo a sobrevivência e a persistência bacteriana. Esses autores sugerem que o CD163 pode contribuir para polarização dos macrófagos LL a um fenótipo anti-inflamatório, aumentando a expressão e os níveis das moléculas imunorreguladoras IL-10 e IDO.

Ainda existem poucos dados sobre o papel do ferro/ferritina na progressão da hanseníase ou na definição da doença pela forma lepromatosa ou tuberculóide.

### 2.6.3 Vitamina D

Estudos recentes destacam o papel da vitamina D como um potente modulador da resposta imune (ADAMS; HEWISON, 2008; ARDALAN *et al.*, 2007). A elucidação dessa importante ação, resultou da observação que a maioria das células do sistema imunológico em proliferação, expressa o receptor nuclear da vitamina D (VDR) (BHALLA *et al.*, 1983; KREUTZ *et al.*, 1993; TAKAHASHI *et al.*, 2002). Esses estudos verificaram que as células do sistema imune que expressavam VDR foram capazes de responder ao 1,25-dihidroxitamina D circulante, de maneira semelhante aos tecidos-alvo clássicos da vitamina D, como intestino, rins e ossos.

Sabe-se que a vitamina D é produzida na pele humana exposta à luz ultravioleta (UV). A forma circulante é a 25-hidroxitamina D (25D), na qual o grupo hidroxila é adicionado pelo fígado. A forma biologicamente ativa é 1,25-dihidroxitamina D (1,25D), que pode ser produzido pela ação da enzima CYP27B1 em macrófagos humanos (WANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que a vitamina D está envolvida na ativação de macrófagos para inibir a multiplicação de micobactérias e, além disso, induzir peptídeos que destroem micobactérias (DAVIES, 1985; ROOK *et al.*, 1987).

De fato, a deficiência de vitamina D poderia levar a uma imunodeficiência adquirida e conseqüentemente, uma reação de defesa do hospedeiro a micobactérias muito prejudicada (CHUN *et al.*, 2014).

Um estudo realizado por Ustianowski e cols. em 2005, avaliando 210 pacientes com diagnóstico de tuberculose em Londres, verificaram que 76% dos pacientes apresentavam níveis baixos de vitamina D. Esses autores concluem que a deficiência de vitamina D, na tuberculose, está associada a grupos étnicos, à exceção dos europeus brancos e

chineses/asiáticos do sudeste. Além disso, os dados desse grupo apoiam que a falta de exposição à luz solar e uma dieta vegetariana podem contribuir para essa deficiência. Dessa forma, é razoável concluir que a falta de vitamina D aumenta a susceptibilidade à tuberculose e pode contribuir para a progressão da doença.

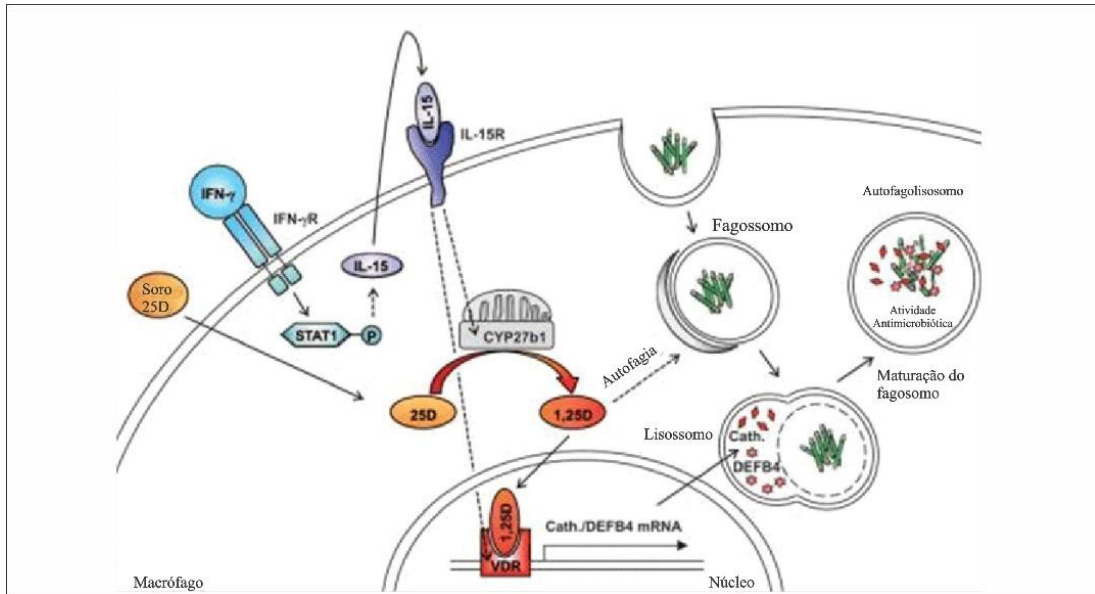
Algumas pesquisas demonstram que os indivíduos afro-americanos apresentam quantidade significativamente menor de 25D porque o conteúdo de melanina da pele diminui a síntese de vitamina D cutânea dependente de luz ultravioleta (UV). Por esse motivo, os afro-americanos possuem maior suscetibilidade de desenvolver tuberculose (MATSUOKA *et al.*, 1991; STEAD *et al.*, 1990).

Em 2011, Fabri e cols. evidenciaram que as células T, por meio da liberação de IFN- $\gamma$ , induzem autofagia, maturação dos fagossomas, produção de peptídeos antimicrobianos, como a catelicidina e, atividade antimicrobiana contra o *M. tuberculosis* em macrófagos humanos através de uma via dependente da vitamina D. Esses autores demonstraram que o IFN- $\gamma$  induziu a via antimicrobiana em macrófagos humanos cultivados em soros com vitamina D, entretanto, o mesmo não ocorreu em soros de afro-americanos que possuem menor quantidade de vitamina D e são mais suscetíveis à tuberculose. A suplementação *in vitro* dos soros deficientes com 25D, restaurou a expressão do peptídeo antimicrobiano induzido por IFN- $\gamma$ , autofagia, fusão fagossomo-lisossoma e atividade antimicrobiana. Esses resultados sugerem um mecanismo no qual a vitamina D é necessária para que a imunidade adquirida, supere a capacidade dos patógenos intracelulares de escapar das respostas antimicrobianas mediadas por macrófagos. Além disso, esse estudo ressalta a importância de quantidades adequadas de vitamina D em todas as populações humanas para sustentar a imunidade inata e adquirida contra a infecção.

Alguns estudos têm demonstrado que através do IFN- $\gamma$ , a vitamina D tem sido necessária para a atividade antimicrobiana (ADAMS; GACAD, 1985; EDFELDT *et al.*, 2010; TALAT *et al.*, 2010; YUK *et al.*, 2009).

Em monócitos e macrófagos, o IFN- $\gamma$  pode induzir a enzima CYP27B1-hidroxilase, a converter a 25D em 1,25D. Essa por sua vez, se liga ao VDR, como mostra a figura 10. O VDR é um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição, que é amplamente expresso em tecidos epiteliais e células do sistema imune (LIN; WHITE, 2004).

Figura 10 - O IFN- $\gamma$  induz uma via antimicrobiana em monócitos/macrófagos humanos

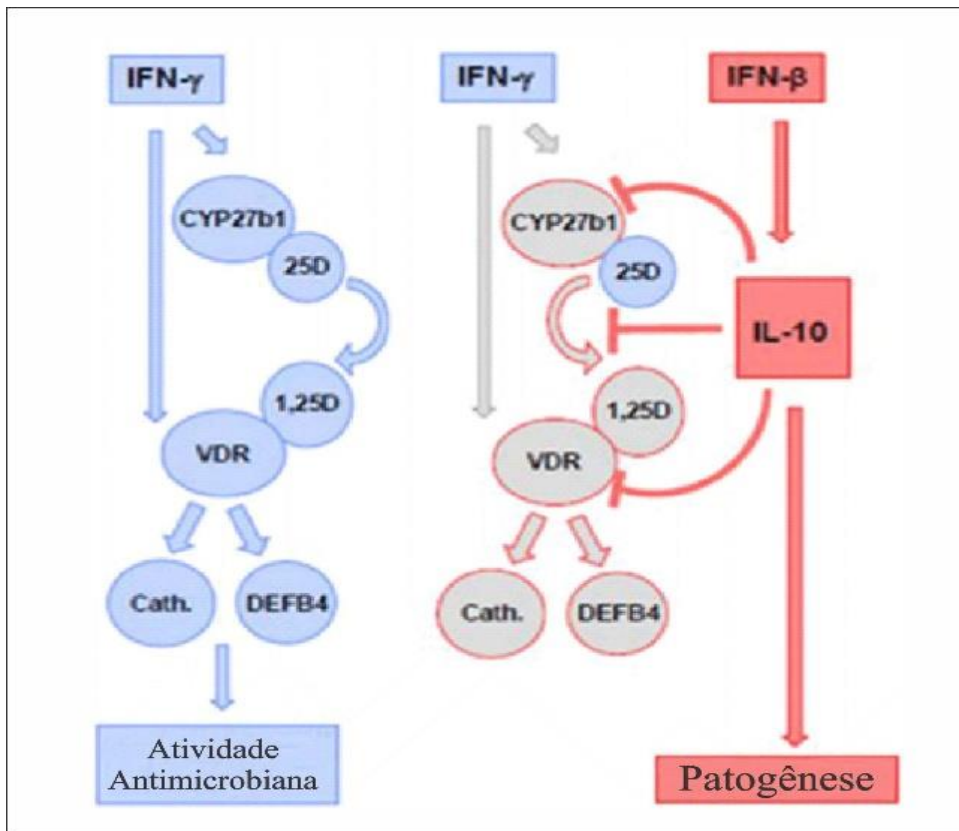


Fonte: FABRI *et al.* (2011).

Este modelo mostra que a indução de IL-15 dependente de STAT1 por IFN- $\gamma$  conduz à regulação positiva de VDR e CYP27b1. O CYP27b1 hidroxila a forma inativa da vitamina D (25D) na forma ativa (1,25D), que medeia a supra-regulação dos peptídeos antimicrobianos catelicidina e DEFB4. O 1,25D produzido também desencadeia a autofagia, que supera o bloqueio da maturação dos fagossomos induzidos pelo *M. tuberculosis*, levando à fusão do autofagolisossomo e atividade antimicrobiana contra o *M. tuberculosis* (FIGURA 10).

A ligação da 1,25D ao VDR resulta na elevação de mRNAs de peptídeos microbicidas como a catelicidina e  $\beta$ -defensina 2 (DEFB4). Entretanto, a resposta do peptídeo antimicrobiano dependente de vitamina D induzida por IFN- $\gamma$ , pode ser inibida pelo IFN- $\beta$  e pela IL-10, sugerindo que a produção diferencial de IFNs contribui para a proteção contra a patogênese em algumas infecções bacterianas humanas, como mostra a figura 11 (BLOOM; MODLIN, 2016; LIU *et al.*, 2007).

Figura 11 - Via de ativação comum para macrófagos humanos estimulada pelo receptor da imunidade inata Toll Like-2 (TLR2) ou pelo receptor da imunidade adquirida, IFN- $\gamma$



Fonte: BLOOM; MODLIN (2016).

Nota: O IFN- $\beta$  suprime essa ativação através da IL-10 inibindo a indução de ambos, CYP27B1 e o VDR.

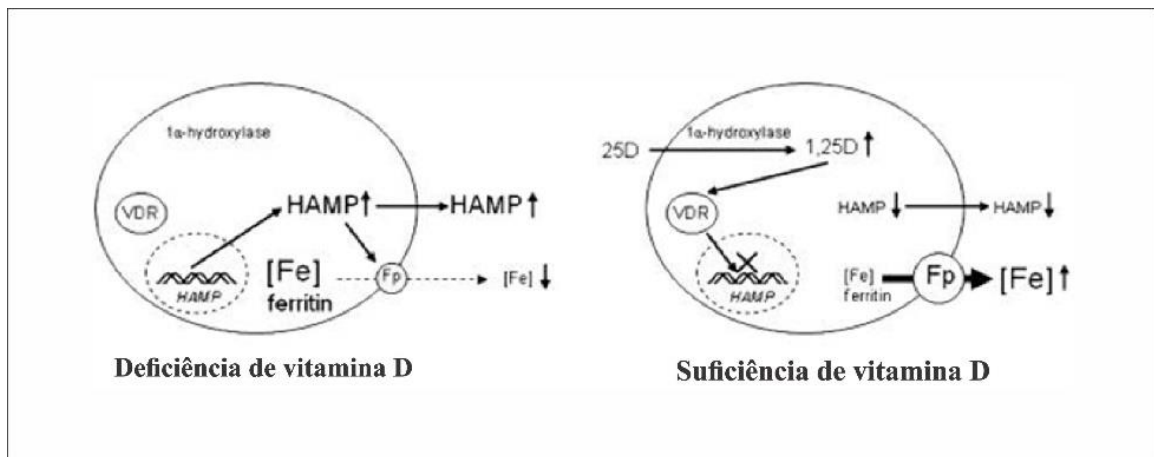
O peptídeo antimicrobiano, catelicidina, possui atividade anti-tuberculose e tem sido associado com outras doenças micobacterianas, como a hanseníase. Em 2011 Matzner, estudaram os níveis séricos de catelicidina e 25D em 29 pacientes com hanseníase e 19 indivíduos saudáveis do Iêmen. Os níveis de catelicidina foram significativamente menores em pacientes com hanseníase que receberam tratamento e aqueles sem tratamento quando comparados aos controles. Esses dados sugerem uma associação potencial da catelicidina com a infecção pelo *M. leprae*.

Além da catelicidina e DEFB4, outras proteínas vêm sendo investigadas. Em 2014 Bacchetta, demonstraram que a 1,25D pode regular a expressão de outra proteína antibacteriana denominada hepcidina (HAMP). Alguns estudos mostram que a principal função da HAMP é a supressão da ferroportina, uma proteína na qual a função é exportar o ferro para o meio extracelular (GANZ, 2011;GANZ, 2009).



Estudos mostram que a supressão de HAMP pela 25D e 1,25D promove o aumento da ferroportina (Fp), que por sua vez, favorecerá a exportação de ferro para o meio extracelular, o que resultará em menores concentrações de ferro intracelulares, como mostra a figura 12 (ARMITAGE *et al.*, 2011; SOW *et al.*, 2009). A 25D e 1,25D suprimem a transcrição de HAMP em monócitos e hepatócitos, levando ao aumento da expressão de ferroportina na membrana e diminuição da expressão de ferritina. Parece que a regulação do eixo HAMP-ferroportina (HAMP-Fp) é outro ponto importante da atividade do sistema imune inato mediado pela vitamina D (ADAMS; HEWISON, 2008; HEWISON, 2011; LIU *et al.*, 2006; SHIN *et al.*, 2010).

Figura 12 - Vitamina D e o eixo regulador do ferro hepcidina-ferroportina



Fonte: BACCHETTA *et al.* (2014).

Representação esquemática de um mecanismo proposto para a regulação da vitamina D da interação hepcidina-ferroportina (HAMP-Fp) em hepatócitos e monócitos. Sob condições de deficiência de vitamina D, a síntese elevada de hepcidina por hepatócitos ou monócitos pode aumentar as concentrações intracelulares e sistêmicas de hepcidina e diminuir a expressão de ferroportina (Fp) na membrana dessas células. A supressão da exportação de ferro, por sua vez, levará ao acúmulo intracelular, aumento da ferritina celular e diminuição dos níveis sistêmicos de ferro. Sob condições de suficiência de vitamina D, diminuição da transcrição de HAMP pode levar a concentrações intracelulares e sistêmicas diminuídas de hepcidina e aumento concomitante da expressão de ferroportina na membrana. A exportação de ferro pode levar à diminuição do ferro intracelular, ferritina e aumento dos níveis sistêmicos de ferro (FIGURA 12).

O ferro é um micronutriente necessário para a sobrevivência e o crescimento de quase todos os organismos, e uma estratégia importante para a defesa antimicrobiana nos mamíferos



baseia-se na privação desse nutriente essencial ao patógeno (DRAKESMITH; PRENTICE, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Esses autores concluem que a limitação do acesso ao ferro pelos microorganismos intracelulares somente seria possível com níveis adequados de vitamina D.

Recentemente Singh (2018), realizaram um estudo para avaliar se havia a associação do polimorfismo do gene do VDR, expressão gênica de RNAm do VDR e o nível de vitamina D com a hanseníase, bem como, o desenvolvimento de estado reacional. Surpreendentemente, o nível de vitamina D em pacientes com hanseníase não foi associado com a doença e suas manifestações clínicas. Verificou-se que os genótipos de VDR (Fok1 e Taq1) estavam associados a pacientes com hanseníase. A expressão gênica do VDR foi menor nos pacientes com hanseníase em comparação aos controles saudáveis.

Embora os micronutrientes exerçam claramente atividade no sistema imunológico, ainda não foram adequadamente definidos o seu papel na hanseníase.

### 3 JUSTIFICATIVA

As complexas estruturas dos helmintos durante as infecções crônicas promovem alterações imunológicas que geralmente são caracterizadas por ativação de uma resposta Th2 (CHATTERJEE; NUTMAN, 2015; COLLEY; SECOR, 2014). Embora a resposta imune seja específica ao helminto, existem provas de que ativações não específicas podem influenciar o curso das co-infecções (CHATTERJEE *et al.*, 2014). George *et al.* (2013), demonstraram redução significativa de células Th1 e Th17 específicas para *M. tuberculosis* em pacientes co-infectados com ancilostomíase. Outras interações helmínticas e tuberculose foram observadas, mostrando um aumento de IL-10 e uma diminuição nas células TCD4 específicas para tuberculose. Em relação à infecção por *M. leprae*, Diniz *et al.* (2010) demonstraram um aumento das células Th2 em pacientes co-infectados com geo-helmintos e *M. leprae*, em ambos os casos de hanseníase lepromatosa e tuberculóide. Além disso, a imunidade Th1 parece ser regulada negativamente em pacientes co-infectados com uma diminuição de CD4+IFN- $\gamma$ + e CD8+IFN- $\gamma$ + em comparação com indivíduos mono-infectados com *M. leprae*. Pelo fato da doença multibacilar estar associada com uma regulação positiva da resposta mediada por Th2 e células T reguladoras, faria sentido inferir que a presença de infecção por helmintos, que de um modo geral, ativa a resposta Th2, pode desempenhar um papel em alguns indivíduos que apresentam a doença multibacilar ao invés de paucibacilar.

Do ponto de vista nutricional, a mesma teoria pode ser aplicada em relação à deficiência de vitamina A, uma vez que baixos níveis de vitamina A têm sido associados com a doença multibacilar (LIMA *et al.*, 2007). O estresse oxidativo também parece estar relacionado à hanseníase e a escassez de alimentos associada com aumento dos casos de hanseníase diagnosticados em Bangladesh (VÁZQUEZ *et al.*, 2014). Portanto, essas deficiências e o estado nutricional geral poderiam predispor os doentes a desenvolver a forma mais infecciosa (multibacilar) e, assim, este seria outro fator para justificar a associação da situação de pobreza com a hanseníase. O Brasil é o segundo país em maior número de casos de hanseníase no mundo, com muitas áreas com transmissão contínua. Nesse contexto, os estudos das co-infecções por helmintos e deficiências de micronutrientes apresentam uma abordagem inovadora e promissora para auxiliar no controle desta infecção. Este trabalho foi desenvolvido no município de Governador Valadares e distrito de Limeira de Mantena em Minas Gerais (MG), considerados endêmicos para esquistossomose e geo-helmintoses com uma incidência relativamente alta de hanseníase (MAGUETA *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2016). Um estudo de regressão espacial por Fonseca *et al.* (2014) verificou que a

prevalência observada e estimada de infecção por *S. mansoni* é elevada no município de Governador Valadares (15% ou superior). Para geo-helmintos, estudos estimam a prevalência em torno de 5% ou menos no estado de MG, mas focos de infecção podem variar significativamente entre as áreas urbanas e rurais (COUTO *et al.*, 2014; SCHOLTE *et al.*, 2013). Na verdade, um estudo anterior mostrou uma prevalência de 44% de ancilostomíase em uma área rural de Governador Valadares (GEIGER, 2008). Portanto, essas regiões tornam-se locais ideais para estudar as interações entre helmintos e hanseníase. Dada a escassez na literatura sobre essas interações, é relevante um estudo abordando co-infecção e deficiências em micronutrientes que pode gerar informações importantes para implementação de estratégias que possam controlar de forma eficiente a transmissão da doença. Portanto, consideramos este estudo extremamente inovador e apresenta um delineamento que pode traduzir verdadeiramente em ações práticas a serem utilizadas no contexto da saúde pública no Brasil, assim como para outros países onde a hanseníase, infecções por helmintos e deficiências de micronutrientes coexistem.

## 4 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram divididos em objetivo geral e específicos.

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar parâmetros imunológicos, nutricionais e parasitológicos (*S. mansoni*) em um estudo caso-controle associado à hanseníase.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho dividem-se em:

- a) determinar os fatores de risco associados à hanseníase nos grupos de estudo considerando as variáveis sócio-demográficas, imunológicas, hematológicas, parasitológicas (*S. mansoni*) e nutricionais;
- b) caracterizar o perfil da infecção por *S. mansoni* nos grupos de indivíduos com e sem esquistossomose;
- c) avaliar o perfil da infecção pelo *M. leprae* nos grupos de indivíduos com e sem hanseníase;
- d) estabelecer um padrão de correlação dos diversos biomarcadores entre os grupos estudados por meio da análise de PCA;
- e) estimar a probabilidade associada à ocorrência de infecção pelo *M. leprae* por considerando as variáveis sócio-demográficas, imunológicas, hematológicas, parasitológicas (*S. mansoni*) e nutricionais por meio da regressão logística.

## 5 METODOLOGIA

Na metodologia serão apresentados os materiais e métodos utilizados para desenvolver a tese.

### 5.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população-alvo deste estudo é composta de indivíduos residentes no município de Governador Valadares e no distrito de Limeira de Mantena, Minas Gerais. Estas regiões são descritas como endêmicas para hanseníase e infecções parasitárias, além de apresentar uma população de baixa renda, portanto, prováveis regiões endêmicas para desnutrição e deficiência de micronutrientes.

#### 5.1.1 Desenho do estudo

Uma vez que nosso estudo envolve a identificação de biomarcadores (parâmetros) associados à hanseníase, decidimos utilizar diferentes métodos estatísticos para tal avaliação.

Foi realizado um estudo de caso-controle misto, pareado e não pareado, constituído de pacientes com hanseníase, recém diagnosticados (n=79). Estes foram comparados com indivíduos não portadores da doença (contatos e controles). O total de sujeitos incluídos neste estudo foi de 257, sendo 79 casos, 97 contatos e 81 controles negativos. O tamanho da amostra foi calculado usando dados publicados, que encontraram uma razão de chances de cerca de 4 vezes para a associação entre casos de hanseníase e helmintos transmitidos pelo solo, garantindo 80% de poder e significância de 0,05.

Foram recrutados indivíduos com idade igual ou superior a 5 anos. Os casos de hanseníase recém diagnosticados e não tratados foram convidados a participar do estudo, através do Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Controle Especial (CREDEN-PES) especializado em hanseníase em Governador Valadares ou por meio do rastreamento de contatos de casos de hanseníase previamente conhecidos pela Estratégia de Saúde da Família (ESF) da comunidade rural de Limeira de Mantena, distrito do município de Mantena. Os casos foram confirmados por um dermatologista com experiência em hanseníase e o exame de BAAR (Bacilos Álcool-Ácido Resistentes), foi realizado em todos os casos para determinar o índice bacilar. Os casos foram classificados como indeterminados, tuberculóides, borderline ou lepromatosos, com base na Classificação de Madri (WHO, 1989). Os indivíduos que

apresentavam uma convivência estreita com os casos, como os membros da família que moram com o caso índice ou que moravam nas proximidades e mantinham contato semanal regular com o caso, foram incluídos no grupo de contato. O grupo controle negativo foi composto por aqueles indivíduos que não apresentavam contato prévio com os casos. Tanto o grupo de contatos quanto o grupo controle negativo, corresponderam aos casos por idade e comunidade de residência. Todos os contatos e controles negativos foram avaliados clinicamente para garantir que não apresentassem sinais ou sintomas de infecção por hanseníase. Tanto pacientes como contatos e controles, após considerados os critérios de inclusão e exclusão, foram apresentados à proposta da pesquisa e somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) os participantes foram incluídos no estudo.

A partir da inclusão no estudo, todos os participantes da pesquisa (casos, contatos e controles) foram entrevistados para registro das informações socioeconômicas e condições de saúde (ANEXO 1).

As informações contidas nos prontuários também foram coletadas. Os participantes da pesquisa (casos, contatos e controles) foram examinados pela equipe do estudo para avaliação de possíveis condições clínicas que pudessem ser consideradas relevantes e/ou passíveis de influenciar as análises laboratoriais propostas.

Para os estudos laboratoriais, os participantes incluídos na pesquisa foram submetidos à coleta de amostra de sangue venoso para pesquisa sorológica de *S. mansoni*, determinação do perfil imunológico, hemograma, bem como quantificação de micronutrientes (vitamina A, ferritina e vitamina D). A coleta foi realizada por técnico contratado pela coordenação da pesquisa. Todos os materiais utilizados nas coletas, armazenamento e transporte das amostras foram de responsabilidade da equipe de pesquisa, não tendo nenhum custo associado ao Sistema Único de Saúde (SUS) e/ou Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares (SMS/GV) e ESF de Limeira de Mantena.

Amostras de fezes também foram coletadas dos participantes da pesquisa para realização do exame parasitológico. Para tanto, frascos contendo conservantes e, orientações verbais e por escrito foram entregues aos participantes. Todos os resultados laboratoriais que foram considerados relevantes dentro da perspectiva clínica foram discutidos com a equipe das ESF responsáveis pela região de residência dos sujeitos da pesquisa.

### **5.1.2 Considerações éticas**

O Protocolo de Pesquisa e o TCLE foram submetidos à Plataforma Brasil e foram encaminhados ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF (CEP/UFJF), credenciado pelo CONEP. Este estudo foi aprovado pelo CEP/UFJF e protocolado sob o CAAE 56863016.6.1001.5147 (ANEXO 2).

Não foram incluídos pacientes com idade inferior a 5 anos, mulheres grávidas, história de diagnóstico de hanseníase, pacientes portadores de doença mental ou deficiência física, etnia indígena e que relatam queixa de alguma doença do trato gastrointestinal associada com perda de peso.

### **5.1.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Os voluntários receberam uma explicação da natureza e dos objetivos do estudo. Foi enfatizado que o estudo tem a finalidade de pesquisa e que o voluntário não poderá esperar que houvesse qualquer efeito terapêutico. O voluntário também entendeu que ele (a) é livre para se retirar a qualquer momento do estudo sem ser obrigado a fornecer o motivo de fazê-lo e sem que isto cause qualquer prejuízo no seu atendimento. Foi de responsabilidade dos investigadores a obtenção da assinatura do TCLE.

### **5.1.4 Confidencialidade**

Os dados coletados no questionário bem como os resultados dos testes laboratoriais foram registrados na ficha de cada voluntário. Toda a informação obtida durante o estudo referente ao estado de saúde do voluntário está disponível exclusivamente aos investigadores, cuja obrigatoriedade de manutenção do sigilo é inerente à sua função. Cópias dos resultados dos testes laboratoriais realizados foram fornecidos aos participantes da pesquisa. Orientações sobre a relevância dos achados foram também fornecidas para os participantes da pesquisa.

## **5.2 COLETA DE SANGUE PARA OS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS**

O sangue dos indivíduos participantes do estudo foi coletado por profissionais qualificados da área de saúde, respeitando as técnicas de biossegurança, tais como uso de luvas, material estéril e descartável. Toda coleta foi realizada no CREDEN-PES e na ESF de Limeira

de Mantena. Foram coletados cerca de 30 ml de sangue utilizando tubos com heparina, com EDTA e com ativador de coágulo, estéreis a vácuo e descartáveis (VACUTAINER, Grand Island, NY, USA) Para os ensaios de quimiocinas e citocinas foram utilizados, respectivamente, os Kits da BD™ Cytometric Bead Array (CBA) de Human Chemokine e de Human Th1/Th2/Th17 Cytokine. A punção venosa para coleta de sangue pode causar leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de pequenos hematomas locais e discreto sangramento. Desde que observadas as normas de biossegurança e utilizando material descartável e estéril, este procedimento é considerado de risco mínimo para o paciente.

### **5.2.1 Separações de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)**

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir do sangue de indivíduos selecionados para o estudo. O sangue periférico heparinizado foi diluído 1:2 em salina tampão fosfato (PBS) para separação das células por gradiente de densidade em Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suécia). Após centrifugação a 900 g, por 30 minutos, à temperatura ambiente, as células mononucleares foram coletadas e as PBMCs lavadas duas vezes com PBS (500 g, por 10 minutos, a 4°C) e ressuspensas em meio RPMI (Gibco Invitrogen Corporation 1640, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco Invitrogen Corporation, EUA), L-glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 100µg/mL (meio completo). Uma pequena alíquota desta suspensão celular foi diluída em azul de Trypan 0.4% (1:2) (Bio WHITTAKER, EUA) e contada em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis.

### **5.2.2 Obtenção de sobrenadantes de cultura de PBMC**

As células mononucleares do sangue periférico foram cultivadas em duplicata na concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço, em placas de 96 poços (Falcon, BD) durante 3 dias para estímulo de fitohemaglutinina (PHA) e 05 dias para os poços sem estímulos e estimuladas com suspensão do bacilo de *M. leprae*, em uma proporção de 10 bacilos para cada célula. As células foram incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sup>2</sup> (Termo Electron), em atmosfera úmida. Os sobrenadantes de cada duplicata foram recuperados e mantidos congelados a -80 °C, até o uso.



### 5.2.3 Antígeno

*Mycobacterium leprae*, mortos por irradiação (3,48 x 10<sup>8</sup> bacilos/ml), foram gentilmente cedidos pelo laboratório de hanseníase do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru/SP e utilizados na proporção de 10 bacilos para cada célula (PBMC) em cultura.

### 5.2.4 Ensaio de citocinas e quimiocinas

Uma vez que a principal hipótese do presente estudo tem uma base imunológica, objetivamos quantificar citocinas e quimiocinas nas amostras de sobrenadante de cultura de PBMC de todos os participantes.

A partir dos sobrenadantes de cultura obtidos, os níveis de quimiocinas e citocinas foram quantificados, utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) da Becton Dickinson-BD. Esse sistema emprega uma mistura de 5 esferas de poliestireno para quimiocinas e 7 esferas de poliestireno para citocinas, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as quimiocinas e citocinas humana. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17) e quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10) no mesmo ensaio, empregando-se pequenos volumes de amostra. Inicialmente as amostras de sobrenadante de cultura mantidas a -80°C foram descongeladas em banho maria à 37°C durante 2min e centrifugadas a 500g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtubo. Alíquotas de 26 $\mu$ L de diluente G (somente nos poços considerados controles do ensaio), de 26 $\mu$ L dos padrões de citocinas, submetidos a diluição seriada com diluente G (reagente fornecido no kit CBA) e 26 $\mu$ L dos sobrenadantes de cultura, foram transferidas para placa de 96 poços. Em seguida, ao poço da placa foram adicionados 18 $\mu$ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 para Human Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit e anticorpos monoclonais anti-CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 para CBA Human Chemokine Kit. Em seguida, foi adicionado em todos os poços o anticorpo de detecção, com subsequente incubação por 3 horas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 160 $\mu$ L da solução F (“Wash buffer”, reagente fornecido no kit CBA), centrifugadas a 200g, por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente descartado. As esferas foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de reagente F e imediatamente analisadas no BD FACS Verse™.

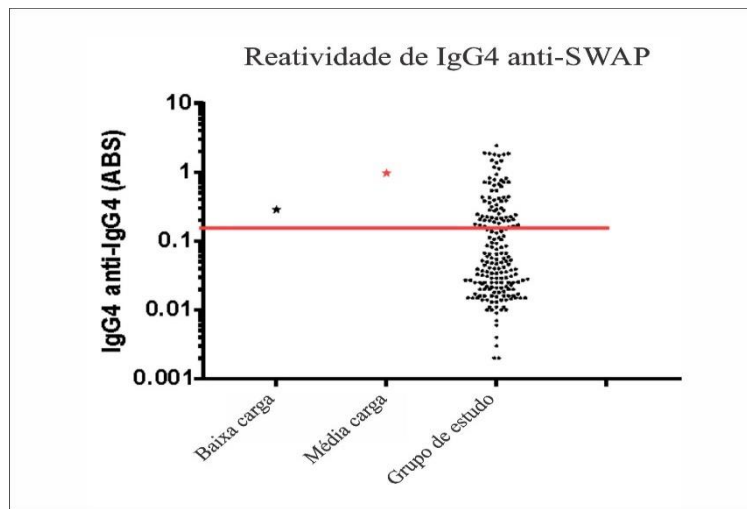
### 5.3 EXAME DE FEZES E ENSAIO SOROLÓGICO PARA *S. mansoni*

A infecção pelo *S. mansoni* e/ou outros geo-helmintos foi confirmada pela presença de ovos em qualquer uma das três amostras de fezes analisadas pelo método de Kato Katz (K-K) (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972). As amostras de fezes foram coletadas durante a consulta regular, após a assinatura do TCLE e, transportadas em potes contendo 10% de vapor de formaldeído (Coproseco®), que preserva amostras de fezes por até 30 dias à temperatura ambiente.

O método K-K é considerado padrão-ouro e envolve a análise de duas lâminas de uma amostra fecal. Embora Minas Gerais seja uma região endêmica para a esquistossomose, a prevalência está em declínio e as infecções podem apresentar baixa intensidade. Portanto, o método K-K padrão pode subestimar a prevalência. Por causa disso, usamos uma variante dessa técnica para aumentar a sensibilidade do teste. Em vez de uma amostra fecal, três amostras foram coletadas, as quais foram misturadas e homogeneizadas no laboratório. Seis lâminas dessa mistura foram preparadas usando a técnica K-K. O restante dessa amostra foi processado pelo método de Hoffman-Pons-Janer (HPJ), baseado em sedimentação espontânea (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934). O número de lâminas aumenta muito a sensibilidade do método (OLIVEIRA *et al.*, 2018). O método HPJ é utilizado em numerosos laboratórios por ser de fácil execução, baixo custo e eficaz no diagnóstico de infecções por protozoários e helmintos, incluindo *S. mansoni*, que possuem ovos pesados (ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 2015). O exame foi feito no laboratório multiusuário da UFJF/GV, sob orientação e treinamento da Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga. Quadros de infecção alta por *S. mansoni* foram definidos com o encontro de >400 ovos por grama de fezes (OPG), infecção moderada com 100-399 OPG e leve com 1-99 OPG (RESENDE *et al.*, 2019). Outras infecções parasitárias foram investigadas como a ancilostomíase, ascariíase, tricuriíase e infecções causadas por protozoários (amebíase, giardíase, etc) (COUTO *et al.*, 2014). Para aumentar a sensibilidade do diagnóstico de infecções por *S. mansoni*, testes sorológicos também foram executados. A IgG4 específica para o antígeno de verme adulto: *soluble antigen preparation of adult schistosomes* (SWAP), foi mensurada no soro usando o ensaio de ELISA. Resumidamente, placas de 96 poços (Nunc-Maxisorb Nalgel Nunc International, Rochester, Nova Iorque, EUA) foram sensibilizadas durante a noite com 10 µg/ml de SWAP em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,5) e bloqueado com PBS contendo albumina de soro bovino a 1% (BSA, Sigma). As amostras de soro dos participantes foram diluídas 1:100 em PBS contendo 0,1% de BSA e testadas em duplicata. O anticorpo ligado foi detectado por IgG4 anti-humano obtido de

camundongo conjugado com biotina (Sigma) seguido por estreptavidina-fosfatase alcalina. O limiar de reatividade (*cut off* - 0,104) foi determinada pela média de absorbância mais 4 desvios padrão obtidos de amostras de soro de 2 voluntários saudáveis, que haviam sido testados para infecção helmíntica por testes parasitológicos e moleculares, um paciente com carga parasitária moderada e um paciente com carga baixa (FIGURA 13).

Figura 13 - Limiar de reatividade para anticorpo IgG4 anti-SWAP



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 5.4 AVALIAÇÃO DE MICRONUTRIENTES E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.

Amostra de plasma de cada participante foi testada para deficiência de vitamina A, ferro e vitamina D, bem como, avaliação dos parâmetros hematológicos. A principal forma de armazenamento da vitamina D é a 25D, que está presente no sangue em uma concentração até 1.000 vezes maior que a da 1,25D. A 25D possui meia-vida de 2 a 3 semanas, contra 4 horas da 1,25D. Por isso, a 25D é o analito escolhido para determinar o estado da vitamina D (CAVALIER *et al.*, 2009; HOLICK *et al.*, 2011). O valor considerável para população saudável é acima de 20,0 ng/mL para ambos os sexos. Para ferritina os valores de referência são definidos como se segue: ferritina <12 ug/L (GRANT *et al.*, 2012). A ferritina foi selecionada pois oferece uma medida mais sensível, específica e confiável para determinar a deficiência de ferro em estágio precoce (BATES, 1980). Um nível sérico de Vitamina A <0,3 mg/L pode ser considerado deficiência de vitamina A (HIX *et al.*, 2006). As amostras foram processadas e analisadas por um laboratório de análises clínicas de Governador Valadares, através de um contrato de prestação de serviço de exames laboratoriais.

## 6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Serão descritas as análises estatísticas utilizadas para obtenção dos resultados desse trabalho.

### 6.1 TESTE DE MANN-WHITNEY

Inicialmente a análise da produção de citocinas e quimiocinas, bem como análise dos parâmetros hematológicos, produção de IgG4 contra antígeno de verme adulto e análise dos micronutrientes foi realizada utilizando uma metodologia quantitativa aplicando teste não paramétrico, uma vez que os dados não atenderam a uma distribuição normal (Gaussiana). Desta forma, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para comparar as medianas entre os grupos. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ . Análise estatística foi realizada com auxílio do software R.

### 6.2 TESTE T STUDENT

Em um segundo momento, adotamos o teste *T Student* para avaliar os parâmetros imunológicos, hematológicos, sorológicos e nutricionais. Como os nossos dados não apresentavam uma distribuição normal, foi aplicado a transformação das variáveis para escala logarítmica. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ . Análise estatística foi realizada com auxílio do software R.

### 6.3 TESTE QUI QUADRADO

O teste qui-quadrado é um teste de hipóteses que se destina a encontrar um valor da dispersão para duas variáveis categóricas nominais e avaliar a associação existente entre variáveis qualitativas. É um teste não paramétrico cujo princípio básico é comparar proporções, ou seja, possíveis divergências entre as frequências observadas e esperadas para um certo evento. Essa análise pode ser utilizada para verificar a frequência com que uma determinada variável observada em uma amostra se desvia significativamente ou não da frequência com que é esperado. Nesse estudo, as estatísticas descritivas e univariadas foram realizadas por meio do teste qui-quadrado com auxílio do software R.

#### 6.4 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A análise de componentes principais (PCA), do inglês “*Principal Component Analysis*” (PCA) é um método que tem por finalidade básica, a análise dos dados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais.

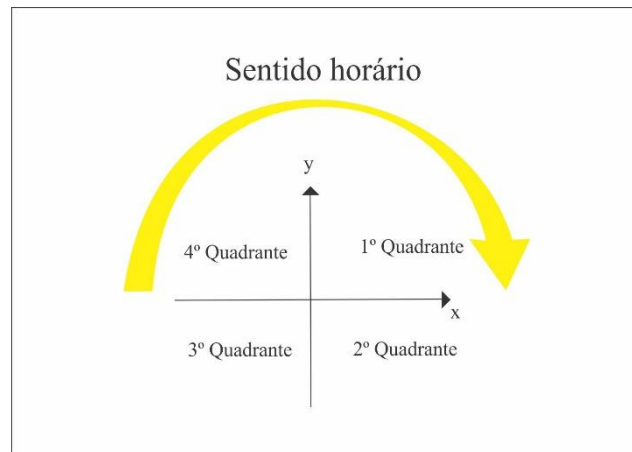
A PCA é uma técnica de análise multivariada que pode ser usada para analisar inter-relações entre um grande número de variáveis e explicar essas variáveis em termos de suas dimensões inerentes (componentes). O objetivo é encontrar um meio de condensar a informação contida em várias variáveis originais em um conjunto menor de variáveis estatísticas (componentes) com uma perda mínima de informação. O número de componentes principais se torna, então, o número de variáveis consideradas na análise, mas geralmente os componentes mais importantes explicam a maior parte da variação total.

Para a seleção das melhores variáveis para análise de PCA é necessário adotar um critério. Utilizar apenas as variáveis que foram significativas nas análises bivariadas realizada não é recomendado, uma vez que, as variáveis podem apresentar um comportamento distinto para a análise multivariada. Sendo assim, torna-se necessário selecionar outras variáveis que poderiam vir a ser significativas na análise multivariada. Dessa forma, foram selecionadas todas as variáveis que apresentaram o valor de  $p < 0,3$ . Esse ponto de corte é muito utilizado na área de medicina e por isso adotamos esse critério. Utilizamos a análise de PCA para estabelecer um padrão de correlação dos diversos biomarcadores entre os grupos estudados por meio da análise de PCA com auxílio do software R.

Para ilustrar, a figura 14 representa o modelo como são apresentados os gráficos referentes a uma análise PCA. O eixo X e o eixo Y dividem o plano cartesiano em quatro partes as quais são chamadas de quadrantes. O lado superior esquerdo é o primeiro quadrante, o inferior esquerdo o segundo quadrante, enquanto que o terceiro quadrante está ao lado do segundo. Já o quarto situa-se acima do terceiro. Os quadrantes estão dispostos em sentido horário.

O anexo 3, apresenta as variáveis que mais contribuíram para explicar a variabilidade do teste dentro das dimensões 1 e 2.

Figura 14 - Representação dos quadrantes no plano cartesiano



Fonte: GREENACRE (2007).

## 6.5 REGRESSÃO LOGÍSTICA

A regressão logística constitui uma ferramenta estatística importante na análise de dados quando se pretende avaliar as relações entre as variáveis. O principal objetivo deste modelo é explorar a relação entre uma ou mais variáveis explicativas (ou independentes) e uma variável resposta (ou dependente). Utilizamos essa análise pois é um recurso que permite estimar a probabilidade associada à ocorrência de determinado evento em face de um conjunto de variáveis. Assim como ocorre nas demais análises, na regressão logística uma variável é significativa apenas quando o valor de  $p$  é  $<0,05$ . Na regressão, o valor  $p$  expressa se um coeficiente é igual ou diferente de zero. Caso seja igual a zero significa que o coeficiente não apresenta nenhuma influência na variável de estudo.

O software R foi utilizado para realizar a regressão logística. Para o desenvolvimento da regressão no R, utilizamos uma metodologia de seleção de variável denominada *StepWise*. O *Step Wise* é um processo de seleção automático que testa todas as variáveis, incluindo em cada etapa do modelo a variável que é mais significativa ou ajuda na predição. Por meio do *Step Wise* é possível analisar uma estatística denominada Critério de Informação de *Akaike* (AIC).

O AIC é uma medida que representa a qualidade de ajuste do modelo. Dessa forma, o software busca entre todas as combinações possíveis das variáveis presentes no banco de dados, aquelas que retornam melhor qualidade de ajuste para o modelo.

É importante ressaltar que a regressão logística é uma análise multivariada. Sendo assim, uma variável que apresenta um comportamento significativo na análise bivariada, pode

não apresentar um valor de  $p$  significativo na análise de regressão, uma vez que, poderá sofrer a influência de outras variáveis.

Portanto, para o nosso estudo a regressão logística foi utilizada com a finalidade de verificar quais os biomarcadores estão relacionadas com a hanseníase.

É importante ressaltar que para a regressão logística, as citocinas e quimiocinas foram classificadas por meio de quartis como baixa, média e alta produção. Sendo:

- Baixa produção (*Low*): abaixo do Q1.
- Média produção (*Medium*): entre Q1 e Q3.
- Alta produção (*High*): acima de Q3.

## 7 RESULTADOS

Os dados gerados no presente estudo serão apresentados em quatro tópicos. No primeiro (TÓPICO I) os resultados estão relacionados à caracterização do grupo de estudo. No segundo (TÓPICO II), análise das características associadas à infecção pelo *M. leprae*. O terceiro (TÓPICO III) refere-se à análise das características associadas à infecção por *S. mansoni*. E por fim, o quarto tópico (TÓPICO IV) apresenta a análise das características associadas à co-infecção (*M. leprae* e *S. mansoni*).

### 7.1 TÓPICO I CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO

Questionários estruturados e pré-codificados foram aplicados aos participantes do estudo para investigar: (1) dados demográficos, (2) dados sócio-econômicos, (3) caracterização das moradias, (4) hábitos e tipos de contato com água e (5) histórico de infecção anterior pelo *S. mansoni*. Dos 79 casos novos de hanseníase, 23 pacientes foram classificados como PB e 56 pacientes classificados como MB. Os dados foram registrados em um banco de dados especificamente estruturado para este estudo usando o software Epi Data 2.1a.

Nesse primeiro momento, separamos os participantes em três grupos. O grupo denominado controle, foi composto por indivíduos sem sintomatologia para a hanseníase (contato e controle negativo). Além disso, separamos os casos em dois grupos, o grupo PB e grupo MB. Para essa avaliação não levamos em consideração a co-infecção por *S. mansoni*. A análise estatística para a caracterização dos grupos de estudo foi realizada usando a distribuição de frequência de todas as variáveis qualitativas e quantitativas. As características referentes aos dados dos grupos estudados estão apresentadas na tabela 1.

A proporção dos participantes por gênero foi de 55,1% (98) para o sexo feminino e 44,9% (80) para o masculino no grupo controle e entre os casos, 52,2% (12) do grupo PB e 41,1% (23) do grupo MB eram do sexo feminino. Em relação ao sexo masculino, 47,8% (11) eram do grupo PB e 58,9% (33) eram do grupo MB. A idade dos participantes variou de 5 a 99 anos. Com relação ao nível de escolaridade observou-se que 57,3% (102) dos indivíduos do grupo controle, 65,2% (15) dos casos PB e 73,2% (41) dos casos MB apresentaram nível básico de escolaridade.

A maioria dos participantes apresentou cor de pele parda ( $p=0,026$ ) e em relação ao estado civil 53,4% (95) dos indivíduos do grupo controle e 60,7% (34) dos casos MB eram casados, entretanto, a maioria dos casos PB 47,8% (11) eram solteiros ( $p=0,040$ ).



Ao avaliarmos o tempo de moradia no município, verificamos que os participantes de todos os grupos residiam mais de 5 anos naquele local ( $p=0,004$ ) e sobre a localização, 40,4% (72) dos indivíduos do grupo controle, 52,2% (12) dos casos PB e 42,9% (24) dos casos MB residiam em zona rural ( $p=0,004$ ).

Quando perguntado aos participantes se alguém na família teve hanseníase, verificamos que 34,3% (61) dos indivíduos do grupo controle, 30,4% (7) dos casos PB e 25% (14) dos casos MB responderam positivamente ( $p=0,000$ ).

Em relação à fonte de água, verificou-se que a maioria possuía água encanada e, de um modo geral, os participantes não possuíam o hábito de filtrar a água para o consumo.

Verificamos com os participantes sobre a infecção por helmintos e protozoários no passado. Dos 170 indivíduos do grupo controle, 70,2% (125), relataram ter tido verminose no passado e dentre os casos 60,9% (14) do grupo PB e 51,8% (29) do grupo MB também informaram ter tido verminose em algum momento da vida.

Ao avaliarmos o comportamento das variáveis laboratoriais nos grupos, verificou-se que a contagem de linfócitos ( $p=0,007$ ) em 78,3% (18) do grupo PB e 69,6% (39) do grupo MB apresentou valores abaixo do considerado normal. A contagem de hemácia ( $p=0,032$ ) e concentração da hemoglobina ( $p=0,039$ ) também apresentaram valores abaixo nos grupos PB e MB. Além disso, uma deficiência de vitamina D foi observada em 39,11% (09) dos casos PB e 23,3% (13) dos casos MB ( $p=0,036$ ).

Tabela 1 - Caracterização do grupo de estudo

Sócio-demográfico	Classificação			p-valor	
	Controle N (%)	Paucibacilar N (%)	Multibacilar N (%)		
Idade	Até 24 anos	58 (32,6)	10 (43,5)	9 (16,1)	0,157
	De 25 a 34 anos	21 (11,8)	0 (0,0)	5 (8,9)	
	De 35 a 44 anos	26 (14,6)	4 (17,4)	8 (14,3)	
	De 45 a 54 anos	33 (18,5)	3 (13,0)	12 (21,4)	
	De 55 a 64 anos	21 (11,8)	2 (8,7)	11 (19,6)	
	Acima de 65 anos	19 (10,7)	4 (17,4)	11 (19,6)	
Gênero	Feminino	98 (55,1)	12 (52,2)	23 (41,1)	0,188
	Masculino	80 (44,9)	11 (47,8)	33 (58,9)	
Cor da pele	Amarela	03 (1,7)	00 (0,0)	00 (0,0)	<b>0,026</b>
	Branca	44 (24,7)	06 (26,1)	7 (12,5)	
	Indígena	00 (0,0)	00 (0,0)	1 (1,8)	
	Parda	97 (54,5)	13 (56,5)	26 (46,4)	
	Preta	26 (14,6)	02 (8,7)	12 (21,4)	
	NR	08 (4,5)	02 (8,7)	10 (17,9)	
ZONA	Rural	72 (40,4)	12 (52,2)	24 (42,9)	<b>0,004</b>
	Urbana	105 (59,0)	11 (47,8)	27 (48,2)	
	NR	01 (0,6)	00 (0,0)	5 (8,9)	
Grau de Escolaridade	Fundamental	102 (57,3)	15 (47,8)	41 (73,2)	0,162
	Médio	44 (24,7)	04 (17,4)	7 (12,5)	
	Nunca Estudou	16 (9,0)	03 (13,0)	8 (14,3)	
	Superior	14 (7,9)	01 (4,3)	0 (0,0)	
	NR	02 (1,1)	00 (0,0)	0 (0,0)	
Estado Civil	Casado	95 (53,4)	10 (43,5)	34 (60,7)	<b>0,040</b>
	Divorciado	07 (3,9)	01 (4,3)	7 (12,5)	
	Solteiro	69 (38,8)	11 (47,8)	10 (17,9)	
	Viúvo	06 (3,4)	01 (4,3)	5 (8,9)	
	NR	01 (0,6)	00 (0,0)	0 (0,0)	
	Menos de 1 ano	02 (1,1)	00 (0,0)	2 (3,6)	
Há quanto tempo mora no município?	De 1 a 5 anos	07 (3,9)	03 (13,0)	2 (3,6)	0,004
	Mais de 5 anos	159 (89,3)	18 (78,3)	40 (71,4)	
	NR	10 (5,6)	02 (8,7)	12 (21,4)	
Renda familiar	Menos que 1 sm	50 (28,1)	09 (39,1)	21 (37,5)	0,709
	Entre 1 a 3 sm	111 (62,4)	11 (47,8)	31 (55,4)	
	Entre 3 a 5 sm	12 (6,7)	02 (8,7)	3 (5,4)	
	Mais que 5 sm	03 (1,7)	01 (4,3)	0 (0,0)	
	NR	02 (1,1)	00 (0,0)	1 (1,8)	

Alguém na família teve Hanseníase?	Não	96 (53,9)	10 (43,5)	17 (30,4)	<b>0,00</b>
	Sim	61 (34,3)	07 (30,4)	14 (25,0)	
	NA	00 (0,0)	02 (8,7)	1 (1,8)	
	NR	21 (11,8)	04 (17,4)	24 (42,9)	
Alguém que mora com você tem hanseníase?	Não	105 (59,0)	11 (47,8)	36 (64,3)	0,186
	Sim	70 (39,3)	12 (52,2)	16 (28,6)	
	NA	01 (0,6)	00 (0,0)	1 (1,8)	
	NR	02 (1,1)	00 (0,0)	3 (5,4)	
Verminose no passado	Não	46 (25,8)	09 (39,1)	25 (44,6)	0,073
	Sim	125 (70,2)	14 (60,9)	29 (51,8)	
	NR	07 (3,9)	00 (0,0)	2 (3,6)	
Fonte de água	Córrego	02 (1,1)	01 (4,3)	0 (0,0)	0,538
	Encanada	126 (70,8)	17 (73,9)	38 (67,9)	
	Poço	44 (24,7)	04 (17,4)	15 (26,8)	
	Outros	06 (3,4)	01 (4,3)	2 (3,6)	
	NR	00 (0,0)	00 (0,0)	1 (1,8)	
Realiza tratamento (filtra) de água?	Não	88 (49,4)	13 (56,5)	37 (66,1)	0,200
	Sim	86 (48,3)	10 (43,5)	19 (33,9)	
	NR	04 (2,2)	00 (0,0)	0 (0,0)	
Sistema de esgoto	Encanada	130 (73,0)	16 (69,6)	43 (76,8)	0,347
	Fossa	38 (21,3)	07 (30,4)	12 (21,4)	
	Não há esgoto	03 (1,7)	00 (0,0)	0 (0,0)	
	Sem encanamento	07 (3,9)	00 (0,0)	0 (0,0)	
	NR	00 (0,0)	00 (0,0)	1 (1,8)	
Parâmetros laboratoriais		Classificação			p-valor
		Controle N (%)	Paucibacilar N (%)	Multibacilar N (%)	
Linfócito	Insuficiente	92 (51,7)	18 (78,3)	39 (69,6)	<b>0,007</b>
	Suficiente	86 (48,3)	05 (21,7)	17 (30,4)	
Monócito	Insuficiente	175 (98,3)	22 (95,7)	56 (100,0)	0,354
	Suficiente	03 (1,7)	01 (4,3)	0 (0,0)	
Hemácia	Insuficiente	11 (6,2)	04 (17,4)	9 (16,1)	<b>0,032</b>
	Suficiente	167 (93,8)	19 (82,6)	47 (83,9)	
Hemoglobina	Insuficiente	27 (15,2)	04 (17,4)	17 (30,4)	<b>0,039</b>
	Suficiente	151 (84,8)	19 (82,6)	39 (69,6)	
Hematócrito	Insuficiente	30 (16,9)	04 (17,4)	13 (23,2)	0,558
	Suficiente	148 (83,1)	19 (82,6)	43 (76,8)	

Anemia	Anêmico	47 (26,4)	07 (30,4)	22 (39,3)	0,182
	Não anêmico	131 (73,6)	16 (69,6)	34 (60,7)	
Ferritina	Insuficiente	48 (27,0)	04 (17,4)	14 (25,0)	0,608
	Suficiente	130 (73,0)	19 (82,6)	42 (75,0)	
Vitamina A	Insuficiente	77 (43,3)	09 (39,1)	15 (26,8)	0,089
	Suficiente	101 (56,7)	14 (60,9)	41 (73,2)	
Vitamina D	Insuficiente	30 (16,9)	09 (39,1)	13 (23,2)	<b>0,036</b>
	Suficiente	148 (83,1)	14 (60,9)	43 (76,8)	

Legenda: Não se aplica (NA); Não souberam responder (NR).

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

## 7.2 TÓPICO II CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO *M. leprae*

Considerando a importância de caracterizar melhor quais variáveis sociodemográficas e laboratoriais investigadas em nosso estudo estavam associadas com a hanseníase, separamos os participantes em dois grandes grupos, doentes (PB e MB) e sadios (contato e controle negativo), indivíduos sem sintomatologia para a hanseníase. Para essa avaliação não levamos em consideração a co-infecção por *S. mansoni*, tabela 2.

Ao avaliarmos as variáveis sociodemográficas por meio do teste qui-quadrado, observou-se que 73% (125) dos indivíduos considerados sadios apresentaram verminose no passado ( $p=0,007$ ), enquanto que 56% (43) dos pacientes com hanseníase também relataram verminose no passado (OR= 2,149; CI: 95%; 1,224 - 3,771).

A maioria dos indivíduos doentes e sadios estavam casados no período do estudo ( $p=0,045$ ; OR= 0,657; CI: 95%; 0,359 – 1,204). Quando o nível de escolaridade é igual ou inferior ao ensino fundamental, observou-se um somatório de 85% no grupo dos doentes, enquanto que 67% dos indivíduos do grupo sadio apresentaram esse nível. É interessante notar que 33% dos indivíduos do grupo sadio apresentaram níveis de escolaridade superior ( $p=0,019$ ; OR= 0,130; CI: 95%; 0,017 – 1,015).

Ao avaliarmos os parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais verificamos que em relação a taxa de linfócitos cerca de 72% (92) dos pacientes apresentavam valores abaixo do limite considerado normal ( $p=0,002$ ). De acordo com a análise realizada, sugere-se que os indivíduos que apresentam baixa contagem de linfócitos possuem duas vezes mais chances de estarem doentes (OR= 2,422; CI: 95%; 1,365 - 4,296).

Na série vermelha, foi possível observar que 17% (13) dos doentes apresentavam baixa contagem de hemácia ( $p=0,009$ ; OR= 2,990; CI: 95%; 1,276 - 7,010). Além disso, a concentração de hemoglobina também se encontrava abaixo do limite desejável em 27% (21) dos doentes ( $p=0,030$ ; OR= 2,025; CI: 95%; 1,276 - 7,010). Esses dados sugerem que

indivíduos com esses valores, teriam respectivamente 2,990 e 2,025 vezes mais chances de estarem doentes.

Quando analisado os micronutrientes, verificamos que o nível de vitamina A estava dentro dos padrões normais em 70% (55) dos doentes e 57% (101) dos sadios ( $p=0,051$ ; OR= 0,572; CI: 95%; 0,326 - 1,006). Entretanto, com relação à dosagem da vitamina D, verificamos que os doentes apresentaram níveis mais baixos desse micronutriente ( $p=0,043$ ; OR= 1,904; CI: 95%; 1,015 - 3,573).

Tabela 2 - Caracterização do grupo de doentes e de sadios por meio dos dados sócio-demográficos e parâmetros laboratoriais

Sócio-demográfico	Doente		Sadios		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds Ratio	Sup. Odds Ratio	
	n	%	n	%					
Sexo	Masculino	44	56%	80	45%	0,111	1,000	0,904	2,625
	Feminino	35	44%	98	55%				
	Total	79	100%	178	100%				
Idade	Até 24 anos	19	24%	58	33%	0,242	1,000	0,456	4,151
	De 25 a 34 anos	5	6%	21	12%				
	De 35 a 44 anos	12	15%	26	15%				
	De 45 a 54 anos	15	19%	33	19%				
	De 55 a 64 anos	13	17%	21	12%				
	Acima 65 anos	15	19%	19	11%				
	Total	79	100%	178	100%				
Município	Governador Valadares	37	47%	94	53%	0,377	1,000	0,463	1,339
	Limeira de Mantena	42	53%	84	47%				
	Total	79	100%	178	100%				
Zona	Rural	36	49%	72	41%	0,245	1,000	0,801	2,384
	Urbana	38	51%	105	59%				
	Total	74	100%	177	100%				
Há quanto tempo mora no município?	Menos de 1 ano	2	3%	2	1%	0,325	1,000	0,144	13,568
	De 1 a 5 anos	5	8%	7	4%				
	Mais de 5 anos	58	89%	159	95%				
	Total	65	100%	168	100%				
Grau Escolaridade	Superior	1	1%	14	8%	0,019	1,000	0,034	2,413
	Médio	11	14%	44	25%				
	Fundamental	56	71%	102	58%				
	Nunca Estudou	11	14%	16	9%				
	Total	79	100%	176	100%				
Estado Civil	Solteiro	21	27%	69	39%	0,045	1,000	0,359	1,204
	Casado	44	56%	95	54%				
	Divorciado	8	10%	7	4%				
	Viúvo	6	8%	6	3%				
	Total	79	100%	177	100%				
Renda Familiar	Menos de 1 sm	30	39%	50	28%	0,462	1,000	0,892	2,819
	Entre 1 a 3 sm	42	54%	111	63%				
	Entre 3 a 5 sm	5	6%	12	7%				
	Mais 5 sm	1	1%	3	2%				
	Total	78	100%	176	100%				
Cor da Pele	Branca	13	19%	44	26%	0,243	1,000	0,224	1,346
	Preta	14	21%	26	15%				
	Amarela	0	0%	3	2%				
	Parda	39	58%	97	57%				
	Indígena	1	2%	0	0%				
	Total	67	100%	170	100%				
Fonte de Água	Encanada	55	71%	126	71%	0,997	1,000	0,078	9,830
	Córrego	1	1%	2	1%				
	Poço	19	24%	44	25%				
	Outros	3	4%	6	3%				
	Total	78	100%	178	100%				

Sistema de Esgoto	Encanada	59	76%	130	73%	0,199	1,000	0,908	0,483	1,706
	Sem encanamento	0	0%	7	4%					
	Não há esgoto	0	0%	3	2%					
	Fossa	19	24%	38	21%					
	Total	78	100%	178	100%					
Histórico de Schisto	Não	65	89%	147	95%	0,110	1,000	0,442	0,159	1,229
	Sim	8	11%	8	5%					
	Total	73	100%	155	100%					
Realiza tratamento (filtra) de água?	Não	50	63%	88	51%	0,060	1,000	1,685	0,976	2,907
	Sim	29	37%	86	49%					
	Total	79	100%	174	100%					
Verminose no passado	Não	34	44%	46	27%	<b>0,007</b>	1,000	2,149	1,224	3,771
	Sim	43	56%	125	73%					
	Total	77	100%	171	100%					
Alguém na família teve Hanseníase?	Não	27	56%	96	61%	0,545	1,000	0,817	0,425	1,572
	Sim	21	44%	61	39%					
	Total	48	100%	157	100%					
Alguem que mora com você tem hanseníase?	Não	47	63%	105	60%	0,692	1,000	1,119	0,641	1,953
	Sim	28	37%	70	40%					
	Total	75	100%	175	100%					
Parâmetros laboratoriais		Doente		Sadios		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds Ratio	Sup. Odds Ratio	
		n	%	n	%					
Linfócito	Insuficiente	57	72%	92	52%	<b>0,002</b>	1,000	2,422	1,365	4,296
	Suficiente	22	28%	86	48%					
	Total	79	100%	178	100%					
Monócito	Insuficiente	78	99%	175	98%	0,802	1,000	1,337	0,137	13,058
	Suficiente	1	1%	3	2%					
	Total	79	100%	178	100%					
Hemácia	Insuficiente	13	17%	11	6%	<b>0,009</b>	1,000	2,990	1,276	7,010
	Suficiente	66	84%	167	94%					
	Total	79	100%	178	100%					
Hemoglobina	Insuficiente	21	27%	27	15%	<b>0,030</b>	1,000	2,025	1,062	3,862
	Suficiente	58	73%	151	85%					
	Total	79	100%	178	100%					
Hematócrito	Insuficiente	17	22%	30	17%	0,372	1,000	1,353	0,696	2,630
	Suficiente	62	79%	148	83%					
	Total	79	100%	178	100%					
Ferretina	Insuficiente	18	23%	48	27%	0,479	1,000	0,799	0,429	1,487
	Suficiente	61	77%	130	73%					
	Total	79	100%	178	100%					
Vitamina D	Insuficiente	22	28%	30	17%	<b>0,043</b>	1,000	1,904	1,015	3,573
	Suficiente	57	72%	148	83%					
	Total	79	100%	178	100%					
Anemia	Anêmico	37	47%	80	45%	0,779	1,000	1,079	0,634	1,836
	Não anêmico	42	53%	98	55%					
	Total	79	100%	178	100%					

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

### 7.2.1 Avaliação dos parâmetros laboratoriais dos grupos de doentes *versus* sadios por meio do teste *Mann-Whitney*

Os parâmetros laboratoriais também foram avaliados pelo teste *Mann-Whitney*. Foi possível observar uma maior contagem de monócitos ( $p=0,022$ ) no grupo de doentes. Por outro lado, a contagem de hemácia ( $p=0,013$ ), a porcentagem dos valores de hematócrito ( $p=0,030$ ) e a concentração de vitamina D ( $p=0,032$ ) apresentaram valores mais baixos nesse mesmo grupo (tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais dos grupos de doentes *versus* sadios

Parâmetros laboratoriais	Sadios		Doentes		
	Média (DP)	Mediana	Média (DP)	Mediana	( <i>p</i> -valor)
IgG4 Anti-SWAP	0,21 (0,03)	0,12	0,27 (0,06)	0,12	0,537
BASÓFILO	0,44 (0,04)	0,3	0,57 (0,16)	0,3	0,680
EOSINÓFILO	2,76 (0,22)	2	3,36 (0,4)	2,6	0,139
LINFÓCITO	29,19 (0,68)	29,2	31,22 (1,16)	31,45	0,094
MONÓCITO	4,87 (0,19)	4,4	5,61 (0,29)	5,3	<b>0,022</b>
HEMÁCIA	4,62 (0,03)	4,6	4,48 (0,05)	4,42	<b>0,013</b>
HEMOGLOBINA	13,74 (0,15)	13,5	13,39 (0,15)	13,25	0,146
HEMATÓCRITO	42,56 (0,31)	42,2	41,35 (0,47)	41	<b>0,030</b>
FERRITINA	140,12 (19,37)	89,5	150,29 (18,2)	98,5	0,473
VITAMINA A	0,53 (0,02)	0,49	0,53 (0,02)	0,53	0,556
VITAMINA D	32,32 (0,78)	31	29,99 (1,42)	27,6	<b>0,032</b>

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

### 7.2.2 Características do grupo de doentes *versus* sadios por meio da análise de PCA

Com o intuito de analisar a relação entre as variáveis e como elas se comportam em conjunto entre os indivíduos dos grupos de doentes e sadios, foi aplicado a PCA. A análise de PCA propõe reduzir um grande número de variáveis criando novas variáveis, denominadas de eixos principais. Além disso, o método ordena os pontos em um gráfico bi-dimensional (X e Y). Os pontos ordenados se referem aos valores de citocinas, quimiocinas, micronutrientes e sorológico (IgG4 anti-SWAP) obtidos no estudo.

No processo de análise por PCA, cada variável corresponde a um componente principal. Por se tratar de uma análise bi-dimensional, apenas os componentes 1 e 2 são suficientes para explicar a maioria das variáveis. O componente um é capaz de explicar uma porcentagem, assim



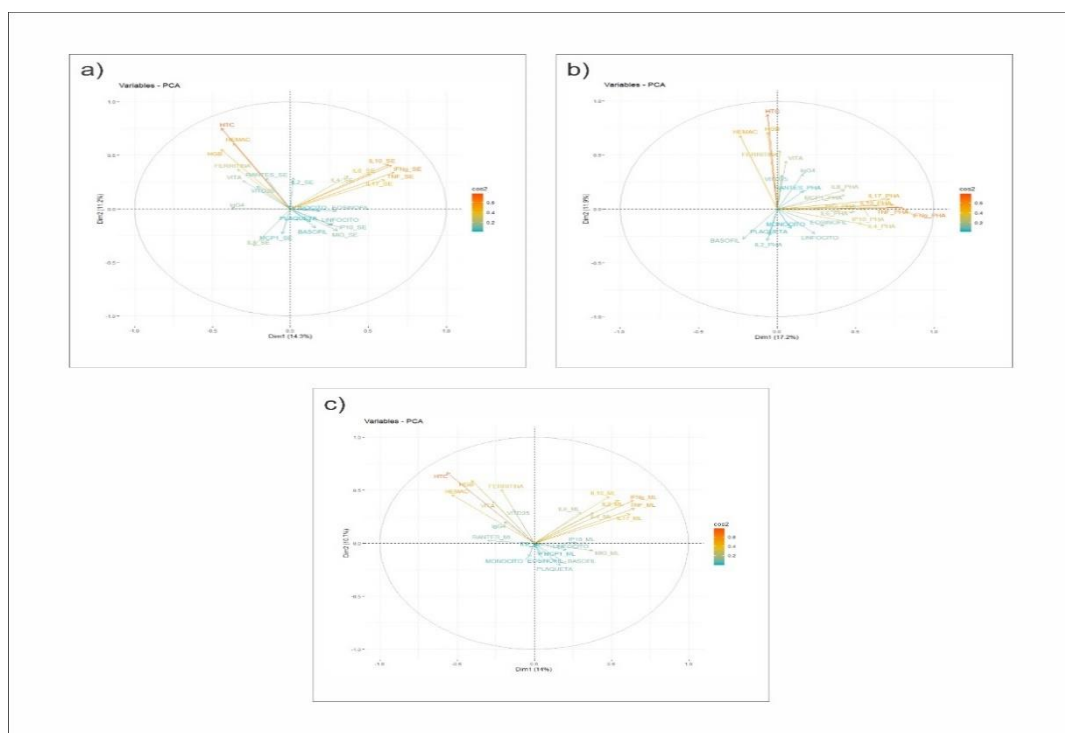
como o componente 2. A soma das porcentagens de cada componente refere-se o quanto aquele sistema foi capaz de explicar a variabilidade dos dados.

Esta análise pode ser utilizada para agrupamento de indivíduos, em relação às variáveis analisadas. Dessa forma, o teste reúne os indivíduos de acordo com suas variâncias, ou seja, segundo seu comportamento dentro de uma população.

A análise PCA é um procedimento matemático que identifica a relação entre as características extraídas dos dados, sendo assim, as variáveis que estão em um mesmo quadrante, são variáveis consideradas correlacionadas, enquanto que, as variáveis que se encontram em quadrantes opostos não apresentam correlação.

As figuras 15a, 15b e 15c mostram a disposição dos vetores (setas) correspondentes para cada citocina, quimiocina, bem como os dados sorológicos, hematológicos e micronutrientes. Pode-se observar que os vetores para cada citocina, na cultura de PBMC sem estímulo (SE), estão concentrados no quadrante 1, entretanto, os vetores para as quimiocinas estão localizados nos quadrantes 2 e 3. Estão concentrados no quadrante 4, os vetores relacionados aos dados sorológicos, hematológicos e micronutrientes (FIGURA 15a).

Figura 15 - Disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, comparando grupos de doentes e sadios por meio da análise de PCA



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O tamanho dos vetores (setas) indica a força das variáveis. Para a avaliação das variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC não estimuladas SE (a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-SWAP) e nutricionais (vit. A e vit. D) foram incluídas (FIGURA 15).

Considerando a cultura de PBMC estimulada por PHA, pode-se observar que os vetores referentes aos dados de micronutrientes, como vitamina A e vitamina D, bem como, o sorológico representado pela IgG4 anti-SWAP, foram deslocados para o quadrante 1, enquanto que os vetores de citocinas como IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram deslocados para o quadrante 2, porém, apesar de deslocadas, essas variáveis continuaram correlacionadas, como mostra a figura 15b.

Por fim, na cultura estimulada pelo antígeno de *M. leprae*, os vetores apresentaram disposição semelhante ao observado na cultura sem estímulo (FIGURA 15c).

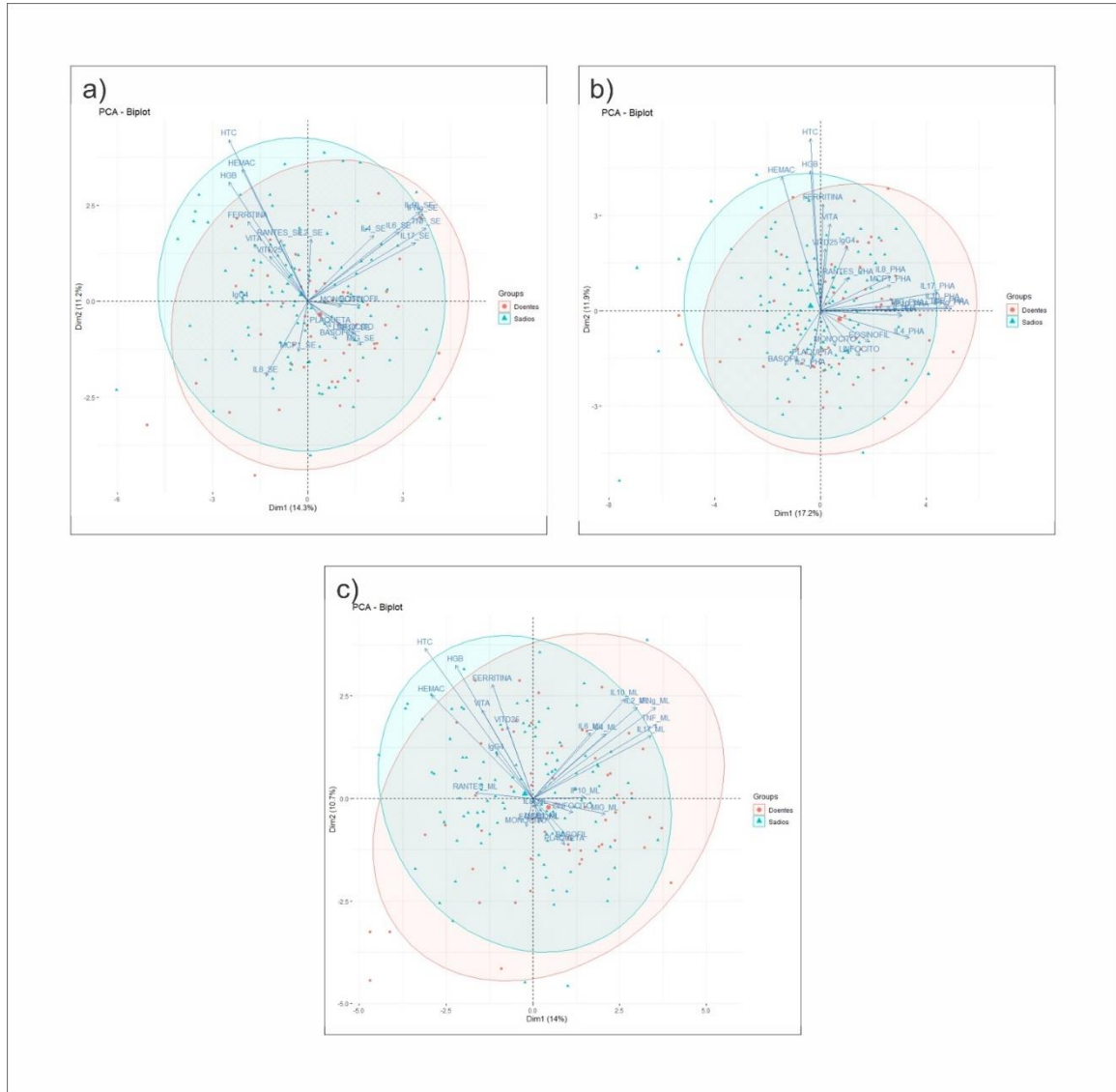
Os resultados a seguir são referentes à análise de PCA avaliando os grupos de doentes e sadios. Para essa análise foram incluídas as variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, com o intuito de verificar quais estão correlacionadas com os grupos de doentes e sadios. Na figura 16a, quando considerado as variáveis imunológicas, na cultura sem estímulo, verificamos uma maior correlação das citocinas IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no grupo dos doentes. É importante ressaltar que nesse grupo estão incluídos os pacientes PB e MB. Ao avaliarmos os parâmetros hematológicos, observou-se que os valores normais de hemácia, hemoglobina, hematócrito e ferritina apresentaram associação com o grupo dos sadios. Essa análise foi capaz de explicar 25,5% da variabilidade.

Por outro lado, quando avaliado os mesmos parâmetros, porém, considerando as citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC estimulada com PHA, verificou-se um leve deslocamento das circunferências representativas desses grupos. Mais uma vez, foi possível observar que os parâmetros hematológicos (HEMAC, HGB e HTC) estão correlacionados com o grupo de sadios e as citocinas (IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17 e TNF- $\alpha$ ) com grupo de doentes. A análise dos componentes (D1 e D2) para cultura de PBMC estimulada com PHA foi capaz de explicar 29,1% da variabilidade, figura 16b.

A avaliação desses parâmetros em cultura de PBMC estimulada por *M. leprae* demonstrou um comportamento diferenciado em relação ao observado anteriormente. Nesse caso, verificou-se que o grupo de doentes apresentou vetores com menor força associados às vitaminas A e D. Entretanto, em relação às citocinas (IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-17 e TNF- $\alpha$ ),

verificou-se uma maior associação com o grupo de doentes. Nessa análise foi possível explicar 24,7% da variabilidade, figura 16c.

Figura 16 - Caracterização dos grupos doentes e sadios em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O tamanho dos vetores (setas) indica a força das variáveis. Para a avaliação das variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC não estimuladas SE (a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-WAP) e nutricionais (vit. A e vit. D) foram incluídas. As porcentagens das dimensões 1 e 2, referem-se à capacidade de explicação da variabilidade dos parâmetros (FIGURA 16).

### 7.3 TÓPICO III CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO POR *S. mansoni*

Nesse tópico, os participantes foram agrupados em função do perfil de infecção por *S. mansoni* (infectados e não infectados), sem considerar a infecção pelo *M. leprae*, com o objetivo de compreender melhor o comportamento das variáveis sócio-demográficas e laboratórias na esquistossomose e sua possível influência na co-infecção.

Para determinar o perfil de infecção por *S. mansoni*, foi considerado o indivíduo que apresentava uma das características a seguir: histórico de esquistossomose obtido por meio dos prontuários das ESF, sorologia positiva para IgG4 anti-SWAP (antígeno de verme adulto de *S. mansoni*), presença de ovos de *S. mansoni* nas fezes pelos métodos KK ou HPJ (não sendo necessário apresentar os dois exames coprológicos positivos). Dessa forma, identificamos 134 indivíduos com perfil de infecção e 123 não infectados por *S. mansoni*.

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos por meio do teste qui-quadrado, onde foi possível verificar quais as características estão associadas aos grupos dos indivíduos infectados por *S. mansoni* versus não infectados.

Esses resultados demonstraram que 61% (82) dos indivíduos do sexo masculino e 39% (52) do sexo feminino apresentavam esquistossomose ( $p=0,000$ ; OR= 3,041; CI: 95%; 1,827 - 5,062) Sobre o grau de escolaridade, observou-se que 61% (80) do grupo infectado pelo *S. mansoni* e 63% (78) do grupo não infectado apresentavam nível fundamental de escolaridade ( $p=0,017$ ; OR= 6,338; CI: 95%; 1,385 - 29,006).

Ao avaliarmos os parâmetros hematológicos, foi possível verificar que 35% (47) dos indivíduos do grupo infectado apresentavam uma concentração de ferritina abaixo dos valores normais ( $p=0,000$ ; OR= 2,957; CI: 95%; 1,616 - 5,411). Além disso, avaliamos o perfil de anemia. Para essa análise consideramos as variáveis hemácia, hemoglobina, hematócrito e ferritina. Baseado nesses parâmetros observamos que 53% (71) dos indivíduos do grupo infectado apresentavam perfil anêmico, enquanto que 63% (77) dos indivíduos do grupo não infectado não demonstraram um perfil de anemia ( $p=0,012$ ; OR= 1,886; CI: 95%; 1,146 - 3,106).

Quando analisados os micronutrientes, verificamos que a concentração de vitamina A era adequada em 54% (72) dos indivíduos do grupo de infectados e em 68% (84) dos indivíduos do grupo não infectados ( $p=0,017$ ; OR= 1,855; CI: 95%; 1,114 - 3,087).

Tabela 4 - Caracterização do grupo infectado e não infectado pelo *S. mansoni* através dos dados sócio-demográficos e parâmetros laboratoriais

Sócio-demográfico		Infectados		Não Infectados		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds Ratio	Sup. Odds Ratio
		n	%	n	%				
Sexo	Masculino	82	61%	42	34%	<b>0,000</b>	1,000	1,827	5,062
	Feminino	52	39%	81	66%		3,041		
	Total	134	100%	123	100%				
Idade	Até 24 anos	36	27%	41	33%	0,155	1,000	0,361	2,137
	De 25 a 34 anos	13	10%	13	11%		0,878		
	De 35 a 44 anos	17	13%	21	17%		1,085		
	De 45 a 54 anos	25	19%	23	19%		0,808		
	De 55 a 64 anos	18	13%	16	13%		0,780		
	Acima 65 anos	25	19%	9	7%		0,316		
	Total	134	100%	123	100%				
Município	Governador Valadares	71	53%	60	49%	0,501	1,000	0,725	1,932
	Limeira de Mantena	63	47%	63	51%		1,183		
	Total	134	100%	123	100%				
Zona	Rural	58	44%	50	42%	0,677	1,000	0,674	1,835
	Urbana	73	56%	70	58%		1,112		
	Total	131	100%	120	100%				
Há quanto tempo mora no município?	Menos de 1 ano	2	2%	2	2%	0,955	1,000	0,104	9,614
	De 1 a 5 anos	6	5%	6	6%		1,000		
	Mais de 5 anos	117	94%	100	93%		0,855		
	Total	125	100%	108	100%				
Grau Escolaridade	Superior	13	10%	2	2%	<b>0,017</b>	1,000	1,859	44,001
	Médio	23	17%	32	26%		9,043		
	Fundamental	80	61%	78	63%		6,338		
	Nunca Estudou	16	12%	11	9%		4,469		
	Total	132	100%	123	100%				
Estado Civil	Solteiro	45	34%	45	37%	0,702	1,000	0,502	1,451
	Casado	75	56%	64	52%		0,853		
	Divorciado	6	5%	9	7%		1,500		
	Viúvo	7	5%	5	4%		0,714		
	Total	133	100%	123	100%				
Renda Familiar	Menos de 1 sm	39	30%	41	34%	0,158	1,000	0,532	1,571
	Entre 1 a 3 sm	78	59%	75	62%		0,915		
	Entre 3 a 5 sm	11	8%	6	5%		0,519		
	Mais de 5 sm	4	3%	0	0%		0,000		
	Total	132	100%	122	100%				
Cor da Pele	Branca	29	24%	28	24%	0,439	1,000	0,273	1,417
	Preta	25	21%	15	13%		0,621		
	Amarela	1	1%	2	2%		2,071		
	Parda	66	54%	70	61%		1,098		
	Indígena	1	1%	0	0%		0,000		
	Total	122	100%	115	100%				
Fonte de Água	Encanada	96	72%	85	69%	0,653	1,000	0,050	6,339
	Córrego	2	2%	1	1%		0,565		
	Poço	32	24%	31	25%		1,094		
	Outros	3	2%	6	5%		2,259		
	Total	133	100%	123	100%				

Sistema de Esgoto	Encanada	98	74%	91	74%	0,503	1,000	0,510	14,223
	Sem encanamento	2	2%	5	4%				
	Não há esgoto	1	1%	2	2%				
	Fossa	32	24%	25	20%				
	Total	133	100%	123	100%				
Histórico de Schisto	Não	94	86%	118	100%	<b>0,000</b>	1,000	0,000	0,000
	Sim	16	15%	0	0%				
	Total	110	100%	118	100%				
Realiza tratamento (filtra) de água?	Total	131	100%	119	100%	0,613	1,000	0,536	1,445
	Não	70	53%	68	56%				
	Sim	62	47%	53	44%				
Verminose no passado	Não	38	29%	42	36%	0,284	1,000	0,438	1,275
	Sim	92	71%	76	64%				
	Total	130	100%	118	100%				
Alguém na família teve Hanseníase?	Não	64	60%	59	60%	0,954	1,000	0,562	1,721
	Sim	43	40%	39	40%				
	Total	107	100%	98	100%				
Alguém que mora com você tem hanseníase?	Não	85	65%	67	56%	0,165	1,000	0,861	2,388
	Sim	46	35%	52	44%				
Parâmetros laboratoriais		Infectados		Não Infectados		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds Ratio	Sup. Odds Ratio
		n	%	n	%				
Linfócito	Insuficiente	79	59%	70	57%	0,740	1,000	0,662	1,786
	Suficiente	55	41%	53	43%				
	Total	134	100%	123	100%				
Monócito	Insuficiente	132	99%	121	98%	0,931	1,000	0,151	7,865
	Suficiente	2	2%	2	2%				
	Total	134	100%	123	100%				
Hemácia	Insuficiente	15	11%	9	7%	0,286	1,000	0,672	3,794
	Suficiente	119	89%	114	93%				
	Total	134	100%	123	100%				
Hemoglobina	Insuficiente	26	19%	22	18%	0,755	1,000	0,589	2,074
	Suficiente	108	81%	101	82%				
	Total	134	100%	123	100%				
Hematócrito	Insuficiente	27	20%	20	16%	0,420	1,000	0,686	2,461
	Suficiente	107	80%	103	84%				
	Total	134	100%	123	100%				
Ferretina	Insuficiente	47	35%	19	15%	<b>0,000</b>	1,000	1,616	5,411
	Suficiente	87	65%	104	85%				
	Total	134	100%	123	100%				
Vitamina D	Insuficiente	62	46%	39	32%	0,972	1,000	0,538	1,819
	Insuficiente	27	20%	25	20%				
	Suficiente	107	80%	98	80%				
Anemia	Total	134	100%	123	100%	<b>0,012</b>	1,000	1,146	3,106
	Anêmico	71	53%	46	37%				
	Não anêmico	63	47%	77	63%				

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

### 7.3.1 Avaliação dos parâmetros laboratoriais do grupo infectado e não infectado pelo *S. mansoni* pelo teste *Mann-Whitney*

Com relação aos parâmetros imunológicos, observou-se maior produção das citocinas IL-4 ( $p=0,000$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p=0,021$ ) no grupo de infectados quando avaliada a cultura SE. Para as culturas estimuladas com PHA, também se verificou uma maior produção de IL-4 ( $p=0,000$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p=0,040$ ) no grupo de infectados. Quando se avaliou as culturas de PBMC estimuladas com *M. leprae*, observou-se que as citocinas IL-4 ( $p=0,000$ ), IL-10 ( $p=0,035$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p=0,011$ ) estavam mais elevadas no grupo de infectados, enquanto que IFN- $\gamma$  ( $p=0,025$ ) estava mais elevada no grupo de indivíduos não infectados. Para as quimiocinas, não foi observado nenhuma diferença entre os grupos avaliados nas culturas sem estímulo, estimuladas com PHA e *M. leprae* (TABELA 5).

Tabela 5 - Comparação da produção de citocinas e quimiocinas nos grupos infectados e não infectados pelo *S. mansoni*

Citocinas		Infectados		Não Infectados		p-valor
		Média (DP)	Mediana	Média (DP)	Mediana	
IL-17	SE	23,67 (7,40)	3,79	23,12 (5,88)	4,78	0,767
	PHA	62,35 (8,08)	18,86	75,68 (15,40)	15,19	0,222
	ML	18,79 (3,84)	2,97	9,68 (1,74)	3,50	0,633
IFN- $\gamma$	SE	4.995,44 (1.984,13)	221,39	2.030,85 (874,16)	472,70	0,130
	PHA	3.344,52 (872,85)	479,59	3.665,06 (970,10)	411,27	0,968
	ML	1.331,23 (318,88)	308,06	2.267,20 (445,91)	448,07	<b>0,025</b>
TNF- $\alpha$	SE	42,19 (9,68)	8,92	51,86 (19,15)	6,15	<b>0,021</b>
	PHA	112,78 (26,51)	14,38	42,62 (8,74)	9,49	<b>0,040</b>
	ML	42,81 (9,14)	10,58	18,65 (4,02)	6,24	<b>0,011</b>
IL-10	SE	94,14 (13,33)	48,91	157,75 (37,24)	30,10	0,346
	PHA	204,03 (22,69)	125,57	162,70 (19,35)	83,32	0,074
	ML	98,03 (16,64)	55,30	58,56 (6,28)	28,44	<b>0,035</b>
IL-6	SE	9.686,00 (390,97)	9.449,70	10.310,56 (407,96)	10.971,47	0,189
	PHA	10.278,50 (398,71)	10.480,00	10.501,03 (385,45)	10.980,21	0,475
	ML	9.144,32 (403,43)	8.710,99	9.644,03 (429,42)	10.786,37	0,148
IL-4	SE	2,34 (0,62)	0,39	0,45 (0,07)	0,00	<b>0,000</b>
	PHA	2,50 (0,53)	0,33	0,50 (0,16)	0,00	<b>0,000</b>
	ML	1,86 (0,38)	0,38	0,32 (0,06)	0,00	<b>0,000</b>
IL-2	SE	27,49 (3,53)	12,33	24,61 (3,35)	12,05	0,540
	PHA	5,48 (1,33)	1,29	10,93 (3,80)	1,36	0,486
	ML	31,38 (4,39)	14,87	27,84 (3,21)	14,41	0,501
Quimiocinas		Infectados		Não Infectados		p-valor
		Média (DP)	Mediana	Média (DP)	Mediana	
IP-10	SE	6.288,12 (1.565,34)	1.524,41	5.568,25 (1.955,00)	1.008,68	0,092
	PHA	10.706,46 (5.229,93)	2.154,03	5.573,54 (1.532,08)	2.038,72	0,874
	ML	11.446,11 (5.242,37)	1.417,09	12.010,27 (5.563,24)	851,28	0,163
MCP-1	SE	3.376,05 (133,33)	3.669,79	3.290,01 (140,97)	3.667,57	0,725
	PHA	3.457,37 (152,83)	3.757,06	3.132,40 (142,13)	3.465,18	0,181
	ML	3.426,88 (138,74)	3.591,93	3.133,58 (134,62)	3.471,84	0,219
MIG	SE	17.147,85 (8.420,15)	789,50	24.483,10 (10.394,33)	661,99	0,321
	PHA	35.184,41 (25.809,71)	2.040,08	7.496,25 (2.157,12)	2.319,40	0,683
	ML	28.253,08 (20.618,38)	1.250,96	180.551,46 (97.617,07)	637,35	0,399
RANTES	SE	1.403,46 (172,22)	520,40	1.644,32 (192,13)	816,37	0,454
	PHA	2.231,40 (178,12)	1.748,32	2.563,66 (236,57)	1.828,26	0,649
	ML	1.579,92 (185,65)	624,36	1.721,80 (201,94)	655,80	0,808
IL-8	SE	7.653,05 (519,47)	6.165,78	7.789,62 (509,89)	6.236,84	0,423
	PHA	6.604,06 (436,49)	5.305,35	6.542,57 (437,47)	5.498,43	0,835
	ML	6.936,66 (476,43)	5.460,03	6.653,43 (453,99)	5.449,75	0,745

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Com relação a avaliação de IgG4 anti-SWAP ( $p=0,000$ ), verificou-se que uma maior reatividade desse anticorpo nos indivíduos do grupo infectado. Além disso, alguns parâmetros avaliados no hemograma, como monócitos ( $p=0,026$ ), hemácia ( $p=0,027$ ), hemoglobina ( $p=0,017$ ) e ferritina ( $p=0,019$ ), mostraram diferenças entre o grupo de indivíduos infectados por *S. mansoni* quando comparado com o grupo de indivíduos não infectados (tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais nos grupos infectado e não infectado pelo *S. mansoni*

Parâmetros laboratoriais	Infectados		Não Infectados		
	Média (DP)	Mediana	Média (DP)	Mediana	( <i>p</i> -valor)
IgG4 Anti-SWAP	0,39 (0,04)	0,2	0,03 (0,00)	0,03	<b>0,000</b>
BASÓFILO	0,48 (0,09)	0,3	0,47 (0,06)	0,3	0,061
EOSINÓFILO	3,28 (0,31)	2,3	2,57 (0,23)	1,9	0,080
LINFÓCITO	29,47 (0,84)	30,2	30,18 (0,84)	30,3	0,642
MONÓCITO	5,41 (0,22)	5	4,75 (0,23)	4,4	<b>0,026</b>
HEMÁCIA	4,63 (0,04)	4,63	4,51 (0,04)	4,48	<b>0,027</b>
HEMOGLOBINA	13,84 (0,19)	13,8	13,40 (0,11)	13,2	<b>0,017</b>
HEMATÓCRITO	42,42 (0,38)	42,1	41,95 (0,35)	41,5	0,383
FERRITINA	164,90 (21,53)	103	124,23 (18,76)	86,6	<b>0,019</b>
VITAMINA A	0,54 (0,02)	0,52	0,52 (0,02)	0,48	0,173
VITAMINA D	32,85 (1,07)	30,7	30,29 (0,87)	29,6	0,146

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

### 7.3.2 Análise das características do grupo infectado e não infectado pelo *S. mansoni* por meio da análise de PCA

A análise de PCA também foi realizada com a finalidade de avaliar os participantes em relação à infecção pelo *S. mansoni*. O painel abaixo apresenta a disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais. Para as variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC sem estímulo, estimuladas com PHA e *M. leprae*. Dessa forma na figura 17a, observou-se que os parâmetros imunológicos, como as citocinas estão dispostas no quadrante 1, entretanto as quimiocinas estão distribuídas nos quadrantes 2 e 3. Os parâmetros hematológicos, sorológicos e nutricionais estão localizados no quadrante 4. Na figura 17b, observou-se um deslocamento dos parâmetros sorológicos e nutricionais para o quadrante 1. Entretanto na figura 17c, quando consideramos o perfil imunológico avaliando as citocinas e quimiocinas nas culturas estimuladas com o *M. leprae*, observou-se que todos os parâmetros permaneceram nas mesmas

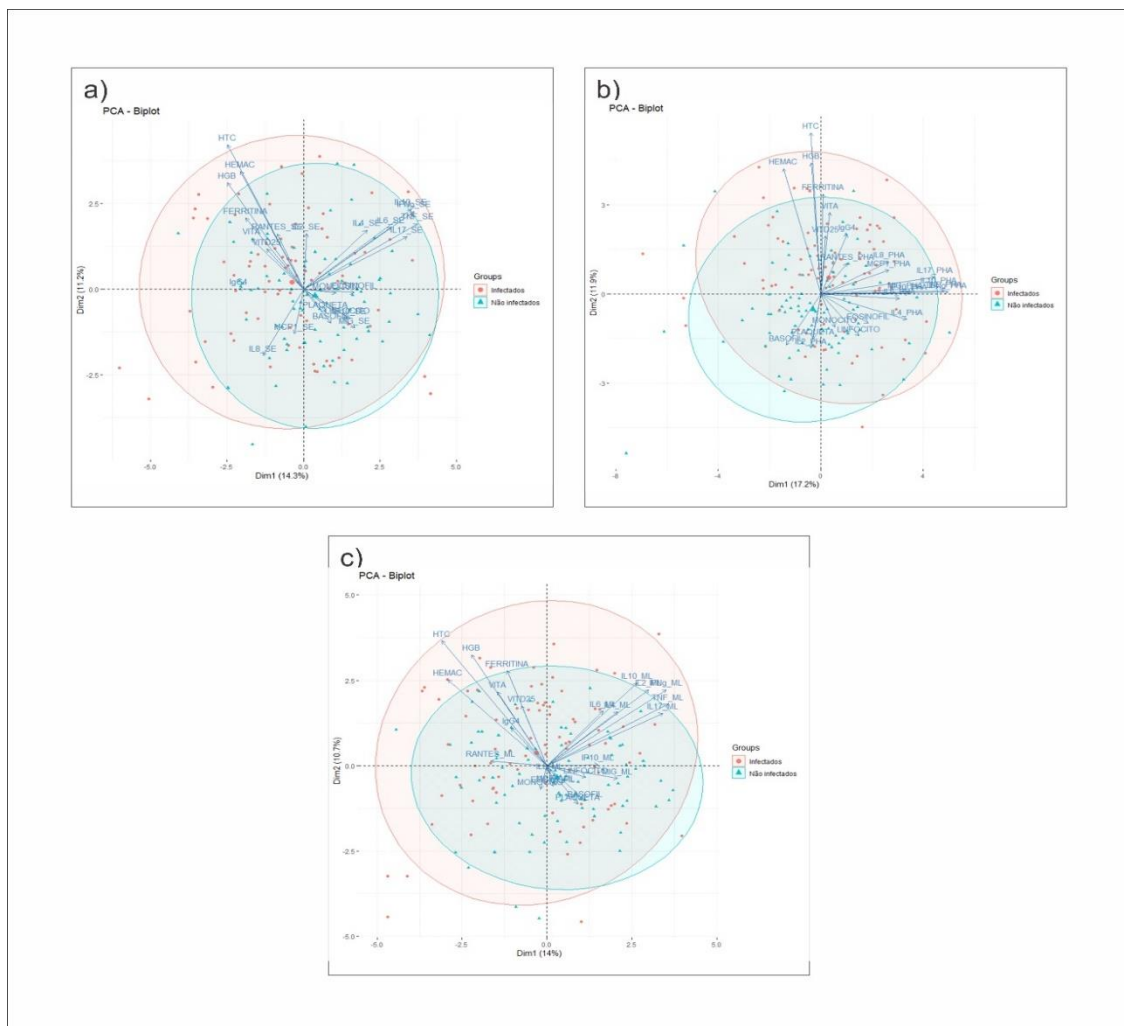




(a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-SWAP) e nutricionais (vit. A e vit. D) foram incluídas (FIGURA 17).

As figuras 18a, 18b e 18c referem-se à caracterização do grupo infectado e não infectado pelo *S. mansoni* em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA. É possível notar uma correlação dos parâmetros hematológicos, como hemácia, hemoglobina e hematócrito no grupo de indivíduos infectados (FIGURA 18a). Foi possível observar também, uma correlação das citocinas em cultura de PBMC sem estímulo, no grupo de infectados pelo *S. mansoni*. Essa análise foi capaz de explicar 25,5% da variabilidade.

Figura 18 - Caracterização dos grupos de infectados e não infectados pelo *S. mansoni* em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O tamanho dos vetores (setas) indica a força das variáveis. Para a avaliação das variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC não estimuladas SE (a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-SWAP) e nutricionais (vit. A e vit. D) foram incluídas. As porcentagens das dimensões 1 e 2, referem-se à capacidade de explicação da variabilidade dos parâmetros (FIGURA 18).

Na cultura estimulada com PHA, foi possível observar que as citocinas estão mais correlacionadas com o grupo infectado. Além disso, o grupo infectado pelo *S. mansoni* apresentou maior correlação com as variáveis: hemácias, hemoglobinas, hematócrito, ferritina e vitamina A. É interessante ressaltar que as variáveis hemácia, hemoglobina, hematócrito e ferritina foram selecionadas para caracterizar um perfil anêmico nos grupos estudados e por meio do teste qui-quadrado, verificou-se um perfil anêmico nesse grupo (TABELA 4). A análise dos componentes foi capaz de explicar 29,1% da variabilidade (FIGURA 18b).

Quando as culturas de PMBC foram estimuladas com o *M. leprae*, foi possível observar uma melhor separação entre os grupos e as citocinas IL-10, IL-2, TNF- $\alpha$  e IL-17 demonstraram uma forte correlação com o grupo infectado pelo *S. mansoni*. As variáveis vinculadas à anemia continuaram apresentando correlação com o grupo infectado, assim como a vitamina A. A análise dos componentes foi capaz de explicar 24,7% da variabilidade, figura 18c.

#### 7.4 TÓPICO IV ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS ASSOCIADAS À CO-INFECÇÃO (HANSENÍASE + ESQUISTOSSOMOSE)

Com a finalidade de melhor caracterizar o grupo co-infectado, foram realizadas as análises teste qui-quadrado, PCA, *T Student* e regressão logística comparando o grupo co-infectado com os grupos controle negativo, contato e mono-infectado. Dos 79 casos de hanseníase, 44 indivíduos apresentavam co-infecção, ou seja, tinham hanseníase e apresentavam perfil de infecção por *S. mansoni*. Como mencionado no tópico III, foram considerados indivíduos com perfil de infecção para esquistossomose aqueles com histórico de infecção relatado em prontuário médico, sorologia positiva para IgG4 anti-SWAP, presença de ovos de *S. mansoni* nas fezes pelos métodos KK ou HPJ. O grupo controle negativo foi composto por 81 indivíduos que não apresentavam hanseníase, porém podendo apresentar infecção por *S. mansoni*. O grupo de contatos foi constituído por 97 indivíduos que conviviam ou que apresentavam contato próximo com algum paciente com hanseníase. Já o grupo mono-

infectado, foi composto por 35 indivíduos que não tinham perfil de infecção por *S. mansoni* e tinham o diagnóstico de hanseníase.

Os resultados a seguir serão apresentados conforme os dados foram analisados. Primeiro iremos apresentar o teste qui-quadrado, seguido da PCA, teste *T Student*, e por último a regressão logística, sempre comparando o grupo de co-infectados com o grupo controle negativo, seguido dos contatos e por último os mono-infectados.

#### **7.4.1 Teste qui-quadrado análise das características do grupo co-infectado versus controle negativo.**

Verificou-se que 75% (33) do grupo co-infectado e 51% (41) do grupo controle negativo eram do sexo masculino ( $p=0,008$ ; OR= 2,927; CI: 95%; 1,303 - 6,576). Em relação à verminose no passado, 51% (22) do grupo co-infectado e 77% (61) do grupo controle negativo responderam positivamente ( $p=0,003$ ; OR= 3,235; CI: 95%; 1,459 - 7,172). Do grupo co-infectado, 45% (13) dos indivíduos relataram que alguém na família teve hanseníase, entretanto, 92% (66) dos indivíduos do grupo controle negativo relataram que não havia casos na família ( $p=0,000$ ; OR= 0,112; CI: 95%; 0,037 - 0,340). Sobre morar com alguém que tem hanseníase, 33% (14) dos indivíduos do grupo co-infectado responderam positivamente ( $p=0,000$ ; OR= 0,110; CI: 95%; 0,034 - 0,364). A respeito do tratamento de água, 68% (30) dos indivíduos do grupo co-infectado e 46% (36) dos indivíduos do grupo controle negativo, relataram não tratar a água antes do consumo ( $p=0,016$ ; OR= 2,560; CI: 95%; 1,181 - 5,548). O grau básico de escolaridade foi relatado por 75% (33) dos indivíduos do grupo co-infectado e 59% (47) do grupo controle negativo ( $p=0,031$ ; OR= 0,178; CI: 95%; 0,021 - 1,492).

Além disso, ao avaliarmos os parâmetros laboratoriais, foi possível observar que a contagem de linfócitos ( $p=0,032$ ; OR= 2,326; CI: 95%; 1,066 - 5,078) em 71% (31) e a contagem de hemácia em 21% (9) dos indivíduos do grupo co-infectado, apresentou valores abaixo dos considerados normais ( $p=0,032$ ; OR= 3,214; CI: 95%; 1,066 - 9,735), tabela 7.

Tabela 7 - Análise das características do grupo co-infectado versus controle negativo por meio do teste qui-quadrado

Sócio-demográfico		Co-Infectados		Controle Negativo		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds	Sup. Odds
		n	%	n	%				
Sexo	Masculino	33	75%	41	51%	<b>0,008</b>	1,000	1,303	6,576
	Feminino	11	25%	40	49%		2,927		
	Total	44	100%	81	100%				
Idade	Até 24 anos	12	27%	19	24%	0,394	1,000	0,588	16,968
	De 25 a 34 anos	2	5%	10	12%		3,158		
	De 35 a 44 anos	5	11%	11	14%		1,389		
	De 45 a 54 anos	6	14%	18	22%		1,895		
	De 55 a 64 anos	8	18%	11	14%		0,868		
	Acima de 65 anos	11	25%	12	15%		0,689		
	Total	44	100%	81	100%				
Município	Governador Valadares	22	50%	38	47%	0,741	1,000	0,543	2,359
	Limeira de Mantena	22	50%	43	53%		1,132		
	Total	44	100%	81	100%				
Zona	Rural	21	51%	35	44%	0,435	1,000	0,634	2,872
	Urbana	20	49%	45	56%		1,350		
	Total	41	100%	80	100%				
Há quanto tempo mora no município?	Menos de 1 ano	1	3%	0	0%	0,211	1,000	Inf	Inf
	De 1 a 5 anos	3	8%	3	4%		Inf		
	Mais de 5 anos	33	89%	75	96%		Inf		
	Total	37	100%	78	100%				
Escolaridade	Superior	1	2%	8	10%	<b>0,031</b>	1,000	0,067	8,363
	Médio	3	7%	18	23%		0,750		
	Fundamental	33	75%	47	59%		0,178		
	Nunca Estudou	7	16%	7	9%		0,125		
	Total	44	100%	80	100%				
Estado Civil	Solteiro	12	27%	24	30%	0,785	1,000	0,421	2,279
	Casado	25	57%	49	61%		0,980		
	Divorciado	3	7%	4	5%		0,667		
	Viúvo	4	9%	4	5%		0,500		
	Total	44	100%	81	100%				
Renda Familiar	Menos 1 sm	16	37%	25	31%	0,716	1,000	0,613	3,033
	Entre 1 a 3 sm	23	54%	49	61%		1,363		
	Entre 3 a 5 sm	3	7%	3	4%		0,640		
	Mais 5 sm	1	2%	3	4%		1,920		
	Total	43	100%	80	100%				
Cor da Pele	Branca	4	11%	17	21%	0,276	1,000	0,085	1,353
	Preta	9	25%	13	16%		0,340		
	Amarela	0	0%	1	1%		Inf		
	Parda	22	61%	50	62%		0,535		
	Indígena	1	3%	0	0%		0,000		
	Total	36	100%	81	100%				
Fonte de Água	Encanada	32	74%	59	73%	0,778	1,000	0,033	8,964
	Córrego	1	2%	1	1%		0,542		
	Poço	9	21%	16	20%		0,964		
	Outros	1	2%	5	6%		2,712		
	Total	43	100%	81	100%				

Sistema de Esgoto	Encanada	32	74%	55	68%		1,000		
	Sem encanamento	0	0%	4	5%		Inf		Inf
	Não há esgoto	0	0%	2	3%	0,339	Inf		Inf
	Fossa	11	26%	20	25%		1,058	0,450	2,488
	Total	43	100%	81	100%				
Histórico de Schisto	Não	31	80%	63	91%		1,000		
	Sim	8	21%	6	9%	0,079	0,369	0,118	1,157
	Total	39	100%	69	100%				
Realiza tratamento (filtra) de água?	Não	30	68%	36	46%		1,000		
	Sim	14	32%	43	54%	<b>0,016</b>	2,560	1,181	5,548
	Total	44	100%	79	100%				
Verminose no passado	Não	21	49%	18	23%		1,000		
	Sim	22	51%	61	77%	<b>0,003</b>	3,235	1,459	7,172
	Total	43	100%	79	100%				
Alguém na família teve Hanseníase?	Não	16	55%	66	92%		1,000		
	Sim	13	45%	6	8%	<b>0,000</b>	0,112	0,037	0,340
	Total	29	100%	72	100%				
Alguém que mora com você tem hanseníase?	Não	29	67%	79	100%		1,000		
	Sim	14	33%	0	0%	<b>0,000</b>	0,110	0,034	0,364
	Total	43	100%	79	100%				
Parâmetros laboratoriais		Co-infetados		Controle Negativo		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds Ratio	Sup. Odds Ratio
		n	%	n	%				
Linfócito	Insuficiente	31	71%	41	51%		1,000		
	Suficiente	13	30%	40	49%	0,032	2,326	1,066	5,078
	Total	44	100%	81	100%				
Monócito	Insuficiente	44	100%	80	99%		1,000		
	Suficiente	0	0%	1	1%	0,459	Inf		Inf
	Total	44	100%	81	100%				
Hemácia	Insuficiente	9	21%	6	7%		1,000		
	Suficiente	35	80%	75	93%	<b>0,032</b>	3,214	1,061	9,735
	Total	44	100%	81	100%				
Hemoglobina	Insuficiente	13	30%	13	16%		1,000		
	Suficiente	31	71%	68	84%	0,076	2,194	0,911	5,279
	Total	44	100%	81	100%				
Hematócrito	Insuficiente	11	25%	15	19%		1,000		
	Suficiente	33	75%	66	82%	0,394	1,467	0,606	3,547
	Total	44	100%	81	100%				
Ferretina	Insuficiente	13	30%	30	37%		1,000		
	Suficiente	31	71%	51	63%	0,400	0,713	0,324	1,570
	Total	44	100%	81	100%				
Vitamina A	Insuficiente	14	32%	38	47%		1,000		
	Suficiente	30	68%	43	53%	0,102	0,528	0,245	1,140
	Total	44	100%	81	100%				

Vitamina D	Insuficiente	13	30%	13	16%	0,076	2,194	0,911	5,279
	Suficiente	31	71%	68	84%				
	Total	44	100%	81	100%				
Anemia	Anêmico	24	55%	44	54%	0,981	1,009	0,483	2,109
	Não anêmico	20	46%	37	46%				
	Total	44	100%	81	100%				

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 7.4.1.1 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO GRUPO CO-INFECTADO VERSUS CONTATOS

Verificou-se que 75% (33) do grupo de co-infectados e 40% (39) do grupo de contatos eram do sexo masculino ( $p=0,000$ ; OR=4,462; CI: 95%; 2,017- 9,869). Quando questionado sobre ter verminose no passado 70% (64) dos contatos responderam positivamente ( $p=0,038$ ; OR= 2,182; CI: 95%; 1,036 – 4,595). Dos 97 contatos, 65% (55) moravam com alguém que tinha hanseníase ( $p=0,000$ ; OR= 4,557; CI: 95%; 2,110 – 9,844). Apenas 2% (2) dos contatos apresentavam histórico de infecção por *S. mansoni*. Assim como nas demais análises apresentadas houve maior frequência para grau de escolaridade nível fundamental entre os indivíduos participantes, sendo 75% (33) do grupo de co-infectados e 57% (55) do grupo de contatos ( $p=0,023$ ; OR= 0,278; CI: 95%; 0,032 – 2,410). Sobre o estado civil, verificou-se que 57% (25) dos indivíduos do grupo co-infectado e 48% (46) dos indivíduos do grupo contato eram casados ( $p=0,052$ ; OR= 0,491; CI: 95%; 0,220 – 1,094).

Quando avaliado o perfil de anemia, verificamos que 55% (24) dos indivíduos co-infectados apresentavam um perfil anêmico quando comparado com os contatos ( $p=0,052$ ; OR= 2,033; CI: 95%; 0,987 – 4,187). Ao avaliarmos os parâmetros do hemograma, verificou-se que 71% (31) dos indivíduos do grupo co-infectado e 53% (51) dos indivíduos do grupo contato apresentavam uma contagem de linfócitos abaixo dos valores normais ( $p=0,046$ ; OR= 2,151; CI: 95%; 1,005– 4,601). A contagem de hemácia apresentou abaixo dos valores considerados normais em 21% (9) dos indivíduos do grupo co-infectado ( $p=0,005$ ; OR= 4,731; CI: 95%; 1,483– 15,100). Quanto à concentração de hemoglobina, verificou-se que em 30% (13) dos indivíduos do grupo co-infectado apresentavam valores abaixo dos parâmetros normais ( $p=0,035$ ; OR= 2,486; CI: 95%; 1,052–5,877) (TABELA 8).

Tabela 8 - Análise das características do grupo co-infectado *versus* contato por meio do teste qui-quadrado

		Co-Infectados		Contatos		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds	Sup. Odds
		n	%	n	%				
Sexo	Masculino	33	75%	39	40%	<b>0,000</b>	1,000	2,017	9,869
	Feminino	11	25%	58	60%				
	Total	44	100%	97	100%				
Idade	Até 24 anos	12	27%	39	40%	<b>0,031</b>	1,000	0,328	8,721
	De 25 a 34 anos	2	5%	11	11%				
	De 35 a 44 anos	5	11%	15	16%				
	De 45 a 54 anos	6	14%	15	16%				
	De 55 a 64 anos	8	18%	10	10%				
	Acima de 65 anos	11	25%	7	7%				
Total	44	100%	97	100%					
Município	Governador Valadares	22	50%	56	58%	0,392	1,000	0,358	1,497
	Limeira de Mantena	22	50%	41	42%				
	Total	44	100%	97	100%				
Zona	Rural	21	51%	37	38%	0,155	1,000	0,815	3,557
	Urbana	20	49%	60	62%				
	Total	41	100%	97	100%				
Há quanto tempo mora no município?	Menos de 1 ano	1	3%	2	2%	0,700	1,000	0,039	11,285
	De 1 a 5 anos	3	8%	4	4%				
	Mais de 5 anos	33	89%	84	93%				
	Total	37	100%	90	100%				
Escolaridade	Superior	1	2%	6	6%	<b>0,023</b>	1,000	0,127	16,424
	Médio	3	7%	26	27%				
	Fundamental	33	75%	55	57%				
	Nunca Estudou	7	16%	9	9%				
Total	44	100%	96	100%					
Estado Civil	Solteiro	12	27%	45	47%	<b>0,052</b>	1,000	0,220	1,094
	Casado	25	57%	46	48%				
	Divorciado	3	7%	3	3%				
	Viúvo	4	9%	2	2%				
	Total	44	100%	96	100%				
Renda Familiar	Menos de 1sm	16	37%	25	26%	0,232	1,000	0,784	3,798
	Entre 1 a 3 sm	23	54%	62	65%				
	Entre 3 a 5 sm	3	7%	9	9%				
	Mais 5 sm	1	2%	0	0%				
	Total	43	100%	96	100%				
Cor da Pele	Branca	4	11%	27	30%	0,061	1,000	0,055	0,826
	Preta	9	25%	13	15%				
	Amarela	0	0%	2	2%				
	Parda	22	61%	47	53%				
	Indígena	1	3%	0	0%				
	Total	36	100%	89	100%				
Fonte de Água	Encanada	32	74%	67	69%	0,675	1,000	0,029	7,883
	Córrego	1	2%	1	1%				
	Poço	9	21%	28	29%				
	Outros	1	2%	1	1%				
	Total	43	100%	97	100%				



Sistema de Esgoto	Encanada	32	74%	75	77%		1,000		
	Sem encanamento	0	0%	3	3%		Inf	N	Inf
	Não há esgoto	0	0%	1	1%	0,472	Inf	N	Inf
	Fossa	11	26%	18	19%		0,698	0,296	1,644
	Total	43	100%	97	100%				
Histórico de Schisto	Não	31	80%	84	98%		1,000		
	Sim	8	21%	2	2%	<b>0,001</b>	0,092	0,019	0,458
	Total	39	100%	86	100%				
Realiza tratamento (filtra) de	Não	30	68%	52	55%		1,000		
	Sim	14	32%	43	45%	0,134	1,772	0,835	3,759
	Total	44	100%	95	100%				
Verminose no passado	Não	21	49%	28	30%		1,000		
	Sim	22	51%	64	70%	<b>0,038</b>	2,182	1,036	4,595
	Total	43	100%	92	100%				
Alguém na família teve hanseníase?	Não	16	55%	30	35%		1,000		
	Sim	13	45%	55	65%	0,060	2,256	0,958	5,313
	Total	29	100%	85	100%				
Alguém que mora com você tem hanseníase?	Não	29	67%	30	31%		1,000		
	Sim	14	33%	66	69%	<b>0,000</b>	4,557	2,110	9,844
	Total	43	100%	96	100%				
Parâmetros laboratoriais		Co-infectados		Contatos		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds Ratio	Sup. Odds Ratio
		n	%	n	%				
Linfócito	Insuficiente	31	71%	51	53%		1,000		
	Suficiente	13	30%	46	47%	<b>0,046</b>	2,151	1,005	4,601
	Total	44	100%	97	100%				
Monócito	Insuficiente	44	100%	95	98%		1,000		
	Suficiente	0	0%	2	2%	0,337	Inf	N	Inf
	Total	44	100%	97	100%				
Hemácia	Insuficiente	9	21%	5	5%		1,000		
	Suficiente	35	80%	92	95%	<b>0,005</b>	4,731	1,483	15,100
	Total	44	100%	97	100%				
Hemoglobina	Insuficiente	13	30%	14	14%		1,000		
	Suficiente	31	71%	83	86%	<b>0,035</b>	2,486	1,052	5,877
	Total	44	100%	97	100%				
Hematócrito	Insuficiente	11	25%	15	16%		1,000		
	Suficiente	33	75%	82	85%	0,176	1,822	0,758	4,379
	Total	44	100%	97	100%				
Ferretina	Insuficiente	13	30%	18	19%		1,000		
	Suficiente	31	71%	79	81%	0,144	1,841	0,806	4,202
	Total	44	100%	97	100%				
Vitamina A	Insuficiente		32%	39	40%		1,000		
	Suficiente	30	68%	58	60%	0,341	0,694	0,327	1,474
	Total	44	100%	97	100%				

Vitamina D	Insuficiente	13	30%	17	18%		1,000		
	Suficiente	31	71%	80	83%	0,106	1,973	0,858	4,538
	Total	44	100%	97	100%				
Anemia	Anêmico	24	55%	36	37%		1,000		
	Não anêmico	20	46%	61	63%	<b>0,052</b>	2,033	0,987	4,187
	Total	44	100%	97	100%				

Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

#### 7.4.1.2 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO GRUPO CO-INFECTADO VERSUS MONO-INFECTADO.

Dos 35 indivíduos do grupo mono-infectado, 31% (11) eram do sexo masculino, enquanto, que 69% (24) eram do sexo feminino ( $p=0,000$ ; OR= 6,545; CI: 95%; 2,439 – 17,569). Em relação ao histórico de infecção por *S. mansoni*, 21% (8) dos indivíduos co-infectados responderam positivamente ( $p=0,005$ ; OR= 0,000; CI: 95%; 0,000 – 0,000), como mostra (TABELA 9).

Tabela 9 - Análise das características do grupo co-infectado *versus* mono-infectado por meio do teste qui-quadrado

		Co-Infecção		Mono-Infecção		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds Ratio	Sup. Odds Ratio
		n	%	n	%				
Sexo	Masculino	33	75%	11	31%	<b>0,000</b>	1,000	-	-
	Feminino	11	25%	24	69%		6,545	2,439	17,569
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Idade	Até 24 anos	12	27%	7	20%	0,363	1,000	-	-
	De 25 a 34anos	2	5%	3	9%		2,571	0,342	19,335
	De 35 a 44anos	5	11%	7	20%		2,400	0,547	10,527
	De 45 a 54anos	6	14%	9	26%		2,571	0,640	10,338
	De 55 a 64anos	8	18%	5	14%		1,071	0,250	4,591
	Acima 65 anos	11	25%	4	11%		0,623	0,142	2,727
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Município	Governador Valadares	22	50%	15	43%	0,527	1,000	-	-
	Limeira de Mantena	22	50%	20	57%		1,333	0,546	3,256
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Zona	Rural	21	51%	15	46%	0,622	1,000	-	-
	Urbana	20	49%	18	55%		1,260	0,503	3,158
	Total	41	100%	33	100%		-	-	-
Há quanto tempo mora no município?	Menos 1ano	1	3%	1	4%	0,971	1,000	-	-
	De 1 a 5anos	3	8%	2	7%		0,667	0,025	18,059
	Mais 5anos	33	89%	25	89%		0,758	0,045	12,711
	Total	37	100%	28	100%		-	-	-
Grau de Escolaridade	Superior	1	2%	0	0%	0,178	1,000	-	-
	Médio	3	7%	8	23%		Inf	-	Inf
	Fundamental	33	75%	23	66%		Inf	-	Inf
	Nunca Estudou	7	16%	4	11%		Inf	-	Inf
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Estado Civil	Solteiro	12	27%	9	26%	0,704	1,000	-	-
	Casado	25	57%	19	54%		1,013	0,355	2,896
	Divorciado	3	7%	5	14%		2,222	0,417	11,829
	Viúvo	4	9%	2	6%		0,667	0,099	4,478
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Renda Familiar	Menos 1sm	16	37%	14	40%	0,825	1,000	-	-
	Entre 1 a 3sm	23	54%	19	54%		0,944	0,369	2,417
	Entre 3 a 5sm	3	7%	2	6%		0,762	0,111	5,237
	Mais 5sm	1	2%	0	0%		0,000	0,000	-
	Total	43	100%	35	100%		-	-	-
Cor da Pele	Branca	4	11%	9	29%	0,225	1,000	-	-
	Preta	9	25%	5	16%		0,247	0,050	1,232
	Amarela	0	0%	0	0%		0,000	0,000	0,000
	Parda	22	61%	17	55%		0,343	0,090	1,308
	Indigena	1	3%	0	0%		0,000	0,000	-
	Total	36	100%	31	100%		-	-	-
Fonte de Água	Encanada	32	74%	23	66%	0,560	1,000	-	-
	Corrego	1	2%	0	0%		0,000	0,000	-
	Poço	9	21%	10	29%		1,546	0,542	4,408
	Outros	1	2%	2	6%		2,783	0,238	32,554
	Total	43	100%	35	100%		-	-	-
Sistema de Esgoto	Encanada	32	73%	27	77%	0,643	1,000	-	-
	Sem encanamento	0	0%	0	0%		-	-	-
	Fossa	11	25%	8	23%		0,862	0,303	2,451
	Outros	1	2%	0	0%		0,000	0,000	-
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-

Histórico de Schisto	Não	31	80%	34	100%	<b>0,005</b>	1,000	-	-
	Sim	8	21%	0	0%		0,000	0,000	-
	Total	39	100%	34	100%		-	-	-
Realiza tratamento (filtra) de	Não	30	68%	20	57%	0,312	1,000	-	-
	Sim	14	32%	15	43%		1,607	0,639	4,042
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Verminose no passado	Não	21	49%	13	38%	0,352	1,000	-	-
	Sim	22	51%	21	62%		1,542	0,618	3,847
	Total	43	100%	34	100%		-	-	-
Alguém na família teve Hanseníase?	Não	16	55%	11	58%	0,853	1,000	-	-
	Sim	13	45%	8	42%		0,895	0,278	2,879
	Total	29	100%	19	100%		-	-	-
Alguém que mora com você tem hanseníase?	Não	29	67%	18	56%	0,322	1,000	-	-
	Sim	14	33%	14	44%		1,611	0,626	4,149
	Total	43	100%	32	100%		-	-	-
Parâmetros laboratoriais		Co-Infecção		Mono-Infecção		p-valor	Odds Ratio	Inf. Odds Ratio	Sup. Odds Ratio
		n	%	n	%				
Linfócito	Insuficiente	31	71%	26	74%	0,706	1,000	-	-
	Suficiente	13	30%	9	26%		0,825	0,305	2,237
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Monócito	Insuficiente	44	100%	34	97%	0,259	1,000	-	-
	Suficiente	0	0%	1	3%		Inf	-	Inf
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Hemácia	Insuficiente	9	21%	4	11%	0,282	1,000	-	-
	Suficiente	35	80%	31	89%		1,993	0,558	7,119
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Hemoglobina	Insuficiente	13	30%	8	23%	0,504	1,000	-	-
	Suficiente	31	71%	27	77%		1,415	0,510	3,928
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Hematócrito	Insuficiente	11	25%	6	17%	0,399	1,000	-	-
	Suficiente	33	75%	29	83%		1,611	0,529	4,902
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Ferretina	Insuficiente	13	30%	5	14%	0,108	1,000	-	-
	Suficiente	31	71%	30	86%		2,516	0,799	7,923
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Vitamina A	Insuficiente	14	32%	10	29%	0,755	1,000	-	-
	Suficiente	30	68%	25	71%		1,167	0,442	3,077
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Vitamina D	Insuficiente	13	30%	9	26%	0,706	1,000	-	-
	Suficiente	31	71%	26	74%		1,211	0,447	3,283
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-
Anemia	Anêmico	24	55%	13	37%	0,124	1,000	-	-
	Não anêmico	20	46%	22	63%		2,031	0,820	5,029
	Total	44	100%	35	100%		-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 7.4.2 Teste *T Student*

A análise referente as variáveis citocinas e quimiocinas não foram apresentadas para o *T Student* pois não demonstraram valor de  $p < 0,05$ .

##### 7.4.2.1 *Análise das características do grupo co-infetado versus controle negativo.*

O teste T foi realizado para avaliar os parâmetros hematológicos e sorológicos. Verificou-se maior reatividade de IgG4 anti-SWAP ( $p=0,009$ ), bem como, maior contagem de monócitos ( $p=0,026$ ) e eosinófilo ( $p=0,012$ ) no grupo co-infetado. Entretanto, para o grupo controle negativo, observou-se maior valor percentual de hematócrito ( $p=0,021$ ) (TABELA 10).

Tabela 10 - Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais nos grupos co-infetados e controle negativo

Parâmetros laboratoriais	Co-Infetados		Controle Negativo		<i>p</i> -valor
	Média	DP	Média	DP	
IgG4 Anti-SWAP	0,315	0,05	0,171	0,03	<b>0,009</b>
BASÓFILO	0,312	0,06	0,352	0,04	0,583
EOSINÓFILO	1,356	0,10	1,047	0,07	<b>0,012</b>
LINFÓCITO	3,386	0,06	3,321	0,04	0,348
MONÓCITO	1,892	0,06	1,722	0,05	<b>0,026</b>
HEMÁCIA	1,702	0,01	1,731	0,01	0,062
HEMOGLOBINA	2,668	0,02	2,686	0,02	0,437
HEMATÓCRITO	3,743	0,02	3,787	0,01	<b>0,021</b>
FERRITINA	4,828	0,14	4,742	0,10	0,622
VITAMINA A	0,444	0,02	0,421	0,02	0,307
VITAMINA D	3,397	0,06	3,494	0,03	0,182

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

##### 7.4.1.3 *ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO GRUPO CO-INFETADO VERSUS CONTATO*

Avaliando a produção de IgG4 anti-SWAP, observou-se uma maior reatividade desse anticorpo no grupo co-infetado ( $p=0,002$ ), assim como uma maior contagem de monócitos ( $p=0,001$ ) e concentração de ferritina ( $p=0,006$ ), como mostra a tabela 11.

Tabela 11 - Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais nos grupos co-infectado e contato

Parâmetros laboratoriais	Co-Infectados		Contato		p-valor
	Média	DP	Média	DP	
IgG4 Anti-SWAP	0,315	0,05	0,152	0,02	<b>0,002</b>
BASÓFILO	0,312	0,06	0,284	0,03	0,682
EOSINÓFILO	1,356	0,10	1,174	0,07	0,134
LINFÓCITO	3,386	0,06	3,39	0,03	0,953
MONÓCITO	1,892	0,06	1,65	0,04	<b>0,001</b>
HEMÁCIA	1,702	0,01	1,716	0,01	0,356
HEMOGLOBINA	2,668	0,02	2,679	0,01	0,559
HEMATÓCRITO	3,743	0,02	3,756	0,01	0,483
FERRITINA	4,828	0,14	4,351	0,09	<b>0,006</b>
VITAMINA A	0,444	0,02	0,414	0,02	0,203
VITAMINA D	3,397	0,06	3,437	0,03	0,579

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

#### 7.4.1.4 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO GRUPO CO-INFECTADO VERSUS MONO-INFECTADO

Verificou-se maior contagem de monócito ( $p=0,042$ ), bem como, maior reatividade do anticorpo IgG4 anti-SWAP ( $p=0,000$ ), concentração de ferritina ( $p=0,018$ ) e de vitamina A ( $p=0,036$ ) no grupo de indivíduos co-infectados, como mostra a tabela 12.

Tabela 12 - Avaliação dos parâmetros imunológicos, hematológicos e nutricionais nos grupos co-infectado e mono-infectado

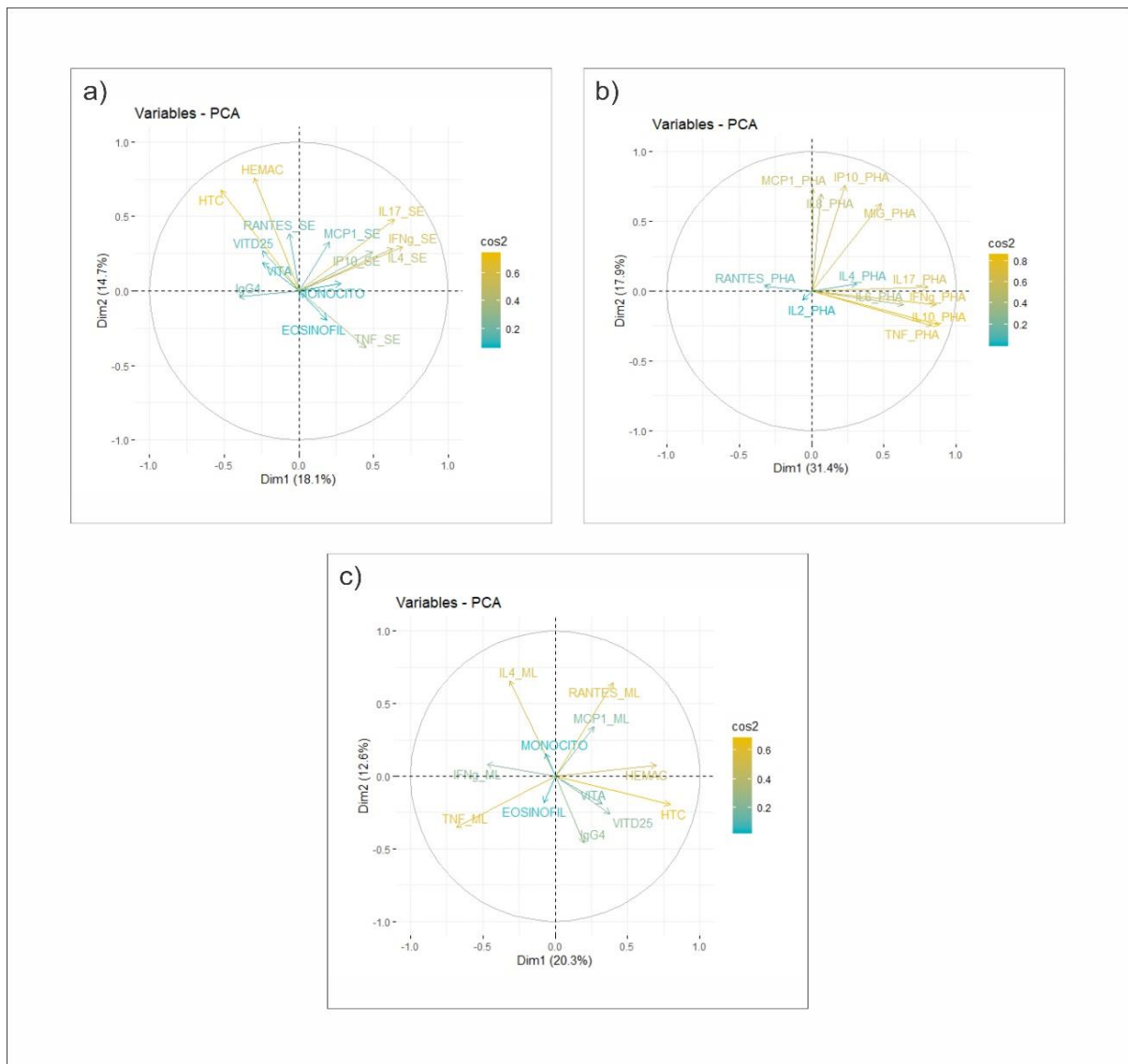
Parâmetros laboratoriais	Co-Infecção		Mono-Infecção		p-valor
	Média	DP	Média	DP	
IgG4 Anti-SWAP	0,315	0,05	0,033	0,00	<b>0,000</b>
BASÓFILO	0,312	0,06	0,342	0,06	0,731
EOSINÓFILO	1,356	0,10	1,103	0,10	0,082
LINFÓCITO	3,386	0,06	3,447	0,06	0,469
MONÓCITO	1,892	0,06	1,686	0,08	<b>0,042</b>
HEMÁCIA	1,702	0,01	1,69	0,01	0,526
HEMOGLOBINA	2,668	0,02	2,654	0,01	0,495
HEMATÓCRITO	3,743	0,02	3,739	0,02	0,848
FERRITINA	4,828	0,14	4,269	0,18	<b>0,018</b>
VITAMINA A	0,444	0,02	0,391	0,02	<b>0,036</b>
VITAMINA D	3,397	0,06	3,32	0,06	0,399

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

### 7.4.2 Análise de PCA análise das características do grupo co-infectado versus controle negativo.

A análise de PCA também foi realizada para os grupos avaliados. Abaixo segue o painel com a disposição dos vetores considerando todos os estímulos (SE, PHA e *M. leprae*) estudados para o perfil imunológico (FIGURA 19). Nesse momento optou-se por evidenciar as variáveis cujos vetores apresentaram maior força durante a análise.

Figura 19 - Disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, comparando grupos de co-infectados e controle negativo por meio da análise de PCA



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

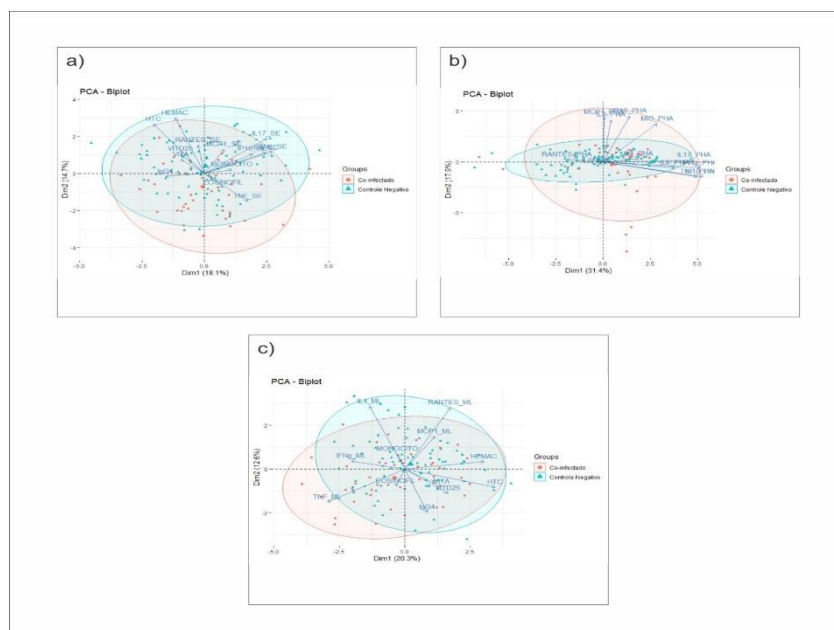
O tamanho dos vetores (setas) indica a força das variáveis. Para a avaliação das variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC não estimuladas SE (a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-SWAP) e nutricionais (vit. A, ferritina e vit. D) foram incluídas (FIGURA 19).

Na figura 20a, nota-se maior força dos vetores referentes às variáveis hemácia, hematócrito, IL-17 e IFN- $\gamma$  na cultura de PBMC sem estímulo para o grupo de indivíduos controle negativo, o que proporcionou o deslocamento da circunferência relativa ao grupo de indivíduos co-infectados. Essa análise foi capaz de explicar 32,8% da variabilidade.

Na cultura estimulada com PHA (FIGURA 20b), verificou-se que os vetores que apresentaram maior força foram representativos das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-17 e IFN- $\gamma$  e quimiocina MIG, no grupo de indivíduos co-infectados. O grupo controle negativo apresentou uma menor produção e, por isso, verifica-se que a maioria dos indivíduos desse grupo encontram-se no centro do gráfico. Essa análise foi capaz de explicar 49,3% da variabilidade.

Por último na figura 20c, as variáveis cujos vetores apresentaram maior força foram a citocina IL-4 e quimiocina RANTES na cultura estimulada com *M. leprae* para os indivíduos do grupo controle negativo. O somatório das dimensões 1 e 2 foi capaz de explicar 32,9 % da variabilidade.

Figura 20 - Caracterização do grupo co-infectado e controle negativo em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).



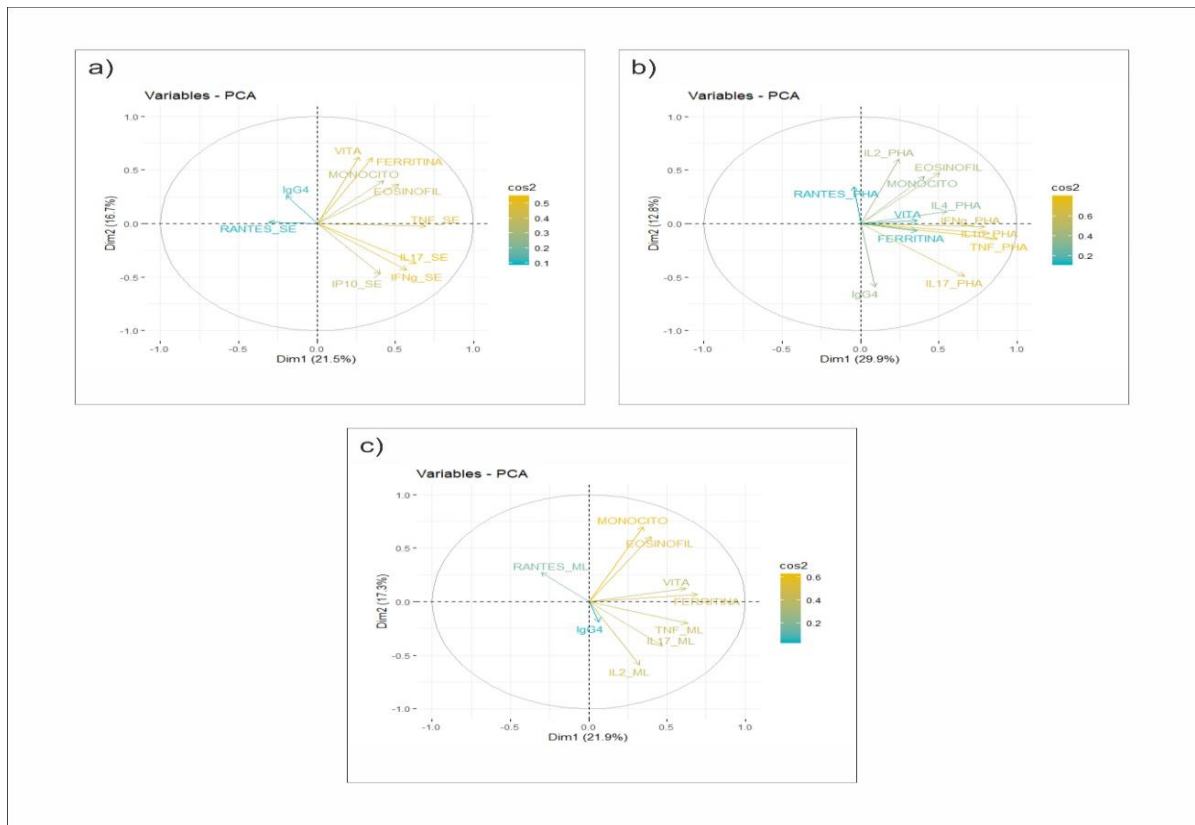
O tamanho dos vetores (setas) indica a força das variáveis. Para a avaliação das variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC não estimuladas SE (a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-SWAP) e nutricionais (vit. A, ferritina e vit. D) foram incluídas. As porcentagens das dimensões 1 e 2, referem-se à capacidade de explicação da variabilidade dos parâmetros (FIGURA 20).

#### 7.4.2.1 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO GRUPO CO-INFECTADO VERSUS CONTATO

A análise de PCA também foi realizada para comparar os grupos co-infectado e contato. Abaixo, segue a disposição dos vetores que apresentaram maior força representantes das variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, considerando a cultura sem estímulo, estimulada com PHA e *M. leprae* (FIGURA 21).

Figura 21 - Disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, comparando grupo co-infectado e contato por meio da análise de

#### PCA



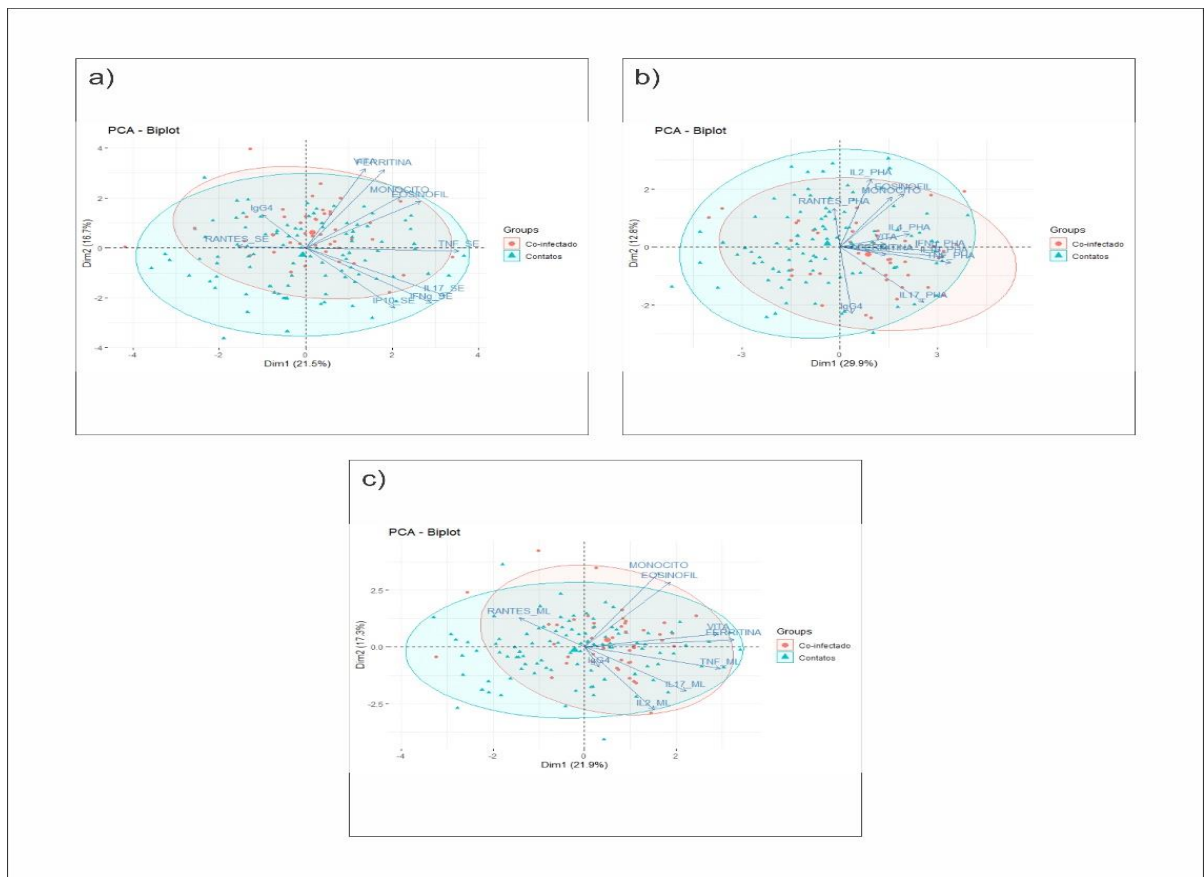
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O tamanho dos vetores (setas) indica a força das variáveis. Para a avaliação das variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC não estimuladas SE (a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-SWAP) e nutricionais (vit. A, ferritina e vit. D) foram incluídas (FIGURA 21).

Na figura 22a, foi possível observar que os vetores relacionados às citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e a quimiocina IP-10 apresentaram maior força e maior correlação com o grupo de contatos. Ao analisarmos a vitamina A, observou-se que esse micronutriente demonstrou uma força semelhante para os dois grupos. Essa análise foi capaz de explicar 38,2 % da variabilidade.

Porém quando aplicado o estímulo PHA na cultura de PBMC, a citocina IL-2 destacou-se no grupo contato. Essa análise foi capaz de explicar 42,7% da variabilidade (FIGURA 22b). Para cultura de PBMC estimulada com *M. leprae*, a citocina TNF- $\alpha$  foi correlacionada com o grupo de contatos. Essa análise foi capaz de explicar 39,2% da variabilidade (FIGURA 22c).

Figura 22 - Caracterização do grupo co-infetado e contato em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA



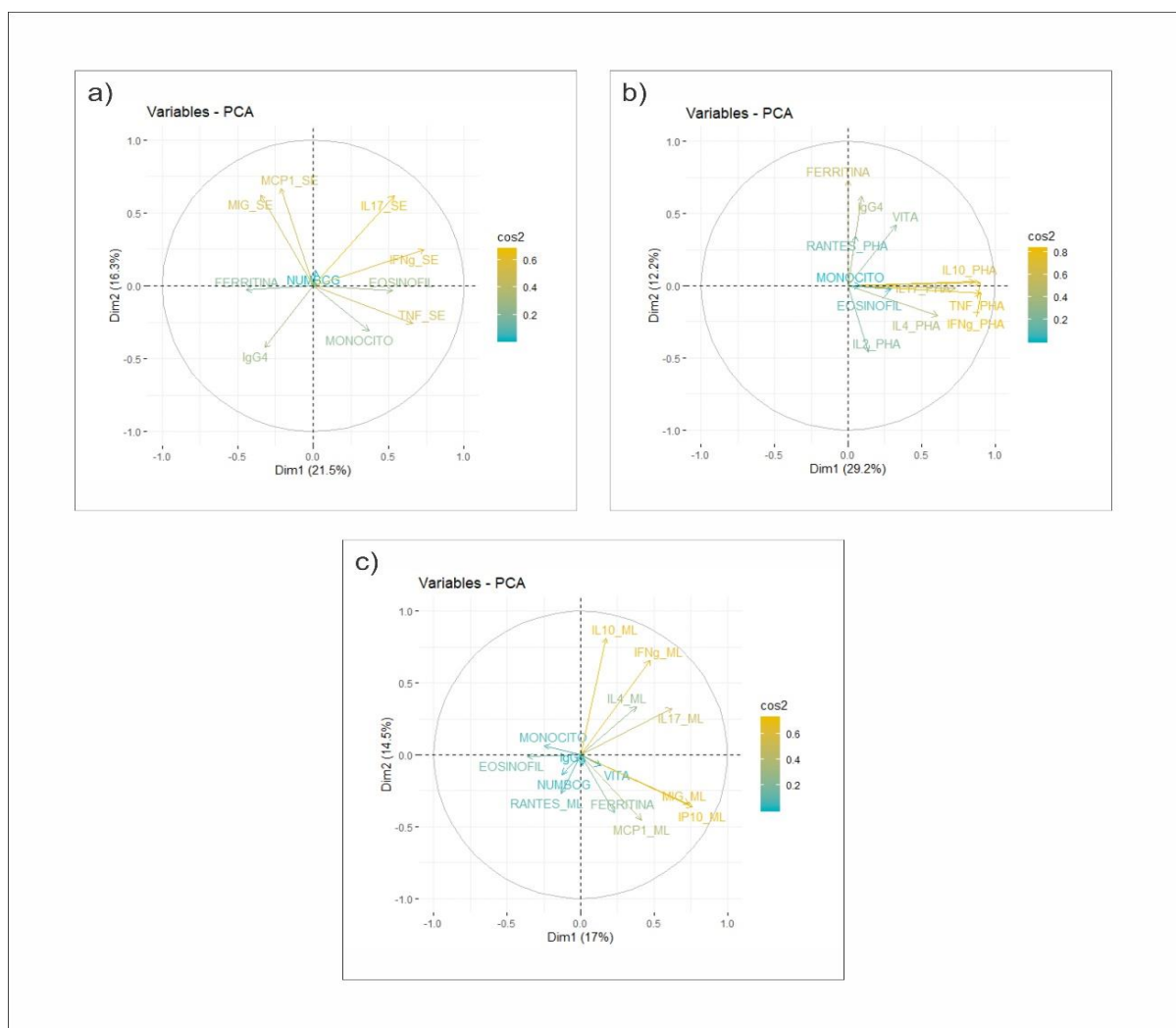
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O tamanho dos vetores (setas) indica a força das variáveis. Para a avaliação das variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC não estimuladas SE (a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-SWAP) e nutricionais (vit. A, ferritina e vit. D) foram incluídas. As porcentagens das dimensões 1 e 2, referem-se à capacidade de explicação da variabilidade dos parâmetros (FIGURA 22).

#### 7.4.2.2 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO GRUPO CO-INFECTADO VERSUS MONO-INFECTADO

A figura 23 apresenta a disposição dos vetores que representam as variáveis que demonstraram maior força nessa análise.

Figura 23 - Disposição dos vetores correspondentes às variáveis imunológicas, hematológicas, sorológicas e nutricionais, comparando grupo co-infectado e mono-infectado por meio da análise de PCA



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

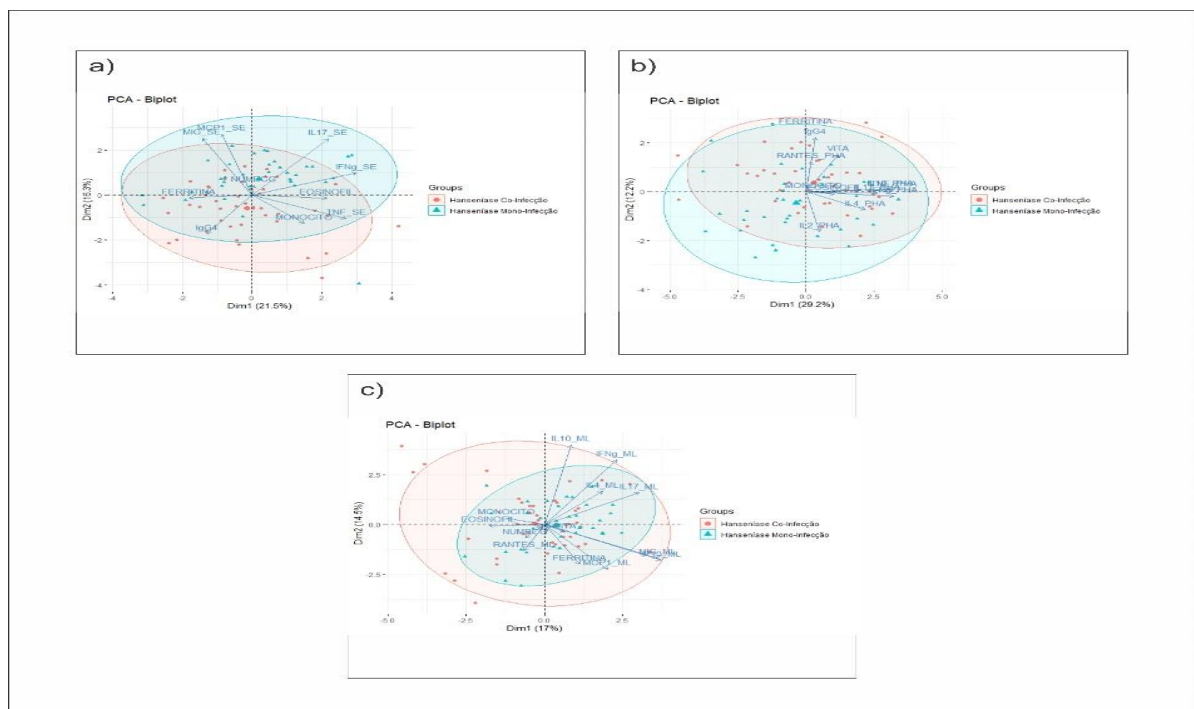
O tamanho dos vetores (setas) indica a força das variáveis. Para a avaliação das variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC não estimuladas SE (a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-SWAP) e nutricionais (vit. A, ferritina e vit. D) foram incluídas (FIGURA 23).

Na figura 24a, pode-se observar que os vetores associados às citocinas IL-17 e IFN- $\gamma$  e quimiocinas MCP-1 e MIG na cultura de PMBC sem estímulo apresentaram maior força e estavam correlacionados com os indivíduos do grupo mono-infectado. Essa análise foi capaz de explicar 37,8% da variabilidade.

Para a figura 24b, verificou-se que os vetores referentes às citocinas IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  e às quimiocinas IP-10, MIG e MCP-1, destacaram-se relação às demais variáveis demonstrando uma correlação com o grupo co-infectado. Essa análise foi capaz de explicar 41,4% da variabilidade.

Para a última figura 24c, verificou-se que os vetores relacionados às citocinas IL-10 e IFN- $\gamma$  e às quimiocinas MIG, MCP-1 e IP-10 da cultura de PBMC estimulada com *M. leprae*, estavam correlacionados com o grupo co-infectado. Essa análise foi capaz de explicar 31,5% da variabilidade.

Figura 24 - Caracterização dos grupos de co-infectados e mono-infectados em relação às variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais por meio da análise de PCA



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O tamanho dos vetores (setas) indica a força das variáveis. Para a avaliação das variáveis imunológicas (citocinas e quimiocinas) foram consideradas as culturas de PBMC não estimuladas SE (a), estimuladas por PHA (b) e ML (c). Variáveis hematológicas (HEMAC, HGB e HTC), sorológica (IgG4 anti-SWAP) e nutricionais (vit. A, ferritina e vit. D) foram incluídas. As porcentagens das dimensões 1 e 2, referem-se à capacidade de explicação da variabilidade dos parâmetros (FIGURA 24).

#### 7.4.3 Regressão logística análise das características do grupo co-infectado versus controle negativo.

A regressão logística foi realizada com a finalidade de prever se as variáveis imunológicas, sorológicas, hematológicas e nutricionais podem auxiliar na caracterização do grupo de co-infectados em relação aos indivíduos do grupo controle negativo. Como as variáveis imunológicas foram obtidas a partir da cultura de PBMC sem estímulo, estimulada com PHA e com *M. leprae*, foi realizada a regressão logística considerando cada estímulo. Dessa forma, serão apresentadas a seguir três tabelas.

A tabela 13 apresenta a análise do grupo co-infectado *versus* controle negativo considerando as citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC sem estímulo. Algumas variáveis apresentaram diferenças, sendo assim, foi possível observar que ser do sexo masculino ( $p=0,009$ ), apresentar maior reatividade de IgG4 anti-SWAP ( $p=0,008$ ), com porcentagem dos valores de hematócrito mais baixo ( $p=0,000$ ) e deficiência de vitamina D ( $p=0,041$ ) indicam maiores chances de ser do grupo co-infectado.

Tabela 13 - Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e controle negativo.

	<b>Estimate</b>	<b>Std. Error</b>	<b><i>p</i>-valor</b>	<b>Odds Ratio</b>
(Intercept)	-38,521	11,025	<b>0,000</b>	0,000
Feminino	1,389	0,533	<b>0,009</b>	4,011
IgG4 Anti-SWAP	-2,462	0,935	<b>0,008</b>	0,085
Hematócrito	10,439	2,932	<b>0,000</b>	3,417
Vitamina D - Suficiente	1,227	0,601	<b>0,041</b>	3,409

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foram considerados os parâmetros sócio-demográficos, imunológicos (citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC SE), hematológicos, sorológicos e nutricionais. Estão sendo apresentadas apenas as variáveis com o valor de  $p < 0,05$  (TABELA 13).

No momento em que consideramos a produção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de cultura de PBMC estimulada com PHA, verificamos que as citocinas com valores de média a alta produção de IL-17 ( $p=0,018$ ) e TNF- $\alpha$  ( $p=0,019$ ), estão menos associadas com a co-infecção. Em contrapartida indivíduos que apresentaram alta produção de IFN- $\gamma$  ( $p=0,033$ ) possuem maior chance de pertencer ao grupo controle negativo. A IL-8 ( $p=0,014$ ), por sua vez, indicou baixa associação com a co-infecção em indivíduos que apresentaram produção média dessa quimiocina.

Embora a vitamina A, tenha dado um valor de  $p$  significativo ( $p=0,030$ ), os dados não mostraram uma influência importante dessa vitamina como fator de risco para a co-infecção. Entretanto, a análise da vitamina D ( $p=0,012$ ), demonstrou que indivíduos que apresentaram deficiência possuem 6,241 vezes mais chances de serem do grupo co-infectado.

Assim como apresentado na tabela 13, os indivíduos do sexo masculino ( $p=0,001$ ), apresentaram maiores chances de pertencer ao grupo de indivíduos co-infectados.

Além disso, indivíduos que apresentaram maior reatividade de IgG4 anti-SWAP ( $p=0,036$ ) possuem maior chance de estarem co-infectados. Quanto à porcentagem dos valores de hematócrito ( $p=0,006$ ), observou-se que os indivíduos com valores mais baixos apresentaram 3,836 vezes mais chances de estarem co-infectados (TABELA 14).

Tabela 14 - Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e controle negativo

	<b>Estimate</b>	<b>Std. Error</b>	<b><i>p</i>-valor</b>	<b>Odds Ratio</b>
(Intercept)	-30,634	11,257	<b>0,007</b>	0,000
Feminino	2,181	0,649	<b>0,001</b>	8,859
IgG4 Anti-SWAP	-2,269	1,080	<b>0,036</b>	0,103
Hematócrito	8,252	3,007	<b>0,006</b>	3,836
Vitamina A - Suficiente	-1,479	0,680	<b>0,030</b>	0,228
Vitamina D - Suficiente	1,831	0,732	<b>0,012</b>	6,241
IL-17(PHA) - medium	-2,173	0,919	<b>0,018</b>	0,114
IFN- $\gamma$ (PHA) - high	2,540	1,191	<b>0,033</b>	12,681
TNF- $\alpha$ (PHA) - high	-2,357	1,004	<b>0,019</b>	0,095
IL-8(PHA) - medium	1,698	0,691	<b>0,014</b>	5,465

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foram considerados os parâmetros sócio-demográficos, imunológicos (citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC estimulada com PHA), hematológicos, sorológicos e nutricionais. Estão sendo apresentadas apenas as variáveis com o valor de  $p < 0,05$  (TABELA 14).

Por último verificamos que indivíduos que apresentaram baixa produção das citocinas TNF- $\alpha$  ( $p=0,001$ ) e IL-6 ( $p= 0,025$ ) possuem maior chance de estarem co-infectados. Por outro lado, os indivíduos que apresentaram maior produção de IFN- $\gamma$  ( $p=0,005$ ) possuem 21,279 vezes mais chances de pertencerem ao grupo controle negativo. Em contrapartida, aqueles que apresentaram média produção de IL-10 possuem maior chance de ser co-infectado ( $p=0,006$ ). Para a vitamina A ( $p=0,047$ ), observou-se um comportamento semelhante ao observado na tabela anterior, reforçando a baixa influencia dessa vitamina como fator de risco na co-infecção.

A análise reforça que em relação ao hematócrito ( $p=0,000$ ), os indivíduos com valores mais baixos apresentaram 4,186 vezes mais chances de estarem co-infectados, bem como, os indivíduos do sexo masculino ( $p= 0,000$ ), como mostra a tabela 15.

Tabela 15 - Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e controle negativo

	Estimate	Std. Error	<i>p</i> - valor	Odds Ratio
(Intercept)	-49,607	13,915	<b>0,000</b>	0,000
Feminino	2,718	0,733	<b>0,000</b>	15,152
Hematócrito	12,945	3,650	<b>0,000</b>	4,186
Vitamina A - Suficiente	-1,259	0,635	<b>0,047</b>	0,284
IFN- $\gamma$ (ML) - high	3,058	1,094	<b>0,005</b>	21,279
TNF- $\alpha$ (ML) - high	-3,538	1,100	<b>0,001</b>	0,029
IL-10(ML) - medium	-2,458	0,903	<b>0,006</b>	0,086
IL-6(ML) - medium	3,403	0,928	<b>0,000</b>	30,059
IL-6(ML) - high	2,198	0,979	<b>0,025</b>	9,004
IL-8(ML) - high	1,686	0,895	<b>0,059</b>	5,400

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foram considerados os parâmetros sócio-demográficos, imunológicos (citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC estimulada com ML), hematológicos, sorológicos e nutricionais. Estão sendo apresentadas apenas as variáveis com o valor de  $p < 0,05$  (TABELA 15).

### 7.4.3.1 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO GRUPO CO-INFECTADO VERSUS CONTATO

Na tabela 16, observa-se que ser do sexo masculino ( $p=0,030$ ), possuir baixa contagem de hemácia ( $p=0,005$ ), baixa concentração de hemoglobina ( $p=0,010$ ) e ferritina ( $p=0,029$ ) apresentaram maior chance de pertencerem ao grupo co-infectado.

Em relação à citocinas na cultura de PBMC sem estímulo, verificou-se que indivíduos que apresentaram maior produção da IL-17 ( $p=0,004$ ) e média produção da quimiocina IP-10 ( $p=0,032$ ) possuem maiores chances de pertencerem ao grupo de contatos. Diferentemente aqueles que apresentam de média a alta produção da citocina IL-4 ( $p=0,012$ ;  $p=0,015$ ) e quimiocina IL-8 ( $p=0,012$ ) possuem maior chance de pertencerem ao grupo co-infectados.

Tabela 16 - Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e contato

	Estimate	Std. Error	<i>p</i> -valor	Odds Ratio
(Intercept)	-2,652	2,593	0,306	0,071
Feminino	1,555	0,716	<b>0,030</b>	4,736
Hemácia - Suficiente	4,116	1,469	<b>0,005</b>	61,324
Hemoglobina - Suficiente	2,968	1,152	<b>0,010</b>	19,445
Ferritina - Suficiente	2,960	1,355	<b>0,029</b>	19,305
Idade - de 35 a 44 anos	-2,744	1,148	<b>0,017</b>	0,064
Idade - de 45 a 54 anos	-2,422	1,162	<b>0,037</b>	0,089
Idade - de 55 a 64 anos	-2,262	1,054	<b>0,032</b>	0,104
Idade - acima 65 anos	-4,001	1,255	<b>0,001</b>	0,018
Monócito	-2,460	0,913	<b>0,007</b>	0,085
IL-17(SE) - high	4,157	1,448	<b>0,004</b>	63,863
IL-4(SE) - medium	-2,507	1,003	<b>0,012</b>	0,082
IL-4(SE) - high	-2,425	0,998	<b>0,015</b>	0,088
IP-10(SE) - medium	1,819	0,850	<b>0,032</b>	6,168
RANTES(SE) - high	1,996	0,931	<b>0,032</b>	7,362
IL-8(SE) - high	-2,488	0,994	<b>0,012</b>	0,083

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foram considerados os parâmetros sócio-demográficos, imunológicos (citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC SE), hematológicos, sorológicos e nutricionais. Estão sendo apresentadas apenas as variáveis com o valor de  $p < 0,05$  (TABELA 16).

Na tabela 17, foi possível observar que indivíduos com maior produção da citocina TNF- $\alpha$  ( $p=0,017$ ) apresentaram maior chance de serem co-infectados. Enquanto que indivíduos que apresentaram de média a alta produção da citocina IL-2 ( $p=0,053$ ;  $p=0,015$ ) e quimiocina



MIG ( $p=0,036$ ) possuem maiores chances de serem contatos. Nessa análise, confirma-se que os baixos valores dos parâmetros hematológicos e altos valores sorológicos estão associados ao perfil de co-infecção.

Tabela 17 - Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e contato

	<b>Estimate</b>	<b>Std. Error</b>	<b><i>p</i>-valor</b>	<b>Odds Ratio</b>
(Intercept)	-0,618	2,367	0,794	0,539
Anemia - Não Anêmico	-1,958	0,975	<b>0,045</b>	0,141
Linfócito - Suficiente	1,536	0,584	<b>0,008</b>	4,646
Hemácia - Suficiente	2,895	1,061	<b>0,006</b>	18,083
Hemoglobina - Suficiente	2,120	0,820	<b>0,010</b>	8,333
Ferritina - Suficiente	1,851	0,943	<b>0,050</b>	6,363
IgG4 Anti-SWAP	-3,531	1,141	<b>0,002</b>	0,029
Vitamina A	-4,070	1,980	<b>0,040</b>	0,017
TNF(PHA) - high	-1,738	0,730	<b>0,017</b>	0,176
IL-2(PHA) - medium	1,339	0,693	<b>0,053</b>	3,816
IL-2(PHA) - high	1,907	0,781	<b>0,015</b>	6,729
MIG(PHA) - medium	1,431	0,683	<b>0,036</b>	4,182

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foram considerados os parâmetros sócio-demográficos, imunológicos (citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC estimulada com PHA), hematológicos, sorológicos e nutricionais. Estão sendo apresentadas apenas as variáveis com o valor de  $p < 0,05$  (TABELA 17).

Por fim, avaliou-se as citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC estimulada por *M. leprae*, e verificou-se que os indivíduos que apresentaram alta produção da citocina TNF- $\alpha$  ( $p=0,001$ ) possuem maior chance de pertencerem ao grupo co-infectado. Por outro lado, a produção das citocinas IL-6 variando de média a alta ( $p=0,013$ ;  $p=0,026$ ) e IL-2 ( $p=0,019$ ;  $p=0,028$ ), bem como, da quimiocina MIG ( $p=0,036$ ;  $p=0,003$ ) indicaram associação com o grupo de contatos. A IL-8 ( $p=0,004$ ), por sua vez também tem demonstrado associação com o grupo co-infectado.

Em relação à reatividade da IgG4 anti-SWAP, verificou-se que os indivíduos que apresentaram baixa concentração desse anticorpo possuem 99% de chance de pertencer ao grupo contato ( $p=0,010$ ). As variáveis hematológicas permaneceram com o perfil anteriormente descrito, como mostra a tabela 18.

Tabela 18 - Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e contato

	<b>Estimate</b>	<b>Std. Error</b>	<b>p-valor</b>	<b>Odds Ratio</b>
(Intercept)	3,695	3,087	0,231	40,257
Feminino	1,931	0,701	<b>0,006</b>	6,898
Anemia - Não Anêmico	-3,613	1,327	<b>0,006</b>	0,027
Hemácia - Suficiente	4,308	1,403	<b>0,002</b>	74,258
Hemoglobina - Suficiente	3,794	1,289	<b>0,003</b>	44,427
Ferritina - Suficiente	3,498	1,272	<b>0,006</b>	33,061
IgG4 Anti-SWAP	-4,455	1,735	<b>0,010</b>	0,012
Monócito	-3,168	1,151	<b>0,006</b>	0,042
Vitamina A	-6,756	3,046	<b>0,027</b>	0,001
TNF- $\alpha$ (ML) - high	-4,413	1,341	<b>0,001</b>	0,012
IL-6(ML) - medium	2,003	0,899	<b>0,026</b>	7,413
IL-6(ML) - high	3,368	1,349	<b>0,013</b>	29,032
IL-2(ML) - medium	-2,450	1,042	<b>0,019</b>	0,086
IL-2(ML) - high	-2,593	1,181	<b>0,028</b>	0,075
MIG(ML) - medium	1,783	0,849	<b>0,036</b>	5,946
MIG(ML) - high	4,190	1,395	<b>0,003</b>	66,002
IL-8(ML) - high	-3,083	1,065	<b>0,004</b>	0,046

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foram considerados os parâmetros sócio-demográficos, imunológicos (citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC estimulada com ML), hematológicos, sorológicos e nutricionais. Estão sendo apresentadas apenas as variáveis com o valor de  $p < 0,05$  (TABELA 18).

#### 7.4.3.2 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DO GRUPO CO-INFECTADO VERSUS MONO-INFECTADO

O último conjunto de análise da regressão logística foi dedicado a comparação dos grupos de co-infectado versus mono-infectado. Verificou-se que indivíduos do sexo masculino ( $p=0,001$ ) apresentavam 15,264 vezes mais chances de serem co-infectados. Em relação às citocinas, indivíduos mono-infectados apresentaram uma produção variando de média a alta das citocinas IL-17 ( $p=0,004$ ) e IL-6 ( $p=0,025$ ) e quimiocina IL-8 ( $p=0,046$ ) na cultura de PBMC sem estímulo. Por outro lado, os indivíduos co-infectados apresentaram uma maior produção da citocina IL-10 ( $p=0,005$ ;  $p=0,037$ ) (TABELA 19).

Tabela 19 - Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e mono-infectado

	<b>Estimate</b>	<b>Std. Error</b>	<b>p-valor</b>	<b>Odds Ratio</b>
(Intercept)	-3,232	1,280	<b>0,012</b>	0,039
Feminino	2,726	0,784	<b>0,001</b>	15,264
IL-17(SE) - High	3,171	1,113	<b>0,004</b>	23,819
IL-10(SE) - Medium	-3,260	1,150	<b>0,005</b>	0,038
IL-10(SE) - High	-2,272	1,091	<b>0,037</b>	0,103
IL-6(SE) - Medium	2,479	1,109	<b>0,025</b>	11,925
IL-8(SE) - Medium	2,129	1,066	<b>0,046</b>	8,410

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foram considerados os parâmetros sócio-demográficos, imunológicos (citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC SE), hematológicos, sorológicos e nutricionais. Estão sendo apresentadas apenas as variáveis com o valor de  $p < 0,05$  (TABELA 19).

Quando a cultura foi estimulada com PHA, observou-se que a citocina IL-2 ( $p=0,010$ ;  $p=0,030$ ) e as quimiocinas MIG ( $p=0,007$ ;  $p=0,047$ ) e MCP-1 ( $p=0,031$ ) apresentaram uma associação com o grupo de indivíduos mono-infectados quando a produção variou de média a alta. Por outro lado, a produção média a alta da citocina IL-10 demonstrou correlação com o grupo co-infectado ( $p=0,003$ ;  $p=0,001$ ). Valores mais baixos de vitamina A ( $p=0,013$ ), estão correlacionados com os indivíduos do grupo co-infectados, assim como, os valores de hemácia abaixo do normal ( $p=0,016$ ), como mostra a tabela 20.

Tabela 20 - Análise de regressão logística entre os grupos co-infectado e mono-infectado

	<b>Estimate</b>	<b>Std. Error</b>	<b>p-valor</b>	<b>Odds Ratio</b>
(Intercept)	5,214	4,593	0,256	183,897
Feminino	3,268	1,087	<b>0,003</b>	26,260
Hemácia - Suficiente	3,253	1,346	<b>0,016</b>	25,868
Vitamina A	-10,855	4,351	<b>0,013</b>	0,000
Vitamina D	-2,436	1,424	<b>0,087</b>	0,088
IL-10(PHA) - medium	-4,621	1,546	<b>0,003</b>	0,010
IL-10(PHA) - high	-6,477	2,021	<b>0,001</b>	0,002
IL-2(PHA) - medium	3,808	1,485	<b>0,010</b>	45,075
IL-2(PHA) - high	3,067	1,415	<b>0,030</b>	21,487
MCP-1(PHA) - medium	2,766	1,279	<b>0,031</b>	15,890
MIG(PHA) - medium	4,143	1,535	<b>0,007</b>	63,006
MIG(PHA) - high	2,632	1,325	<b>0,047</b>	13,897
IL-8(PHA) - medium	-2,831	1,177	<b>0,016</b>	0,059

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foram considerados os parâmetros sócio-demográficos, imunológicos (citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC estimulada com PHA), hematológicos, sorológicos e nutricionais. Estão sendo apresentadas apenas as variáveis com o valor de  $p < 0,05$  (TABELA 20).

Para a cultura estimulada com *M. leprae*, verificou-se que indivíduos que apresentaram de média a alta produção de IFN- $\gamma$  ( $p=0,004$ ;  $p=0,006$ ) possuem de 304 a 585 vezes mais chances de serem mono-infectados. Valores de *Odds Ratio* mais elevados podem ocorrer quando o modelo matemático realiza um super ajustamento para adequar ao tamanho da amostra.

Uma produção média de IL-6 ( $p=0,018$ ) também está correlacionado com o grupo mono-infectado. Por outro lado, uma produção média e alta de TNF- $\alpha$  ( $p=0,044$ ;  $p=0,011$ ) está associada com o grupo co-infectado. Por sua vez, a média produção de IL-10 ( $p=0,004$ ) e a alta produção de IL-4 ( $p=0,016$ ) também foram associadas ao grupo co-infectado. Em relação as quimiocinas, observou-se que indivíduos que apresentam média produção de IP-10 ( $p=0,013$ ) e alta produção de IL-8 média ( $p=0,053$ ) possuem maior chance de participarem do grupo mono-infectado (TABELA 21).

Tabela 21 - Análise de regressão logística entre o grupo co-infectado e mono-infectado

	<b>Estimate</b>	<b>Std. Error</b>	<b>p-valor</b>	<b>Odds Ratio</b>
(Intercept)	-8,386	2,820	<b>0,003</b>	0,000
Feminino	4,860	1,659	<b>0,003</b>	128,962
IFN- $\gamma$ (ML) - medium	5,719	2,094	<b>0,006</b>	304,583
IFN- $\gamma$ (ML) - high	6,372	2,219	<b>0,004</b>	585,011
TNF- $\alpha$ (ML) - medium	-5,737	2,845	<b>0,044</b>	0,003
TNF- $\alpha$ (ML) - high	-10,379	4,068	<b>0,011</b>	0,000
IL-10(ML) - medium	-8,930	3,142	<b>0,004</b>	0,000
IL-6(ML) - medium	8,151	3,453	<b>0,018</b>	346,660
IL-4(ML) - high	-4,724	1,967	<b>0,016</b>	0,009
IP-10(ML) - medium	5,312	2,139	<b>0,013</b>	202,811
IL-8(ML) - high	2,569	1,326	<b>0,053</b>	13,048

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Foram considerados os parâmetros sócio-demográficos, imunológicos (citocinas e quimiocinas da cultura de PBMC estimulada com *M. leprae*), hematológicos, sorológicos e nutricionais. Estão sendo apresentadas apenas as variáveis com o valor de  $p < 0,05$  (TABELA 21).

## 8 DISCUSSÃO

Embora programas intensivos de controle reduzam a prevalência da hanseníase, casos novos ainda são detectados em diversas áreas pobres do mundo (WHO, 2016). Assim, a hanseníase ainda é conhecida como uma doença associada à pobreza, porém, os mecanismos envolvidos nessa interação permanecem incertos (FEENSTRA *et al.*, 2011).

Para o controle da hanseníase, é fundamental conhecer quais aspectos são importantes na transmissão e no desenvolvimento dos sinais clínicos da doença. Dessa forma, o objetivo central da nossa pesquisa foi investigar a situação sócio-econômica de um grupo de participantes em um estudo caso-controle, e identificar parâmetros imunológicos, parasitológicos e nutricionais, associados à hanseníase. Para atender ao objetivo desse estudo, as variáveis foram utilizadas para comparar o grupo de pacientes recém diagnosticados com hanseníase, que apresentava perfil de infecção pelo *S. mansoni*, com os grupos de contato, controle negativo e mono-infectados residentes no município de Governador Valadares e no distrito de Limeira de Mantena.

Ao avaliarmos a situação sócio-demográfica dos participantes, destacamos o baixo grau de escolaridade. Foi possível observar que 75% (33) dos indivíduos co-infectados apresentavam nível básico de escolaridade e apenas 7,9% (14) do grupo que inicialmente foi denominado como controle (contatos e controle negativo) possuía ensino superior. A associação entre educação e hanseníase também foi avaliada em alguns estudos caso-controle e a maioria desses trabalhos vem apontando para um número maior de casos de hanseníase entre os indivíduos menos escolarizados. (DABRERA *et al.*, 2016; FEENSTRA *et al.*, 2011; KERR-PONTES *et al.*, 2006; MURTO *et al.*, 2013). Desde 1994, Andrade *et al.*, já sugeriam que um nível mais baixo de educação estava associado à maior incidência de hanseníase.

Outro fator importante a ser destacado é o contato com o doente sem tratamento. Vários estudos mostram que morar com o paciente sem tratamento está fortemente associado ao risco de desenvolver a doença (BAKKER *et al.*, 2006; FEENSTRA *et al.*, 2013; KUMAR; GIRDHAR; GIRDHAR, 2007; MURTO *et al.*, 2013). Verificamos que aproximadamente 70% dos indivíduos do grupo contato residiam com o doente. Um estudo realizado por Feenstra *et al.*, 2013, utilizaram uma pontuação para melhor compreender a interação social (na casa, dentro do bairro e fora do bairro) entre contatos e casos. Esses pesquisadores concluíram que os contatos de casa e de bairro compartilhavam riscos semelhantes de desenvolver a hanseníase.

Quando se perguntou aos participantes sobre a utilização de água tratada, verificou-se que 68% dos indivíduos do grupo co-infectado não tinham hábito de tratar a água antes do

consumo. Ainda em 1994, Andrade *et al.*, demonstraram que as famílias que tinham acesso à água tratada apresentavam menor incidência de casos, quando comparado com uma família aleatória. Em relação à esquistossomose, é importante ressaltar que a falta de saneamento básico está fortemente associada à transmissão e a exposição do hospedeiro ao *S. mansoni*, que geralmente resulta da contaminação fecal da água utilizada (TAKEUCHI *et al.*, 2019). Estudos mostram que o acesso à água potável e o saneamento adequado estão associados a uma chance significativamente menor de infecção pelo *S. mansoni* (GRIMES *et al.*, 2015, 2014).

Recentemente, foi demonstrado uma associação entre hanseníase e esquistossomose, no estado de Minas Gerais, por meio de dados referentes à sobreposição geoespacial e temporal (PHILLIPS *et al.*, 2017). Dados de casos novos de infecções por *M. leprae* e *S. mansoni* no período de 2007 a 2014 foram obtidos do sistema de informação de agravos de notificação no Brasil (SINAN) em sete municípios da região de Vespasiano, MG. Um total de 139 casos de hanseníase e 200 casos de esquistossomose foram mapeados em nível municipal. Para um município, os casos foram mapeados a nível de bairro e uma análise estratificada foi realizada para identificar associações espaciais. Os autores verificaram um risco relativo de 6,80 vezes mais chances da ocorrência de hanseníase em bairros com residentes com esquistossomose. As taxas de incidência de hanseníase aumentaram com as taxas de incidência correspondentes de esquistossomose, e as tendências temporais de ambas as infecções foram semelhantes.

Os helmintos são potentes indutores de mecanismos reguladores capazes de reduzir processos inflamatórios e doenças autoimunes (MAIZELS; MCSORLEY, 2016; WEBB *et al.*, 2016). A indução de mecanismos imunomoduladores tem sido usada para explicar dados epidemiológicos que relatam uma associação inversa entre a exposição a infecções por helmintos e doenças inflamatórias crônicas humanas, incluindo hanseníase (MAIZELS; MCSORLEY, 2016; MCSORLEY *et al.*, 2014; OKTARIA *et al.*, 2016). No entanto, uma suposta relação causal entre infecção por helmintos e hanseníase por enquanto é apoiada em evidências de estudos em humanos. Todavia, ainda são controversos e sugerem que aspectos como espécies de helmintos, cronicidade, local da infecção e carga parasitária devem ser levados em consideração (CRUZ *et al.*, 2017; DINIZ *et al.*, 2001; EVANS; MITRE, 2015; SANYA *et al.*, 2017).

Recentemente Resende (2019), realizou um estudo transversal em uma área endêmica para esquistossomose, para avaliar se a baixa carga parasitária poderia afetar a modulação da reatividade alérgica. A análise revelou que a infecção por *S. mansoni* tem um efeito modulador na reatividade da IgE aos alérgenos em indivíduos residentes em áreas com exposição frequente a infecção pelo helminto. No entanto, o efeito modulador foi observado apenas em indivíduos

com carga parasitária acima de 12 ovos por grama de fezes. A modulação da reatividade alérgica também foi acompanhada por alterações na resposta imune sistêmica, incluindo concentrações séricas de IL-33, TNF- $\alpha$  e IL-10. Os autores sugerem que os fatores associados a espécies de helmintos, carga parasitária e frequência de exposição devem ser mais explorados, a fim de entender melhor os mecanismos subjacentes à resposta imunomoduladora derivada de infecções por helmintos, que podem fornecer novas ferramentas para a prevenção de doenças alérgicas.

A transmissão da esquistossomose tem sido historicamente relatada em áreas endêmicas, no município de Governador Valadares e entorno (MAGUETA *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2016), e a principal estratégia de controle consiste no tratamento de indivíduos infectados, o que contribuiu para a redução significativa da intensidade da infecção pelo parasita e, conseqüentemente, a severidade da doença. No entanto, essas medidas de controle foram insuficientes para eliminar a transmissão do *S. mansoni*, resultando em indivíduos infectados com baixa carga parasitária, o que dificulta o diagnóstico de esquistossomose, conforme relatado em muitas áreas endêmicas (COELHO *et al.*, 2016; GRENFELL *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, além dos métodos KK, HPJ e reatividade de IgG4 anti-SWAP, utilizamos o histórico de esquistossomose obtido de prontuários para caracterizar o perfil de infecção por *S. mansoni*. Essa caracterização foi necessária, uma vez que, os participantes do estudo apresentaram uma baixa carga parasitária. Corroborando com os nossos achados, Resende *et al.* (2019) utilizaram métodos parasitológicos tradicionais, sorológicos e moleculares para identificar indivíduos infectados com carga parasitária muito baixa e que não seriam diagnosticados apenas pelo método Kato-Katz.

É interessante notar, que embora os mecanismos moduladores induzidos pela infecção por helmintos capazes de regular a resposta imune não sejam totalmente compreendidos, dados obtidos em pacientes infectados por *S. mansoni* residentes em áreas endêmicas mostraram que a modulação da resposta imunológica foi acompanhada pela indução da produção de citocinas tais como TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-13 no desenvolvimento de granulomas na esquistossomose (ALVES OLIVEIRA *et al.*, 2006; SILVEIRA-LEMOS *et al.*, 2008).

Pesquisas preliminares sugeriram que a co-infecção por helmintos pode aumentar a probabilidade de desenvolvimento da forma mais infecciosa da hanseníase, possivelmente devido à desregulação imune na infecção crônica por helmintos e um aumento da resposta Th2 (DINIZ *et al.*, 2001, 2010). Essa situação pode ser uma causa potencial de transmissão continuada em locais como o Brasil e a Índia, que apresentam taxas relativamente altas de

hanseníase e helmintos em muitas áreas (COUTO *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2014; GREENLAND *et al.*, 2015; KATTULA *et al.*, 2014). Embora neste estudo não detectamos associação entre hanseníase da forma clínica multibacilar e esquistossomose, constatamos que existe uma forte associação entre hanseníase e infecção pelo *S. mansoni*, de acordo com dados do nosso grupo submetidos para publicação (CID ANEXO 04). Verificamos uma associação com um aOD de 3,37 quando comparamos o grupo de casos e controles e ainda mais forte com um aOR de 8,33 comparando casos e contatos. Provavelmente, nossa limitação em constatar associação entre hanseníase na forma multibacilar e esquistossomose se deve ao pequeno número de casos com índice baciloscópico (IB) positivo, no grupo de estudo e ainda combinado com o pequeno número de participantes com esquistossomose na forma ativa, apresentando alta carga parasitária.

Entretanto, os dados de Diniz (2010) e Oktaria (2016), mostraram uma associação entre hanseníase multibacilar e helmintos transmitidos pelo solo. Esses estudos demonstraram que os helmintos podem modular a resposta imune gerando uma fraca resposta mediada por células e, portanto, favorecer a forma mais grave da doença.

As células Th17 surgiram como um terceiro subconjunto de células Th que desempenham um papel importante não apenas nas doenças autoimunes onde foram descritas pela primeira vez, mas também em muitas doenças infecciosas no homem e em modelos experimentais (CURTIS; WAY, 2009; GONZALEZ-LOMBANA *et al.*, 2013; TORRADO; COOPER, 2010). Segundo Saini, 2013, a expressão de isoformas de IL-17 e IFN- $\gamma$  em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase foi menor do que nas PBMC estimuladas por antígeno. Interessante foi a constatação desses autores, de que os contatos domiciliares saudáveis com exposição prolongada a pacientes apresentaram uma maior expressão de IL-17 e IFN- $\gamma$  comparando com os indivíduos doentes, sugerindo um papel importante das citocinas IL-17 e IFN- $\gamma$  como potenciais biomarcadores de infecção precoce pelo *M. leprae*. Notavelmente, verificamos em nosso estudo que aqueles indivíduos que possuíam IL-17 (SE high) apresentaram 63 vezes mais chances de pertencerem ao grupo dos contatos ( $p=0,004$ ). Além disso, aqueles com IFN- $\gamma$  (ML high) apresentaram 21 vezes mais chances de pertencerem ao grupo de controle negativo ( $p=0,005$ ).

Anteriormente, Martins (2012), demonstrou uma redução progressiva dos níveis de IFN- $\gamma$  em resposta aos peptídeos sintéticos específicos do *M. leprae* entre os contatos de pacientes multibacilares quando comparado com indivíduos menos expostos. Esses autores sugerem que uma modulação da produção de IFN- $\gamma$  pode ocorrer devido ao aumento da carga bacilar, durante a infecção ou a uma maior exposição ao *M. leprae*.



Com relação ao painel de citocinas avaliadas nesse trabalho verificamos que a IL-10, citocina imunoreguladora, apresentou associação com o grupo de indivíduos infectados por *S. mansoni*. Demonstramos também por meio da regressão logística uma correlação positiva entre o perfil de citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-2) e o grupo de indivíduos assintomáticos. É interessante notar que quando se comparou o grupo de co-infectado e mono-infectado detectou-se associação dessas citocinas como o grupo de mono-infectado.

Vale ressaltar que vários estudos vêm demonstrando o papel dessas citocinas inflamatórias nas reações hansênicas (CORTELA *et al.*, 2015; NEGERA *et al.*, 2018).

Com relação às quimiocinas, observamos uma associação das quimiocinas IL-8 e IP-10 em sobrenadantes de cultura de PBMC estimulada com *M. leprae*, com o grupo de indivíduos mono-infectados. Anteriormente Saini *et al.*, (2013), relataram que de um modo geral as quimiocinas são mais encontradas em lesões dérmicas de hanseníase do que em culturas de PBMC.

Recentemente Tió-Coma, (2019), em um trabalho de assinaturas de RNA no sangue total de pacientes com hanseníase identificaram e indicaram os genes associados às quimiocinas MCP-1 (CCL-2) e IP-10 (CXCL-10) como biomarcadores para o diagnóstico precoce das reações hansênicas. Segundo Van Hooij *et al.* (2018), a quimiocina IP-10 foi indicada como marcador celular mais significativo para identificar pacientes com hanseníase borderline-lepromatosa e lepro-lepromatosa, bem como, borderline-tuberculóide e tuberculóide em populações de baixa a alta endemicidade.

A vitamina D tem sido associada tanto com a resposta imune inata, como também com a resposta adquirida em humanos (PRIETL *et al.*, 2013). Sabe-se que macrófagos do sistema imunológico inato utilizam mecanismos antimicrobianos dependentes da vitamina D para eliminar os microorganismos intracelulares, sugerindo que concentrações adequadas dessa vitamina podem determinar a eficiência da resposta antimicrobiana à infecção por *M. leprae* (KIM *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstraram que os indivíduos co-infectados apresentaram concentrações inadequadas de vitamina D.

Tem sido relatado que infecções causadas por parasitos, bem como, deficiências de micronutrientes podem coexistir com a hanseníase em muitas áreas endêmicas no Brasil (PESCARINI *et al.*, 2018). Estudos anteriores mostraram associações positivas entre a escassez de alimentos com a ocorrência da hanseníase, e foi sugerido que a resposta imune do hospedeiro pode ser prejudicada contra as micobactérias como resultado da ingestão inadequada dos micronutrientes (KERR-PONTES *et al.*, 2006; WAGENAAR *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, concentrações adequadas de vitamina A foram observadas nos grupos de controle negativo e contato. Uma investigação anterior relatou uma diminuição nas concentrações séricas de vitamina A, predominantemente em pacientes multibacilares (LIMA *et al.*, 2007). Em relação à anemia, existem várias condições subjacentes relacionadas, como deficiências de micronutrientes, doenças infecciosas e condições hereditárias (talassemia) (CHERAYIL, 2010; GANZ; NEMETH, 2015; OPPENHEIMER, 2001). No entanto, diagnosticar anemia por deficiência de ferro em áreas específicas onde prevalecem doenças infecciosas pode ser desafiador, pois os níveis séricos de ferritina podem aumentar devido às respostas imunes ao agente infeccioso, mascarando um diagnóstico de deficiência de ferro (OKTARIA *et al.*, 2018) Foi relatado que uma menor ingestão de carne vermelha e ovos pode influenciar os níveis de hemoglobina e ferro (THOMPSON, 2007). Recentemente, Oktaria (2018) sugeriu que a deficiência de ferro ocasionada por uma ingestão inadequada de nutrientes aumenta a suscetibilidade à hanseníase. Assim, a deficiência de ferro associada a uma dieta pouco diversificada, juntamente com infecção causada por *M. leprae* e *S. mansoni* podem ser a causa da anemia observada em 55% dos indivíduos do grupo co-infectado.

Finalmente, a continuidade dos estudos a respeito da hanseníase associada a esquistossomose e outras parasitoses na forma de co-infecções será necessária para melhor delinear os fatores de risco. A combinação das avaliações sócio-demográficas e clínicas, incluindo estudos imunológicos, nutricionais, sorológicos e hematológicos certamente contribuirá para ampliar o conhecimento sobre a transmissão da hanseníase e buscar indicadores potenciais capazes de impactar verdadeiramente no controle da doença, e alcançar as metas da Organização Mundial de Saúde.

## 9 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que existe uma forte correlação entre deficiência de vitamina D e co-infecção, dessa forma, a introdução de suplementação dessa vitamina pode auxiliar no desenvolvimento de uma resposta imunológica competente para eliminar o *M. leprae*. A presença de IgG4 anti-SWAP, associada aos elementos indicadores de anemia (ferritina, hemácia, hemoglobina e hematócrito) em indivíduos residentes em área endêmica para hanseníase reforçam a importância do acompanhamento, especialmente dos contatos. Com relação ao painel de citocinas concluímos que a IL-10, citocina imunoreguladora, apresentou associação com o grupo de indivíduos infectados por *S. mansoni* bem como com o grupo co-infectado x controle negativo (estímulo ML) e mono infectado (SE, PHA e ML). A IL-4 também apresentou associação com o grupo co-infectado x contato (SE) e mono-infectado (ML). Esses dados reforçam a presença de citocinas imunoreguladoras e relacionadas à resposta Th2 no grupo co-infectado. Ao contrário, demonstramos por meio da regressão logística uma correlação positiva entre o perfil de citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-2) e o grupo de indivíduos assintomáticos. Constatamos uma forte correlação entre hanseníase e infecção pelo *S. mansoni* com um aOR de 3,37 comparando o grupo de casos e controles e ainda mais forte, um aOR de 8,33 comparando casos e contatos. Provavelmente, nossa limitação em constatar associação entre hanseníase na forma multibacilar e esquistossomose se deve ao pequeno número de casos com IB positivo, no grupo de estudo e ainda o pequeno número de participantes com esquistossomose apresentando alta carga parasitária.

Acreditamos que nosso trabalho contribui para a literatura atual, que investiga os possíveis fatores de risco para a transmissão da hanseníase e explica, em parte, algumas das associações relacionadas à co-infecção e à pobreza. Além disso, nossos resultados podem auxiliar os programas de controle integrado das doenças tropicais negligenciadas.

## REFERÊNCIAS

- AARÃO, T. L. DE S. *et al.* Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 77, p. 66–72, dez. 2014.
- ADAMS, J. S.; GACAD, M. A. Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D3 sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 161, n. 4, p. 755–765, 1 apr. 1985.
- ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 80–90, feb. 2008.
- ALAYASH, A. I. *et al.* Haptoglobin: the hemoglobin detoxifier in plasma. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 2–3, jan. 2013.
- ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 375–388, june. 2011.
- ALVES OLIVEIRA, L. F. *et al.* Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1215–1221, feb. 2006.
- ANDRADE, V. L. G. DE; SABROZA, P. C.; ARAÚJO, A. J. G. DE. Fatores associados ao domicílio e à família na determinação da hanseníase, Rio de Janeiro, **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, p. 281–292, july. 1994.
- ANTONELLI, A. *et al.* Monokine induced by interferon gamma (IFN $\gamma$ ) (CXCL9) and IFN $\gamma$  inducible T-cell alpha-chemoattractant (CXCL11) involvement in Graves' disease and ophthalmopathy: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1803–1809, may 2009.
- ARDALAN, M. R. *et al.* Calcitriol started in the donor, expands the population of CD4+CD25+ T cells in renal transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 39, n. 4, p. 951–953, may 2007.
- ARMITAGE, A. E. *et al.* Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. **Blood**, v. 118, n. 15, p. 4129–4139, 13 oct. 2011.
- AZEVEDO, M. DE C. S. *et al.* Simultaneous analysis of multiple T helper subsets in leprosy reveals distinct patterns of Th1, Th2, Th17 and Tregs markers expression in clinical forms and reactional events. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 206, n. 6, p. 429–439, dez. 2017.
- BACCHETTA, J. *et al.* Suppression of Iron-Regulatory Hepcidin by Vitamin D. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 25, n. 3, p. 564–572, mar. 2014.
- BAHMANYAR, E. R. *et al.* Leprosy diagnostic test development as a prerequisite towards elimination: requirements from the user's perspective. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004331, 2016.

- BAKDASH, G. *et al.* Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 2, p. 265, 2015.
- BAKKER, M. I. *et al.* Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. **Leprosy Review**, v. 77, n. 1, p. 48–61, mar. 2006.
- BANERJEE, S. *et al.* Haptoglobin alters oxygenation and oxidation of hemoglobin and decreases propagation of peroxide-induced oxidative reactions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 53, n. 6, p. 1317–1326, 15 sept. 2012.
- BATES, H. M. How to detect iron deficiency before anemia develops. **Lab Pathfinder**, v. 1, p. 17–22, 1980.
- BETTELLI, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 11 may 2006.
- BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p. 345–350, apr. 2007.
- BHALLA, A. K. *et al.* Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 57, n. 6, p. 1308–1310, dez. 1983.
- BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2012.
- BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Mechanisms of Defense against Intracellular Pathogens Mediated by Human Macrophages. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 3, 1 june. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Esquistossomose**: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>. Acesso em: 5 dez. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Caracterização da situação epidemiológica da hanseníase e diferenças por sexo, Brasil, 2012-2016. **Boletim epidemiológico**, Brasília, v. 49, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Vigitel Brasil 2016**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública**: manual técnico-operacional. Brasília: Ministério da Saúde Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/04/diretrizes-eliminacao-hanseniase-4fev16-web.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii**: diretrizes técnicas. Brasília: Ministério da Saúde, 2014

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos**: baciloscopia em hanseníase. [s.l: s.n.], 2010.

Buhl *et al.* Caracterização molecular e morfológica do infiltrado inflamatório na rosácea revela a ativação das vias Th1 / Th17. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 9, p. 2198-2208.

CABRAL-MIRANDA, W.; CHIARAVALLLOTI NETO, F.; BARROZO, L. V. Socio-economic and environmental effects influencing the development of leprosy in Bahia, north-eastern Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 12, p. 1504–1514, 2014.

CARVALHO, O. D. S. *et al.* Geographical distribution of intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the states of Paraná, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco and Rio Grande do Norte, Brazil, 2012-2014. **Epidemiologia E Servicos De Saude**, v. 27, n. 3, p. e2017343, 2018.

CAVALIER, E. *et al.* Vitamin D: current status and perspectives. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 2, p. 120–127, 2009.

CHAPMAN, M. S. Vitamin a: history, current uses, and controversies. In: SEMINARS IN CUTANEOUS MEDICINE AND SURGERY. **Anais [...]**. WB Saunders, 2012.

CHATTERJEE, S. *et al.* Incidence of active pulmonary tuberculosis in patients with coincident filarial and/or intestinal helminth infections followed longitudinally in South India. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94603, 2014.

CHATTERJEE, S.; NUTMAN, T. B. Helminth-induced immune regulation: implications for immune responses to tuberculosis. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. e1004582, 2015.

CHERAYIL, B. J. Iron and immunity: immunological consequences of iron deficiency and overload. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, v. 58, n. 6, p. 407–415, dez. 2010.

CHIFMAN, J.; LAUBENBACHER, R.; TORTI, S. V. A Systems biology approach to iron metabolism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 844, p. 201–225, 2014.

CHUN, R. F. *et al.* Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 21 apr. 2014.

COELHO, P. M. Z. *et al.* Improvement of POC-CCA interpretation by using lyophilization of urine from patients with schistosoma mansoni low worm burden: towards an elimination of doubts about the concept of trace. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. e0004778, 2016.

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 347–357, 2014.

CORSTJENS, P. L. *et al.* Field-friendly test for monitoring multiple immune response markers during onset and treatment of exacerbated immunity in leprosy. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 23, n. 6, p. 515–519, 2016.

CORTELA, D. C. B. *et al.* Inflammatory mediators of leprosy reactional episodes and dental infections: a systematic review. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

COSTA, C. DE S. *et al.* Schistosomiasis control program: evaluation of the implantation in three municipalities of the Zona da Mata of Pernambuco, Brazil. **Saúde em Debate**, v. 41, n. spe, p. 229–241, mar. 2017.

COUTO, L. D. *et al.* Neglected tropical diseases: prevalence and risk factors for schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in a region of Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 6, p. 363–371, 2014.

CRICHTON, R. R. Ferritin: structure, synthesis and function. **New England Journal of Medicine**, v. 284, n. 25, p. 1413–1422, 1971.

CRUZ, A. A. *et al.* Global issues in allergy and immunology: Parasitic infections and allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 5, p. 1217–1228, nov. 2017.

CURTIS, M. M.; WAY, S. S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 177–185, 2009.

DA COSTA MARTINS, A. C. *et al.* Estudo da mucosa nasal de contatos de hanseníase, com positividade para o antígeno glicolípido fenólico 1. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, n. 5, p. 579–587, 2010.

DABRERA, T. M. E. *et al.* Prevalence and correlates of leprosy in a high-risk community setting in sri lanka. **Asia-Pacific Journal of Public Health**, v. 28, n. 7, p. 586–591, oct. 2016.

DAVIES, P. D. O. A possible link between vitamin D deficiency and impaired host defence to *Mycobacterium tuberculosis*. **Tubercle**, v. 66, n. 4, p. 301–306, 1985.

DAWSON, H. D. *et al.* The Retinoic Acid Receptor-alpha mediates human T-cell activation and Th2 cytokine and chemokine production. **BMC immunology**, v. 9, p. 16, 16 apr. 2008.

DE MATTOS BARBOSA, M. G. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 11, p. 505–514, 1 nov. 2017.

DE OLIVEIRA FRAGA, L. A. *et al.* Induction of Type 2 Responses by Schistosome Worms during Prepatent Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 3, p. 464–472, 1 feb. 2010a.

DE OLIVEIRA FRAGA, L. A. *et al.* Rapid induction of IgE responses to a worm cysteine protease during murine pre-patent schistosome infection. **BMC immunology**, v. 11, p. 56, 15 nov. 2010b.

DE SOUZA, V. N. B. *et al.* Advances in leprosy immunology and the field application: a gap to bridge. **Clinics in dermatology**, v. 34, n. 1, p. 82–95, 2016.

- DE WAAL MALEFYT, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J. E. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 11, p. 4754–4765, 1993.
- DEENICK, E. K.; TANGYE, S. G. Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 7, p. 503–505, 2007.
- DINIZ, L. M. *et al.* do intestinal nematodes increase the risk for multibacillary leprosy? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 852–854, 2001.
- DINIZ, L. M. *et al.* Presence of intestinal helminths decreases T helper type 1 responses in tuberculoid leprosy patients and may increase the risk for multi-bacillary leprosy. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 161, n. 1, p. 142–150, 2010.
- DOUGLAS, J. T. *et al.* Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 11, n. 5, p. 897–900, 2004.
- DRAKESMITH, H.; PRENTICE, A. M. Hepcidin and the iron-infection axis. **Science**, New York, v. 338, n. 6108, p. 768–772, 9 nov. 2012.
- DUTHIE, M. S. *et al.* A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 2, p. 233–239, 2014.
- DUTHIE, M. S. *et al.* Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 7, p. 3267–3275, 2016.
- EDFELDT, K. *et al.* T-cell cytokines differentially control human monocyte antimicrobial responses by regulating vitamin D metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 52, p. 22593–22598, 2010.
- ELIAS, D. *et al.* Schistosoma mansoni infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent Mycobacterium tuberculosis. **Vaccine**, v. 23, n. 11, p. 1326–1334, 2005.
- ERKELENS, M. N.; MEBIUS, R. E. Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 3, p. 168–180, 2017.
- ESPÍRITO-SANTO, M. C. C. *et al.* Comparative study of the accuracy of different techniques for the laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni in areas of low endemicity in Barra Mansa city, Rio de Janeiro state, Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- EVANS, H.; MITRE, E. Worms as therapeutic agents for allergy and asthma: Understanding why benefits in animal studies have not translated into clinical success. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 2, p. 343–353, 1 feb. 2015.
- EZENDUKA, C. *et al.* Cost-effectiveness analysis of three leprosy case detection methods in Northern Nigeria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. e1818, 2012.



- FABRI, M. *et al.* Vitamin D is required for IFN- $\gamma$ -mediated antimicrobial activity of human macrophages. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 104, p. 104ra102–104ra102, 2011.
- FAIRBANKS, V. F.; FAHEY, J. L.; BEUTLER, E. **Clinical disorders of iron metabolism**. Saunders, 1971.
- FALLON, P. G. *et al.* Elevated type 1, diminished type 2 cytokines and impaired antibody response are associated with hepatotoxicity and mortalities during *Schistosoma mansoni* infection of CD4-depleted mice. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 2, p. 470–480, 2000.
- FALLON, P. G.; MANGAN, N. E. Suppression of T H 2-type allergic reactions by helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 220, 2007.
- FEENSTRA, S. G. *et al.* Recent food shortage is associated with leprosy disease in Bangladesh: a case-control study. **PLoS neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, p. e1029, 2011.
- FEENSTRA, S. G. *et al.* Social contact patterns and leprosy disease: a case-control study in Bangladesh. **Epidemiology and Infection**, v. 141, n. 3, p. 573–581, mar. 2013.
- FINE, P. E. *et al.* Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 1, p. 91–102, 1997.
- FISCHER, S. *et al.* Increase of MCP-1 (CCL2) in myelin mutant Schwann cells is mediated by MEK-ERK signaling pathway. **Glia**, v. 56, n. 8, p. 836–843, 2008.
- FONSECA, F. *et al.* Spatial modeling of the schistosomiasis mansoni in Minas Gerais State, Brazil using spatial regression. **Acta Tropica**, v. 133, p. 56–63, 2014.
- FREDERICK, R. E.; MAYFIELD, J. A.; DUBOIS, J. L. Iron trafficking as an antimicrobial target. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 22, n. 4, p. 583–593, aug. 2009.
- GAMA, R. S. *et al.* High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 153, 2018.
- GANZ, T. Iron in Innate Immunity: Starve the Invaders. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 1, p. 63–67, feb. 2009.
- GANZ, T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. **Blood**, v. 117, n. 17, p. 4425–4433, 28 apr. 2011.
- GANZ, T.; NEMETH, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, v. 15, n. 8, p. 500–510, aug. 2015.
- GAZZINELLI, A. *et al.* Socioeconomic determinants of schistosomiasis in a poor rural area in Brazil. **Acta Tropica**, v. 99, n. 2–3, p. 260–271, oct. 2006.
- GEIGER, S. M. Immuno-epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in endemic populations co-infected with soil-transmitted helminths: present knowledge, challenges, and the need for further studies. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 118–123, 2008.

GELUK, A. *et al.* Longitudinal immune responses and gene expression profiles in type 1 leprosy reactions. **Journal of Clinical Immunology**, v. 34, n. 2, p. 245–255, feb. 2014.

GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; SPENCER, J. S. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Leprosy Review**, v. 82, n. 4, p. 402, 2011.

GEORGE, P. J. *et al.* Modulation of mycobacterial-specific Th1 and Th17 cells in latent tuberculosis by coincident hookworm infection. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 10, p. 5161–5168, 15 may 2013.

GERBE, F. *et al.* Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. **Nature**, v. 529, n. 7585, p. 226–230, 14 jan. 2016.

GONZALEZ-LOMBANA, C. *et al.* IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003243, mar. 2013.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, n. 6, p. 269–290, july. 2008.

GRANT, F. K. E. *et al.* Comparison of indicators of iron deficiency in Kenyan children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 5, p. 1231–1237, may 2012.

GREENACRE, M. **Correspondence analysis in practice**. Florida: Chapman and Hall/CRC, 2007. Disponível em: <https://www.mobt3ath.com/uplode/book/book-41268.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2019.

GREENLAND, K. *et al.* The epidemiology of soil-transmitted helminths in Bihar State, India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003790, may 2015.

GRENFELL, R. F. Q. *et al.* *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, may 2013.

GRIMES, J. E. *et al.* The roles of water, sanitation and hygiene in reducing schistosomiasis: a review. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 156, 13 mar. 2015.

GRIMES, J. E. T. *et al.* The Relationship between Water, Sanitation and Schistosomiasis: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 12, p. e3296, 4 dez. 2014.

GROSSI, M. A. DE F. *et al.* A influência do teste sorológico ML Flow na classificação da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 34–38, 2008.

HAGGE, D. A. *et al.* Opening a can of worms: Leprosy reactions and complicit soil-transmitted helminths. **EBioMedicine**, v. 23, p. 119–124, 1 sept. 2017.

HAMAÏ, A.; MEHRPOUR, M. Homéostasie du fer et autophagie. **Médecine/Sciences**, v. 33, n. 3, p. 260–267, 1 mar. 2017.

HARRISON, E. H.; HUSSAIN, M. M. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 5, p. 1405–1408, may 2001.

HASAN, Z. *et al.* Leprosy Patients with lepromalous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 72, p. 35–44, 2004.

HATTA, M. *et al.* Distribuição e persistência do transporte nasal de *Mycobacterium leprae* entre uma população em que a hanseníase é endêmica na Indonésia. **Transações da Sociedade Real de Medicina Tropical e Higiene**, v. 89, n.4, p. 381–385, 1995.

HESSE, M. *et al.* The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3157–3166, 2004.

HEWISON, M. Antibacterial effects of vitamin D. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 7, n. 6, p. 337–345, june. 2011.

HIX, J. *et al.* Validation of a rapid enzyme immunoassay for the quantitation of retinol-binding protein to assess vitamin A status within populations. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, n. 11, p. 1299, 2006.

HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E.; MOSS, P. A. H. Hypochromic anaemias and iron overload. **Essential haematology**. 4a. ed. London: Blackwell Science, v. 28, 2001.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-289, 1934.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6406–6416, 2000.

HOLICK, M. F. *et al.* Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 7, p. 1911–1930, 2011.

HOLT, A. P. *et al.* Liver myofibroblasts regulate infiltration and positioning of lymphocytes in human liver. **Gastroenterology**, v. 136, n. 2, p. 705–714, 2009.

HURST, R. J. M.; ELSE, K. J. The retinoic acid-producing capacity of gut dendritic cells and macrophages is reduced during persistent *T. muris* infection. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 7–8, p. 229–233, 2013.

IKEDA, A. *et al.* Progression of autoimmune hepatitis is mediated by IL-18-producing dendritic cells and hepatic CXCL9 expression in mice. **Hepatology**, v. 60, n. 1, p. 224–236, 2014.

IWATA, M.; ESHIMA, Y.; KAGECHIKA, H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. **International Immunology**, v. 15, n. 8, p. 1017–1025, aug. 2003.

JAENSSON-GYLLENBÄCK, E. *et al.* Bile retinoids imprint intestinal CD103+ dendritic cells with the ability to generate gut-tropic T cells. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 4, p. 438–447, july. 2011.

JANKOVIC, D. *et al.* CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 4, p. 619–629, 1998.

JOB, C. K. *et al.* Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 3, p. 518–521, 2008.

KAMPIRAPAP, K. *et al.* DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 66, p. 16–21, 1998.

KANG, T.-J. *et al.* Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. **Clinical and Experimental Dermatology: Experimental Dermatology**, v. 28, n. 4, p. 420–424, 2003.

KAPLAN, G. *et al.* Effect of recombinant interferon-gamma on hydrogen peroxide-releasing capacity of monocyte-derived macrophages from patients with lepromatous leprosy. **The Journal of Immunology**, v. 137, n. 3, p. 983–987, 1986.

KASHYAP, V. *et al.* RAR $\gamma$  is essential for retinoic acid induced chromatin remodeling and transcriptional activation in embryonic stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 4, p. 999–1008, 2013.

KATTULA, D. *et al.* Prevalence & risk factors for soil transmitted helminth infection among school children in south India. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. 1, p. 76–82, jan. 2014.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 38–43, jan. 2003.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Ver. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397–400, 1972.

KAWAGUCHI, R. *et al.* A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 820–825, 2007.

KAWAGUCHI, R. *et al.* Vitamin A transport mechanism of the multitransmembrane cell-surface receptor STRA6. **Membranes**, v. 5, n. 3, p. 425–453, 2015.

KERR-PONTES, L. R. S. *et al.* Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 2, p. 262–269, abr. 2004.

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

KHAN, A. R.; FALLON, P. G. Helminth therapies: translating the unknown unknowns to known knowns. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 3–4, p. 293–299, mar. 2013.

KIM, E. W. *et al.* Vitamin D status contributes to the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium leprae*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, 2 July. 2018.

KIRKALDY, A. A. *et al.* Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 134, n. 3, p. 447–453, 2003.

KLATSER, P. R. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2947–2951, 1993.

KREIDER, T. *et al.* Alternatively activated macrophages in helminth infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 4, p. 448–453, 2007.

KREUTZ, M. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production and vitamin D<sub>3</sub> receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. **Blood**, v. 82, n. 4, p. 1300–1307, aug. 1993.

KUMAR, A.; GIRDHAR, A.; GIRDHAR, B. K. Incidence of leprosy in Agra district. **Leprosy Review**, v. 78, n. 2, p. 131–136, jun. 2007.

KUMAR, S. *et al.* IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. **Immunobiology**, v. 218, n. 12, p. 1488–1496, 2013.

KUMAR, Sudhir *et al.* Th3 Immune responses in the progression of leprosy via molecular cross-talks of TGF- $\beta$ , CTLA-4 and Cbl-b. **Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 133–142, 2011.

LACORCIA, M.; PRAZERES DA COSTA, C. U. Maternal Schistosomiasis: Immunomodulatory Effects With Lasting Impact on Allergy and Vaccine Responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2960, dez. 2018.

LAPINSKY, S. E. *et al.* Anaemia, iron-related measurements and erythropoietin levels in untreated patients with active leprosy. **Journal of Internal Medicine**, v. 232, n. 3, p. 273–278, 1992.

LARANGE, A.; CHEROUTRE, H. Retinoic Acid and Retinoic Acid Receptors as Pleiotropic Modulators of the Immune System. **Annual Review of Immunology**, v. 34, n. 1, p. 369–394, 2016.

LEVY, A. P. *et al.* Haptoglobin: basic and clinical aspects. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 2, p. 293–304, feb. 2010.

- LEW, W.; TADA, Y. Serum monocyte chemoattractant protein-1 is elevated in lepromatous leprosy patients with high bacterial indices. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 70, n. 2, p. 129, 2002.
- LIMA, E. S. *et al.* Vitamin A and lipid peroxidation in patients with different forms of leprosy. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 49, n. 4, p. 211–214, aug. 2007.
- LIN, R.; WHITE, J. H. The pleiotropic actions of vitamin D. **Bioessays**, v. 26, n. 1, p. 21–28, 2004.
- LIU, M. *et al.* CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 3, p. 121–130, 2011.
- LIU, P. T. *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770–1773, mar. 2006.
- LIU, P. T. *et al.* Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2060–2063, 2007.
- LOVETT-RACKE, A. E.; RACKE, M. K. Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells. **Cellular Immunology**, v. 215, n. 1, p. 54–60, jan. 2002.
- LUSTER, A. D.; UNKELESS, J. C.; RAVETCH, J. V.  $\gamma$ -Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. **Nature**, v. 315, n. 6021, p. 672, june. 1985.
- MABBOTT, N. A. The Influence of Parasite Infections on Host Immunity to Co-infection With Other Pathogens. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2579, nov. 2018.
- MAGGINI, S. *et al.* Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. S1, p. S29–S35, 2007.
- MAGUETA, E. B. *et al.* Risk Factors to Schistosomiasis in Communities from Minas Gerais State, Brazil: The Importance of Baseline Studies for Evaluations in the Endemic Area. **Journal of Medical and Biological Science Research**, v. 1, n. 6, p. 62–70, 2015.
- MAIZELS, R. M. *et al.* Helminth parasites—masters of regulation. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 89–116, 2004.
- MAIZELS, R. M.; MCSORLEY, H. J. Regulation of the host immune system by helminth parasites. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 3, p. 666–675, 2016.
- MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHS, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 733, 2003.
- MANEL, N.; UNUTMAZ, D.; LITTMAN, D. R. The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- $\beta$  and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ T. **Nature Immunology**, v. 9, n. 6, p. 641–649, june. 2008.

- MANGAN, N. E. *et al.* Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 10, p. 6346–6356, 2004.
- MANGAN, P. R. *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the T H 17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231-234, 2006.
- MARÇAL, P. H. F. *et al.* Utility of immunoglobulin isotypes against LID-1 and NDO-LID for, particularly IgG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p. 1-8, 2018.
- MARTINS, M. V. *et al.* Pathogen-specific epitopes as epidemiological tools for defining the magnitude of Mycobacterium leprae transmission in areas endemic for leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1616, apr. 2012.
- MASSAGUÉ, J. TGF $\beta$  signalling in context. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 10, p. 616, 2012.
- MATSUOKA, L. Y. *et al.* Racial pigmentation and the cutaneous synthesis of vitamin D. **Archives of Dermatology**, v. 127, n. 4, p. 536–538, 1991.
- MATZNER, M. *et al.* Low serum levels of cathelicidin LL-37 in leprosy. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 56–59, 2011.
- MCDONALD, K. G. *et al.* Epithelial expression of the cytosolic retinoid chaperone cellular retinol binding protein II is essential for in vivo imprinting of local gut dendritic cells by luminal retinoids. **The American Journal of Pathology**, v. 180, n. 3, p. 984–997, 2012.
- MCGEACHY, M. J. *et al.* TGF- $\beta$  and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T H-17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390-1397, 2007.
- MCKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25+ CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 1224–1231, 2004.
- MCSORLEY, H. J. *et al.* Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 5, p. 1068–1078, sept. 2014.
- MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunology Today**, v. 20, n. 10, p. 469–473, oct. 1999.
- MINAS GERAIS. Secretaria de Estado da Saúde. Área Técnica de Hanseníase. **Seminário de Avaliação das Ações de Controle de Hanseníase Realizadas em Minas Gerais**, 2002.
- MODLIN, R. L. Learning from leprosy: insights into contemporary immunology from an ancient disease. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 2002.
- MOET, F. J. *et al.* Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Leprosy Review**, v. 75, n. 4, p. 310–326, dez. 2004.

- MOET, F. J. *et al.* Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 3, p. 346–353, 2006.
- MOLENAAR, R. *et al.* Expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in mucosal dendritic cells and gut-draining lymph node stromal cells is controlled by dietary vitamin A. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 186, n. 4, p. 1934–1942, 15 feb. 2011.
- MORAIS, P. B. *et al.* Perfil epidemiológico da hanseníase num município superendêmico do interior do sudeste brasileiro. **Hansenologia Internationalis (Online)**, v. 37, n. 2, p. 61–68, 2012.
- MOSER, B. *et al.* Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control☆. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 2, p. 75–84, 2004.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, n. 1, p. 145–173, 1989.
- MOTTA, A. C. F. *et al.* Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. **Clinics**, v. 67, n. 10, p. 1145–1148, 2012.
- MOURA, D. F. *et al.* CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 11, p. 2925–2936, 2012.
- MUCIDA, D. *et al.* Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, n. 5835, p. 256–260, 2007.
- MUCIDA, D. *et al.* Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 471–472; apr. 2009.
- MURAI, M. *et al.* Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. **Nature Immunology**, v. 10, n. 11, p. 1178–1184, 2009.
- MURTO, C. *et al.* Patterns of migration and risks associated with leprosy among migrants in Maranhão, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2422, Sept. 2013.
- MUTHUSWAMY, R. *et al.* Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. **Cancer Research**, v. 68, n. 14, p. 5972–5978, 2008.
- NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 90–98, 2015.
- NEGERA, E. *et al.* The Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Erythema Nodosum Leprosum Reactions. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 189, 2018.
- NIELSEN, M. J.; MOESTRUP, S. K. Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. **Blood**, v. 114, n. 4, p. 764–771, july. 2009.



NIKAWA, T. *et al.* Vitamin A prevents the decline in immunoglobulin A and Th2 cytokine levels in small intestinal mucosa of protein-malnourished mice. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 5, p. 934–941, may 1999.

OKADA, H. *et al.* The ‘hygiene hypothesis’ for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 160, n. 1, p. 1–9, 2010.

OKADA, S. *et al.* Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. **Science**, v. 349, n. 6248, p. 606–613, 2015.

OKTARIA, S. *et al.* Soil-transmitted helminth infections and leprosy: a cross-sectional study of the association between two major neglected tropical diseases in Indonesia. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 258, 2016.

OKTARIA, S. *et al.* Dietary diversity and poverty as risk factors for leprosy in Indonesia: A case-control study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006317, 2018.

OLIVEIRA, A. L. G. DE *et al.* Vitamin D receptor expression and hepcidin levels in the protection or severity of leprosy: a systematic review. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 6, p. 311–322, 2017.

OLIVEIRA, W. J. *et al.* Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. **PLoS Neglected Tropical diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006232, 2018.

OPAS Brasil. **OMS Divulga situação mundial da hanseníase**. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3795:oms-divulga-situacao-mundial-da-hanseniaase-2&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=3795:oms-divulga-situacao-mundial-da-hanseniaase-2&Itemid=812). Acesso em: 18 jan. 2020.

OPAS Brasil. **Relatório da OMS informa progressos sem precedentes contra doenças tropicais negligenciadas | OPAS/OMS**. [2017]. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contradoencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5401:relatorio-da-oms-informa-progressos-sem-precedentes-contradoencas-tropicais-negligenciadas&Itemid=812)>. Acesso em: 18 jan. 2020.

OPPENHEIMER, S. J. Iron and its relation to immunity and infectious disease. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 2S-2, p. 616S-633S, 2001.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454–467, 2008.

PALERMO, M. L. *et al.* Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 878–883, 2012.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein, Sao Paulo**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PARK, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133-1141, 2005.

- PARK, J. S. *et al.* Interleukin-8 production in tuberculous pleurisy: role of mesothelial cells stimulated by cytokine network involving tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ . **Scandinavian journal of immunology**, v. 57, n. 5, p. 463–469, 2003.
- PATTYN, S. R. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. **International Journal of Leprosy**, v. 61, n. 3, 1993.
- PERCY, L.; MANSOUR, D.; FRASER, I. Iron deficiency and iron deficiency anaemia in women. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 40, p. 55–67, 2017.
- PESCARINI, J. M. *et al.* Socioeconomic risk markers of leprosy in high-burden countries: A systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006622, 9 July. 2018.
- PETITO, R. B. *et al.* Transforming Growth Factor- $\beta$  May Be a Key Mediator of the Fibrogenic Properties of Neural Cells in Leprosy. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 72, n. 4, p. 351–365, 2013.
- PHILLIPS, D. A. *et al.* A tale of two neglected tropical infections: using GIS to assess the spatial and temporal overlap of schistosomiasis and leprosy in a region of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 4, p. 275–280, apr. 2017.
- PINHEIRO, R. O. *et al.* *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 217–230, feb. 2011.
- POPOV, A.; SCHULTZE, J. L. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. **Journal of Molecular Medicine, Berlin** v. 86, n. 2, p. 145–160, feb. 2008.
- PRIETL, B. *et al.* Vitamin D and immune function. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p. 2502–2521, 5 July. 2013.
- PROST, A.; DE PONSAY GORIM, E. The epidemiological significance of neo-natal parasitism with microfilariae of *Onchocerca volvulus* (author's transl). **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 30, n. 4, p. 477–481, 1979.
- QIU, B. *et al.* Chemokine expression dynamics in mycobacterial (type-1) and schistosomal (type-2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation. **The American journal of pathology**, v. 158, n. 4, p. 1503–1515, 2001.
- RAO, K. N.; SAHA, K. Undernutrition and lepromatous leprosy. Serum vitamin A and E levels in leprosy spectrum. **Indian Journal of Leprosy**, v. 60, n. 1, p. 66–70, jan. 1988.
- REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Medecine et Maladies infectieuses**, v. 45, n. 9, p. 383–393, sept. 2015.
- RESENDE, S. D. *et al.* Modulation of Allergic Reactivity in Humans Is Dependent on *Schistosoma mansoni* Parasite Burden, Low Levels of IL-33 or TNF- $\alpha$  and High Levels of IL-10 in Serum. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3158, jan. 2019.

RIDÉY, D.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy**, v. 34, n. 3, p. 255–73, 1966.

ROACH, D. R. *et al.* TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4620–4627, may 2002.

ROMERO-MONTOYA, M.; BELTRAN-ALZATE, J. C.; CARDONA-CASTRO, N. Evaluation and monitoring of *Mycobacterium leprae* transmission in household contacts of patients with Hansen's disease in Colombia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005325, jan. 2017.

ROOK, G. A. *et al.* The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. **Immunology**, v. 62, n. 2, p. 229–234, oct. 1987.

RS FREITAS, L.; C. DUARTE, E.; P. GARCIA, L. Leprosy in Brazil and its association with characteristics of municipalities: ecological study, 2009–2011. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 10, p. 1216–1225, July. 2014.

SADHU, S. *et al.* Reciprocity between regulatory T cells and Th17 cells: relevance to polarized immunity in leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004338, jan. 2016.

SAINI, C. *et al.* Leprosy reactions show increased Th17 cell activity and reduced FOXP3+ Tregs with concomitant decrease in TGF- $\beta$  and increase in IL-6. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004592, apr. 2016.

SAINI, C. *et al.* T helper cells in leprosy: an update. **Immunology Letters**, v. 184, p. 61–66, 2017.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. e2338, july. 2013.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. Increase in TGF- $\beta$  secreting CD4+ CD25+ FOXP3+ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2639, 2014.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 531–562, 2004.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in the past and for the future. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 901–937, 2008.

SALGAME, P. *et al.* Evidence for functional subsets of CD4+ and CD8+ T cells in human disease: lymphokine patterns in leprosy. In: **Regulation and Functional Significance of T-cell subsets**. [s.l.]: Karger Publishers, 1992a. v. 54 p. 44–59.

SANYA, R. E. *et al.* A life without worms. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 111, n. 1, p. 3–11, 2017.

SAPKOTA, B. R. *et al.* Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. **Human Immunology**, v. 71, n. 10, p. 992–998, oct. 2010.

SCHOLTE, R. G. *et al.* Spatial analysis and risk mapping of soil-transmitted helminth infections in Brazil, using Bayesian geostatistical models. **Geospatial Health**, p. 97–110, 2013.

SCHREUDER, P. A.; NOTO, S.; RICHARDUS, J. H. Epidemiologic trends of leprosy for the 21st century. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 1, p. 24–31, jan./feb. 2016.

SCHRÖCKSNADDEL, K. *et al.* Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. **Clinica Chimica Acta**, v. 364, n. 1–2, p. 82–90, 2006.

SCOLLARD, D. M. *et al.* Increased CXC ligand 10 levels and gene expression in type 1 leprosy reactions. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 18, n. 6, p. 947–953, june. 2011.

SCOLLARD, D. M.; JOYCE, M. P.; GILLIS, T. P. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 2, p. e19-22, 15 july. 2006.

SEN, R. *et al.* Patterns of erythropoiesis and anaemia in leprosy. **Leprosy Review**, v. 62, n. 2, p. 158–170, june. 1991.

SHEPARD, C. C. The nasal excretion of *Mycobacterium leprae* in leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 30, n. 1, p. 10–18, 1962.

SHER, R. *et al.* Serum trace elements and vitamin A in leprosy subtypes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, n. 9, p. 1918–1924, sept. 1981.

SHIN, D.-M. *et al.* Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 1648–1665, nov. 2010.

SILVEIRA, A. M. S. *et al.* High levels of IgG4 to *Schistosoma mansoni* egg antigens in individuals with periportal fibrosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 5, p. 542–549, may 2002.

SILVEIRA, A. M. S. *et al.* Evaluation of the CCA immuno-chromatographic test to diagnose *Schistosoma mansoni* in Minas Gerais State, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004357, 2016.

SILVEIRA-LEMOS, D. *et al.* Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 150–159, dec. 2008.

SINGH, I. *et al.* VDR polymorphism, gene expression and vitamin D levels in leprosy patients from North Indian population. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, 27 nov. 2018.

SMIT, M. J. *et al.* CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 1959–1965, 2003.

- SOW, F. B. *et al.* Role of STAT1, NF-kappaB, and C/EBPbeta in the macrophage transcriptional regulation of hepcidin by mycobacterial infection and IFN-gamma. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1247–1258, nov. 2009.
- STEAD, W. W. *et al.* Racial differences in susceptibility to infection by *Mycobacterium tuberculosis*. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 7, p. 422–427, 1990.
- STEFANI, M. M. *et al.* Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 75, 2009.
- STEWART, G. R. *et al.* Onchocerciasis modulates the immune response to mycobacterial antigens. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 117, n. 3, p. 517–523, 1999.
- STRITESKY, G. L.; YEH, N.; KAPLAN, M. H. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 5948–5955, 2008.
- SUN, C.-M. *et al.* Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 8, p. 1775–1785, 2007.
- TAKAHASHI, K. *et al.* Human neutrophils express messenger RNA of vitamin D receptor and respond to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 24, n. 3, p. 335–347, aug. 2002.
- TAKEUCHI, R. *et al.* Is there a gap between health education content and practice toward schistosomiasis prevention among schoolchildren along the shores of Lake Victoria in Kenya? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 8, p. e0007572, 19 ago. 2019.
- TALAT, N. *et al.* Vitamin D deficiency and tuberculosis progression. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 853, 2010.
- TARIQUE, M. *et al.* IL-12 and IL-23 modulate plasticity of FoxP3+ regulatory T cells in human Leprosy. **Molecular Immunology**, v. 83, p. 72–81, 2017.
- TAYLOR, M. D.; VAN DER WERF, N.; MAIZELS, R. M. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 4, p. 181–189, 2012.
- TEIXEIRA-CARVALHO, A. *et al.* Cytokines, chemokine receptors, CD4+ CD25HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 139–149, 2008.
- THOMPSON, B. Food-based approaches for combating iron deficiency. **Nutritional Anemia**, v. 337, p. 1–21, 2007.
- THOMSEN, J. H. *et al.* The Haptoglobin-CD163-Heme Oxygenase-1 Pathway for Hemoglobin Scavenging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.
- TIÓ-COMA, M. *et al.* Whole blood RNA signatures in leprosy patients identify reversal reactions before clinical onset: a prospective, multicenter study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17931, 29 nov. 2019.

TOFARIS, G. K. *et al.* Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6696–6703, 2002.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p. 455–462, dec. 2010.

TWOREK, D. *et al.* MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) and I-TAC (CXCL11) concentrations after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. **Archives of Medical Science: AMS**, v. 9, n. 5, p. 849, 2013.

UEMATSU, S. *et al.* Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 769–776, july. 2008.

URVALEK, A. M.; GUDAS, L. J. Retinoic acid and histone deacetylases regulate epigenetic changes in embryonic stem cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 28, p. 19519–19530, 11 july. 2014.

USTIANOWSKI, A. *et al.* Prevalence and associations of vitamin D deficiency in foreign-born persons with tuberculosis in London. **Journal of Infection**, v. 50, n. 5, p. 432–437, 2005.

VAN BEERS, S. M.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. **FEMS Microbiology Letters**, v. 136, n. 3, p. 221–230, 1996.

VAN HOOIJ, A. *et al.* Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil, China and Ethiopia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

VÁZQUEZ, C. M. *et al.* Micronutrients influencing the immune response in leprosy. **Nutricion Hospitalaria**, v. 29, n. 1, p. 26–36, 1 jan. 2014.

VELDHOEN, M. *et al.* TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, n. 2, p. 179–189, 2006.

VELUPILLAI, P. *et al.* B-1 cell (CD5+ B220+) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylysosamine sugars. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 1, p. 338–344, 1997.

VENTURINI, J. *et al.* In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. **Leprosy Review**, v. 82, n. 1, p. 25, 2011.

WAGENAAR, I. *et al.* Diet-related risk factors for leprosy: a case-control study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003766, may 2015.

WANG, Q. *et al.* Rationale and design of a randomized controlled trial of the effect of retinol and vitamin D supplementation on treatment in active pulmonary tuberculosis patients with diabetes. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 104, 26 feb. 2013.

- WANG, T.-T. *et al.* Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 2909–2912, 1 sept. 2004.
- WEBB, E. L. *et al.* Helminths are positively associated with atopy and wheeze in Ugandan fishing communities: results from a cross-sectional survey. **Allergy**, v. 71, n. 8, p. 1156–1169, 2016.
- WHITE, C.; FRANCO-PAREDES, C. Leprosy in the 21st century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 80–94, 2015.
- WHO. Global leprosy strategy 2016–2020: accelerating towards a leprosy-free world. Geneva: World Health Organization, 2016. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/208824>. Acesso em: ago. 2019)
- WHO, W. H. **A Guide to eliminating leprosy as a public health problem [pocket edition]**. [s.l.]: World Health Organization, 1989.
- WIEDERMANN, U. *et al.* Aberrant T-cell function in vitro and impaired T-cell dependent antibody response in vivo in vitamin A-deficient rats. **Immunology**, v. 80, n. 4, p. 581–586, Dec. 1993.
- WINTERGERST, E. S.; MAGGINI, S.; HORNIG, D. H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 51, n. 4, p. 301–323, 2007.
- XIAO, S. *et al.* Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- $\beta$ -driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 4, p. 2277–2284, 2008.
- YANG, L. *et al.* IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human T H 17 cells. **Nature**, v. 454, n. 7202, p. 350, 2008.
- YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 490–494, 19 apr. 2002.
- YUK, J.-M. *et al.* Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. **Cell Host & Microbe**, v. 6, n. 3, p. 231–243, 2009.
- ZHENG, Y. *et al.* Interleukin-22, a T H 17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. **Nature**, v. 445, n. 7128, p. 648–651, 2007.
- ZHOU, L. *et al.* IL-6 Programs TH-17 Cell Differentiation by Promoting the Sequential Engagement of the IL-21 and IL-23 Pathways. **Cytokine**, v. 1, n. 39, p. 49, 2007.
- ZONI, A. C.; CATALÁ, L.; AULT, S. K. Schistosomiasis Prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942-2014: A Systematic Review in the Context of a Regional Elimination Goal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 23 mar. 2016.

## APÊNDICE A – Questionário

### HANSENÍASE, PARASIToses E DEFICIÊNCIA DE MICRONUTRIENTES

( ) **Caso Confirmado**    2. ( ) **Contato Domiciliar**    3. ( ) **Controle**    Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

2. Você já teve Hanseníase?    0. ( ) Não    1. ( ) Sim

3. Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_    4. Idade (anos completos): \_\_\_\_\_

5. Gênero: 1. ( ) Masculino    2. ( ) Feminino

6. Cor da pele(etnia)

1. ( ) branca    2. ( ) preta    3. ( ) amarela    4. ( ) parda    5. ( ) indígena    99. ( ) Não respondeu/não soube informar

7. Município: \_\_\_\_\_ ( ) Zona rural ( ) Zona urbana    ESF: \_\_\_\_\_

8. Endereço: \_\_\_\_\_ nº \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

9. Telefones: (\_\_\_\_) \_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ (residencial)    (\_\_\_\_) \_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ (Celular)

10. Há quanto tempo você mora neste município? 1. ( ) < de 1 ano    2. ( ) 1 a 5 anos    3. ( ) > de 5 anos

11. Entrevistador: \_\_\_\_\_

12. Examinador: \_\_\_\_\_

### CARACTERÍSTICAS SOCIOECONÔMICAS

13. Até que série o sr(a) estudou?

1. ( ) Ensino superior    2. ( ) Ensino médio    3. ( ) Ensino Fundamental  
4. ( ) nunca estudou    88. ( ) Não se aplica    99. ( ) Não respondeu/Não soube informar

14. Qual seu estado civil?

1. ( ) Solteiro(a)    2. ( ) Casado(a)/União Estável    3. ( ) Separado/ Divorciado(a)  
4. ( ) Viúvo(a)    99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

15. Qual é sua ocupação / trabalho?

1. ( ) Trabalhador rural    2. ( ) Serviços domésticos    3. ( ) Estudante  
4. ( ) Serviços de nível médio ou especializado (comércio, prefeitura, agente de saúde, técnico, professor)    5. ( ) Aposentado ou Pensionista    6. ( ) Não tem trabalho    7. ( ) Outros

88. ( ) Não se aplica    99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

16. No caso de aposentado, isto se deve a complicações relacionadas com a Hanseníase (pergunta para caso índice)?

0. ( ) Não    1. ( ) Sim    88. ( ) Não se aplica    99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

16b. Se sim, quais complicações?

1. ( ) Fraqueza    2. ( ) Deformidade    3. ( ) Dormência    4. ( ) Outros: \_\_\_\_\_

17. Qual a renda mensal familiar? (Salário Mínimo = R\$937,00)

1. ( ) menor que 1 Salário Mínimo    2. ( ) 1 a 3 Salários Mínimos  
3. ( ) entre 3 e 5 Salários Mínimos    4. ( ) mais que 5 Salários Mínimos  
99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

18. Contando com você, quantas pessoas vivem na casa? \_\_\_\_\_

### RELAÇÃO CASO ÍNDICE/ CONTATO

19. Quem são as pessoas que moram com você, em sua casa? Registrar o **nome completo e grau de parentesco** das pessoas:



Nome: \_\_\_\_\_ Grau de Parentesco/idade: \_\_\_\_\_  
 Nome: \_\_\_\_\_ Grau de Parentesco/idade: \_\_\_\_\_  
 Nome: \_\_\_\_\_ Grau de Parentesco/idade: \_\_\_\_\_  
 Nome: \_\_\_\_\_ Grau de Parentesco/idade: \_\_\_\_\_

- 88.( ) Não se aplica      99.( ) Não respondeu/ Não soube informar
20. Alguém na família já teve hanseníase?  
 0.( ) Sim   1.( ) Não   99.( ) Não respondeu/ Não soube informar
21. E hoje, tem alguém que mora com você que tem hanseníase?  
 0.( ) Sim   1.( ) Não   88.( ) Não se aplica   99.( ) Não respondeu/ Não soube informar
22. Se sim, quantas?  
 1.( ) Uma   2.( ) Duas   3.( ) Três   4.( ) Quatro ou mais   88.( ) Não se aplica   99.( ) Não resp./Não soube informar
23. Qual(is) o(s) nome(s) da(s) pessoa(s) que mora(m) em sua casa que tem hanseníase :  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

24. Qual o seu grau de parentesco com o(s) caso intradomiciliar(es)? \_\_\_\_\_  
 88.( ) Não se aplica

### CONHECIMENTO SOBRE A HANSENÍASE

25. Você sabe como se pega a Hanseníase?   0.( ) Não      1.( ) Sim
26. Se sim, explique como se pega a Hanseníase: Pode assinalar mais de 1 opção  
 1.( ) pelo ar   2.( ) pelo contato   3.( ) por gotículas   4.( ) Outros \_\_\_\_\_  
 88.( ) Não se aplica   99.( ) Não respondeu/ Não soube informar
27. Você sabe quais são os sintomas da Hanseníase?   0.( ) Não      1.( ) Sim
- 27a. **Se sim**, quais são os sintomas da Hanseníase?   Pode assinalar mais de 1 opção  
 1.( ) Manchas pelo corpo   2.( ) Dormência/perda de sensibilidade no local da mancha   3.( ) Nódulos   4.( ) Ferida  
 5.( ) Deformidade em alguma parte do corpo      88.( ) Não se aplica   99.( ) Não respondeu/ Não soube informar
28. Número de Cicatrizes de BCG (verificar no braço direito)  
 0.( ) Nenhuma cicatriz   1.( ) 1 cicatriz      2.( ) 2 Cicatrizes      3.( ) Não verificado      4.( ) Outros  
 \_\_\_\_\_

### INFECÇÕES PARASITÁRIAS

29. Você se lembra de alguma verminose que você teve no passado?  
 0.( ) Não   1.( ) Sim   88.( ) Não se aplica   99.( ) Não respondeu/ Não soube informar
- 29a. Se sim, você poderia apontar o possível verme? Pode assinalar mais de 1 opção      88.( ) Não se aplica  
 1.( ) Lombriga   2.( ) Schistose   3.( ) Amarelão   4.( ) Tenia   5.( ) Oxiurus   6.( ) Giardíia  
 7.( ) Ameba      8.( ) Outros (especificar): \_\_\_\_\_      99.( ) Não respondeu/ Não soube informar
30. Você já foi tratado para outras verminoses no passado? 0.( ) Não   1.( ) Sim  
 99.( ) Não respondeu/ Não soube informar
31. Qual é a sua fonte regular de água?  
 1.( ) Água encanada   2.( ) Lagoa, rio, córrego   3.( ) Água de chuva   4.( ) Poço, cisterna  
 5. Outros (especificar ): \_\_\_\_\_      99.( ) Não respondeu/ Não soube informar
32. Você trata ou filtra a água para beber?  
 0.( ) Não   1.( ) Sim   99.( ) Não respondeu/Não soube informar

33. Como é o sistema de esgoto da sua casa? 1. ( ) Esgoto encanado 2. ( ) Esgoto sem encanamento 3. ( ) Não há sistema de esgoto. 4. ( ) Fossa. 5. Outros (especificar): \_\_\_\_\_ 99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

34. Você higieniza (lava) suas frutas e legumes antes de cozinhar e servir?  
0. ( ) Não 1. ( ) Sim 99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

35. Como você higieniza as verduras ?

1. ( ) Lava as folhas em água da torneira 2. ( ) Lava as folhas e mergulha no vinagre 3. ( ) Não lavo  
4. ( ) Lava as folhas e mergulha na água contendo cloro (água sanitária) 5. Outro  
(especificar): \_\_\_\_\_  
99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

36. Você tem o hábito de lavar as mãos antes das refeições?

1. ( ) Sempre 2. ( ) Às vezes 3. ( ) Não lavo 99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

37. Existe algum animal doméstico em sua casa?

0. ( ) Não 1. ( ) Sim 99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

37a. Se sim, qual(is)? \_\_\_\_\_

38. Você realiza algum tipo de atividade de trabalho e/ou lazer em contato com água de rios, lagos, ribeirão, córregos, poços e ou outra fonte natural de água?

0. ( ) Não 1. ( ) Sim 99. ( ) Não respondeu/ Não soube informar

38a. Se sim, que tipo de atividade? \_\_\_\_\_

### AVALIAÇÃO DERMATONEUROLÓGICA

39. Presença de Lesões na Pele? 0. ( ) Não 1. ( ) Sim 2. Quantas \_\_\_\_\_

40a. Presença de Lesões foveolar? 0. ( ) Não 1. ( ) Sim 2. Quantas \_\_\_\_\_

40b. Características das Lesões:

1. Manchas hipocrômicas?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	2. Quantas _____	3. ( ) Ignorado
2. Áreas referidas hipo/anestésicas?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	2. Quantas _____	3. ( ) Ignorado
3. Placas (lesões planas > 1cm)?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	2. Quantas _____	3. ( ) Ignorado
4. Pápulas (pequenas elevações < 1cm)	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	2. Quantas _____	3. ( ) Ignorado
5. Nódulos (lesões palpáveis > 1cm) ?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	2. Quantas _____	3. ( ) Ignorado
6. Infiltrações difusas?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	2. Quantas _____	3. ( ) Ignorado
7. Espessamento Neural?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	2. Quantas _____	3. ( ) Ignorado 4. Local _____

41. Avaliação da face (Nariz):

1. Possui queixa?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	Qual? _____
2. Ressecamento?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	
3. Ferida?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	
4. Perfuração do Septo?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	

42. Avaliação da face (Olhos):

	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	Qual? _____	
	Olho Direito		Olho Esquerdo	
Fecha os olhos s/ força (mm)?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	0. ( ) Não	1. ( ) Sim
Fecha olhos c/ força (mm)?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	0. ( ) Não	1. ( ) Sim
Triquíase (S/N) / Ectrópico (S/N)?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	0. ( ) Não	1. ( ) Sim
Dimin. sensib. córnea (S/N)?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	0. ( ) Não	1. ( ) Sim
Opacidade córnea (S/N)?	0. ( ) Não	1. ( ) Sim	0. ( ) Não	1. ( ) Sim
Acuidade visual?	( ) Normal	( ) Alterada	( ) Normal	( ) Alterada

43. Força Membros Superiores (MSD= Membro Sup. Direito / MSE= Membro Sup. Esquerdo)

Abrir dedo mínimo - Abdução do 5° (dedo ulnar)

MSD			MSE		
( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado	( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado

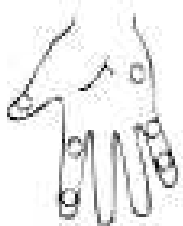
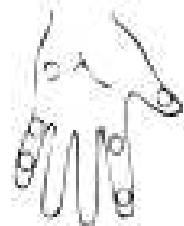
Elevar o polegar- Abdução do polegar (nervo mediano)

MSD			MSE		
( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado	( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado

Elevar o punho - Extensão do punho (nervo radial)

MSD			MSE		
( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado	( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado

44. Avaliação Sensitiva - Membros Superiores – Marcar com caneta, conforme avaliação com monofilamento

D	E	LEGENDA	CADA FILAMENTO CORRESPONDE A UM NÍVEL FUNCIONAL REPRESENTADO POR UMA COR
		Verde ●	0,05 g - sensibilidade normal na mão e no pé
		Azul ●	0,2 g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - dificuldade para discriminar textura (tato leve)
		Violeta ●	2,0 g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
		Vermelho (fechado) ●	4,0 g - perda da sensibilidade protetora na mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (marcar com x) ⊗	10 g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (circular) ○	300 g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
		Preto ●	- sem resposta - perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

45. Força Membros Inferiores (MID=Membro Inf. Direito / MIE=Membro Inf. Esquerdo)

Extensão do Hálux

MSD			MSE		
( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado	( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado

Dorsiflexão do pé

MSD			MSE		
( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado	( ) Forte	( ) Diminuída	( ) Paralisado

46. Avaliação Sensitiva Membros Inferiores– Marcar com caneta, conforme avaliação com monofilamento

D	E	LEGENDA	CADA FILAMENTO CORRESPONDE A UM NÍVEL FUNCIONAL REPRESENTADO POR UMA COR
		Verde ●	0,05 g - sensibilidade normal na mão e no pé
		Azul ●	0,2 g - sensibilidade diminuída na mão e normal no pé - dificuldade para discriminar textura (tato leve)
		Violeta ●	2,0 g - sensibilidade protetora diminuída na mão - incapacidade de discriminar textura - dificuldade para discriminar formas e temperatura
		Vermelho (fechado) ●	4,0 g - perda da sensibilidade protetora na mão e às vezes no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (marcar com x) ⊗	10 g - perda da sensibilidade protetora no pé - perda da discriminação de textura - incapacidade de discriminar formas e temperatura
		Vermelho (circular) ○	300 g - permanece apenas a sensação de pressão profunda na mão e no pé
		Preto ●	- sem resposta - perda da sensação de pressão profunda na mão e no pé

47. Forma Clínica (Classificação de Madri)

1.( ) Indeterminada 2.( ) Tuberculóide 3.( ) Dimorfa 4.( ) Virchowiana 88.( ) Não se Aplica 77.( ) Não informado

48. Classificação Operacional baseado no exame clínico:

1.( ) Paucibacilar 2.( ) Multibacilar 88.( ) Não se Aplica 77.( ) Não informado

49. Grau de Incapacidade Física:

1.( ) Grau Zero 2.( ) Grau 1 3.( ) Grau 2 77.( ) Não se Aplica

50. Avaliação Concluída: 1.( ) Sim      0.( ) Não

Se não concluída, por quê?

Observações: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

51.Classificação:    1.( ) Caso Confirmado    2.( ) Contato Domiciliar    3.( ) Controle

## APÊNDICE B - Parecer consubstanciado do CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** HANSENÍASE, PARASITÓSES E DEFICIÊNCIA DE MICRONUTRIENTES: NOVOS PARADIGMAS PARA COMBATER UMA DOENÇA ANTIGA

**Pesquisador:** Lucia Alves de Oliveira Fraga

**Área Temática:**

**Versão:** 7

**CAAE:** 58863018.6.1001.5147

**Instituição Proponente:** Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF

**Patrocinador Principal:** Faculdade da Saúde e Ecologia Humana - FASEH  
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.847.697

#### Apresentação do Projeto:

Apresentação do projeto está clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, estando de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 468/12 de 2012, item III.

#### Objetivo da Pesquisa:

Estudar a correlação entre hanseníase, co-infecções parasitárias, deficiência de micronutrientes e fatores imunológicos/genéticos em indivíduos atendidos em unidades básicas de saúde do município de Governador Valadares e entorno. O objetivo geral deste projeto é delinear melhor o papel de co-infecções parasitárias bem como identificar as deficiências de micronutrientes, na transmissão e manifestações clínicas da hanseníase.

Os Objetivos da pesquisa estão claros bem delineados, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta, tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendido, de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013, item 3.4.1 - 4.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos deste estudo são mínimos e serão tomadas todas as precauções para minimizar quaisquer eventos adversos nos pacientes. Os maiores riscos identificados para os participantes do estudo são baciloscopia e/ou biópsia (se somente indicado pelo médico), coleta de sangue e o tempo gasto para aplicação de questionário. Todas as infecções

**Endereço:** JOSE LOURENCO KELMER S/N  
**Bairro:** SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900  
**UF:** MG **Município:** JUIZ DE FORA  
**Telefone:** (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br

## APÊNDICE C - Contribuição das variáveis para dimensão 1 e 2 na análise de PCA

Abaixo estão os gráficos referentes as variáveis que mais contribuíram para explicar a variabilidade do teste dentro das dimensões 1 e 2. As figuras 20a, 20b e 20c correspondem as variáveis que contribuíram para a análise de PCA entre o grupo co-infectado e controle negativo. Já as figuras 22a, 22b e 22c correspondem as variáveis mais expressivas da análise de PCA entre o grupo co-infectado e contato. Por último, as figuras 24a, 24b e 24c correspondem as variáveis que mais contribuíram para a análise de PCA entre o grupo co-infectado e mono-infectado.

Figura 20a

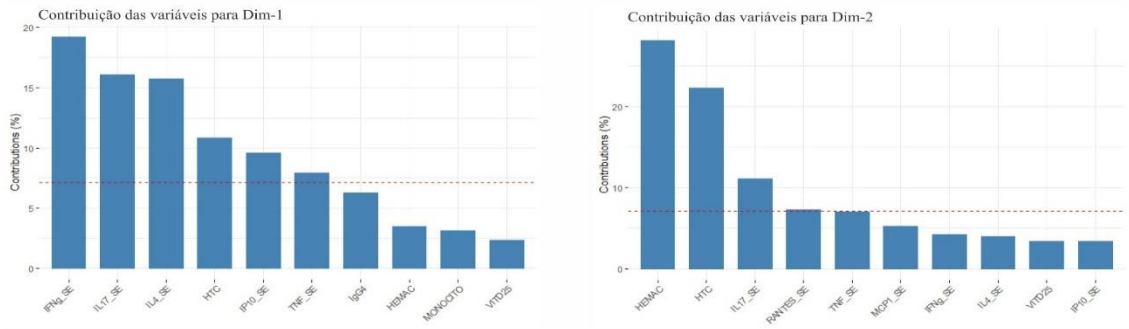


Figura 20b

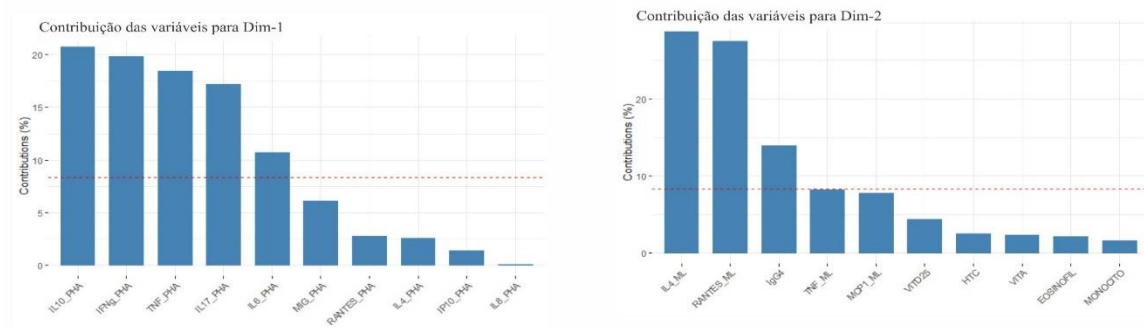


Figura 20c

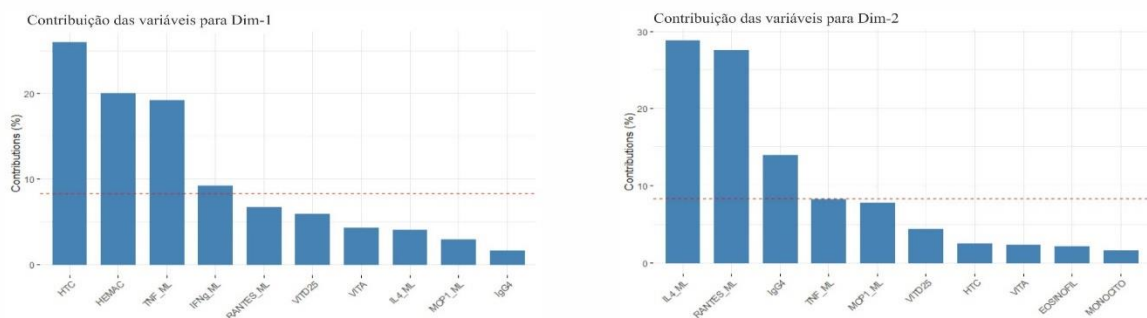


Figura 22a

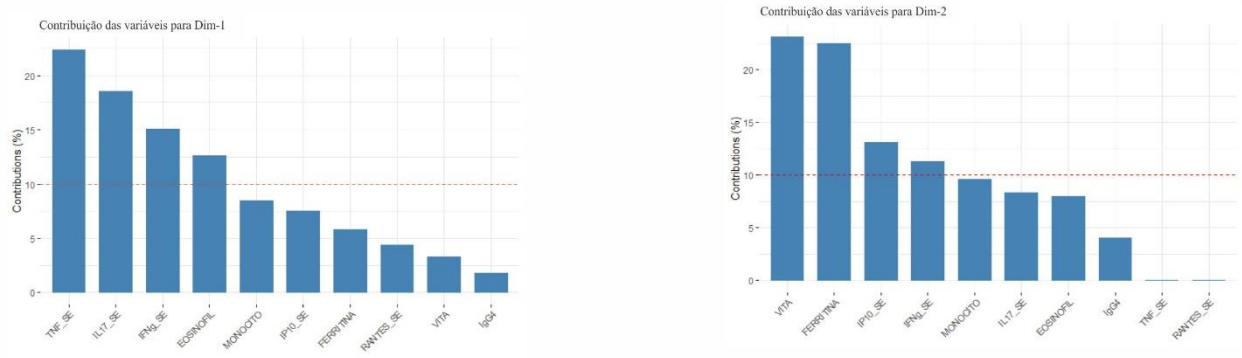


Figura 22b

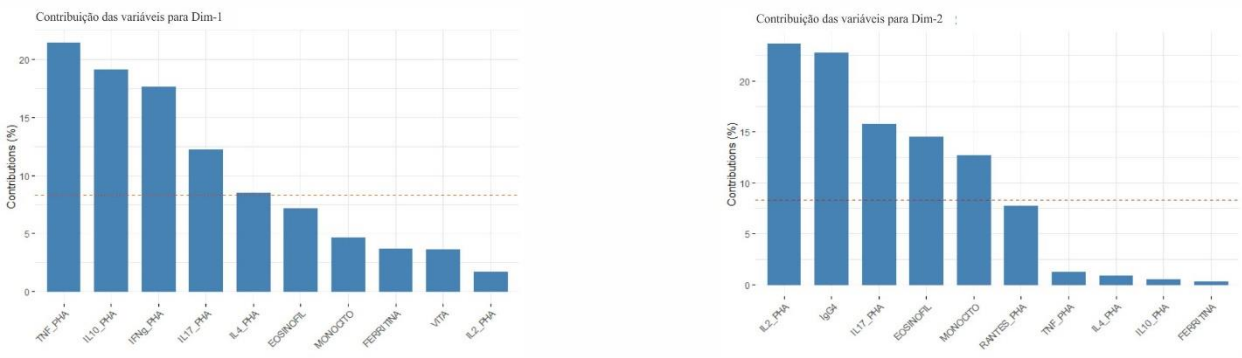


Figura 22c

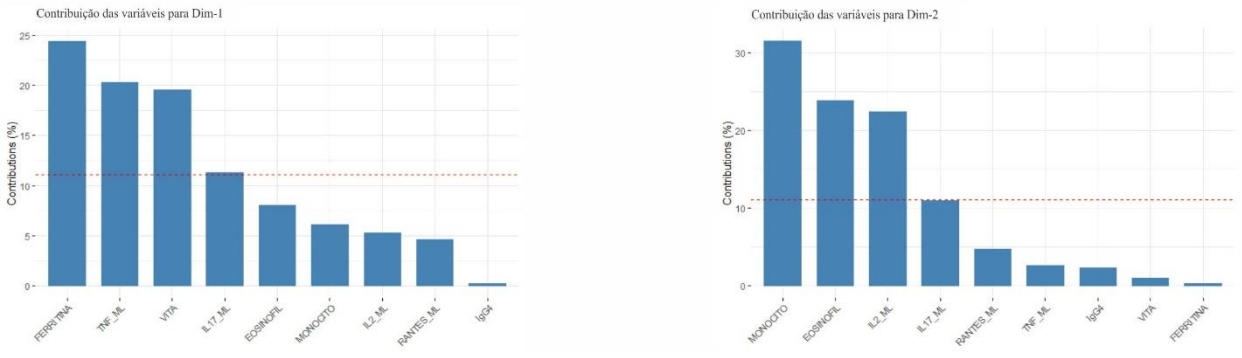


Figura 24a

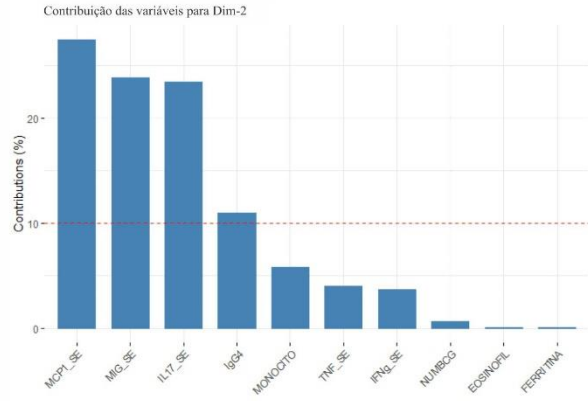
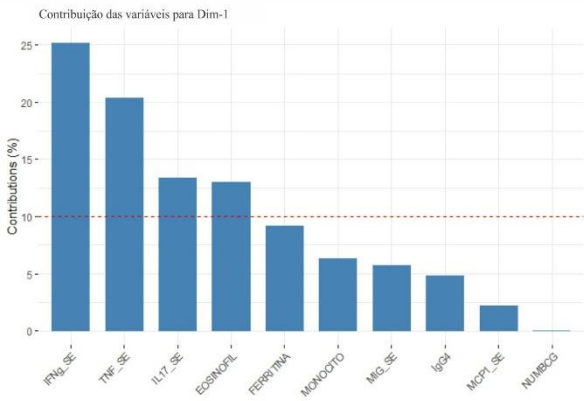


Figura 24b

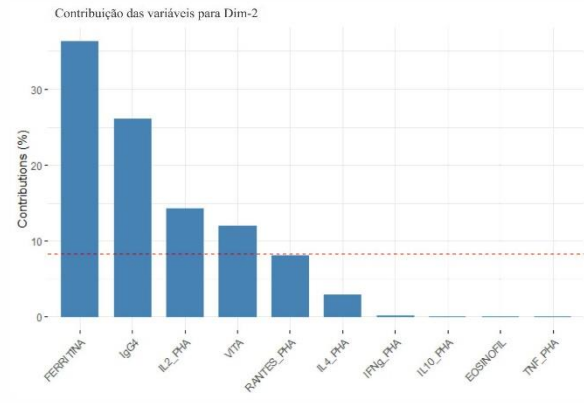
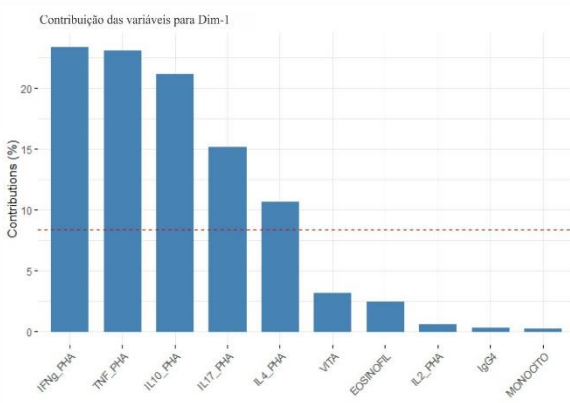
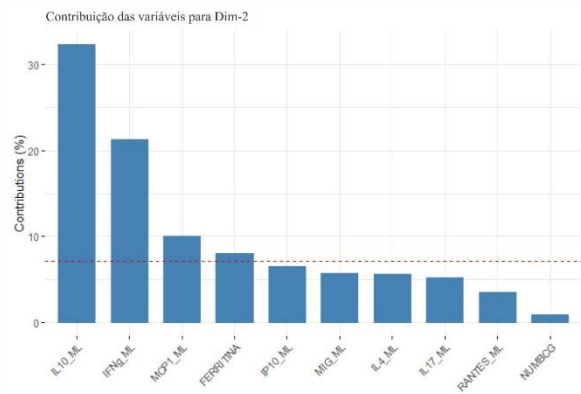
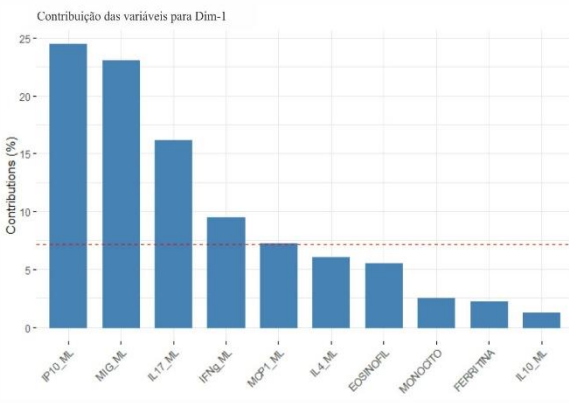


Figura 24c





## APÊNDICE D – Execução do trabalho

Laboratório de Pesquisa em Imunologia da Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE) e Laboratório Multiusuário da Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Avançado Gov. Valadares (UFJF-GV), Governador Valadares, MG.

Colaboradores:

Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Avançado Governador Valadares  
Dra. Lúcia Alves Oliveira Fraga.  
Me. Érica Barbosa Magueta e Silva.

Universidade Federal de Minas Gerais  
Dra. Ana Maria Caetano de Faria.

Emory University, Atlanta - Georgia  
Dra. Jessica K. Fairley.

Faculdade da Saúde e Ecologia Humana  
Dr. José Antônio Ferreira.

Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas René Rachou - CPqRR  
Lorena Júnia de Souza Santos.  
Dra. Andréa Teixeira de Carvalho.  
Dr. Olindo de Assis Martins Filho.

Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais - CREDEN-PES  
Médico Alexandre Castelo Branco.  
Enfermeira Regina Cypriano.

Universidade Vale do Rio Doce  
Me. Marlucy Rodrigues Lima.  
Me. Rosimary Soares Ker e Lima.

Órgãos financiadores:

Emory University, Atlanta – Georgia.  
Faculdade da Saúde e Ecologia Humana – FASEH.  
Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG.  
Universidade Vale do Rio Doce - UNIVALE.

**APÊNDICE E - Co-autoria em artigos publicados na área**

GAMA, Rafael Silva; GOMIDES, Thalisson Artur Ribeiro; GAMA, Chaiana Fróes Magalhães; MOREIRA, Suelen Justo Maria; MANTA, Fernanda Saloum de Neves, OLIVEIRA, Lorena Bruna P. de; MARÇAL, Pedro Henrique Ferreira; SARNO, Euzenir Nunes; MORAES, Milton Ozório; GARCIA, Raúl Marcel González; DE OLIVEIRA FRAGA, Lucia Alves. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2018, DOI: 10.1186/s12879-018-3056-2.

LIMA, Rosemary Soares Ker e; OLIVEIRA, Lorena Bruna Pereira de; GAMA, Rafael Silva; FERREIRA, José Antônio Guimarães; GROSSI, Maria Aparecida de Faria; FAIRLEY, Jessica K.; SILVA, Fernanda Gomes da; DE OLIVEIRA FRAGA, Lucia Alves. A importância da busca ativa como estratégia de controle da hanseníase em territórios endêmicos. **Hansenologia Internationalis**, p. 55-63, 2016.  
ARTIGO SUBMETIDO: 29/4/2017. ARTIGO APROVADO: 28/3/2018.

## APÊNDICE F – Participação em eventos científicos

1) II Congresso Internacional de Promoción de la Salud. Palácio de Convenções de Havana, Cuba. Abril/2016.

TÍTULO: Aplicación del genograma en familias con casos de hanseníasis en el este de minas gerais- brasil para auxiliar en la caracterización sociodemográfica y clínica.

2) Treinamento Técnico Científico. Julho/2016- University of California (UCSD), San Diego/USA.

LABORATÓRIO: Dr. Conor Caffrey.

3) 16<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Melbourne, Australia. Agosto/2016.

TÍTULO: Immune response to *Mycobacterium leprae*: potential application for leprosy Diagnosis. A-769-0020-01724.

4) 19<sup>th</sup> International Leprosy Congress (ILC). Pequim, China. Setembro/2016.

TÍTULO: (Abstract 01) Genogram application in families with leprosy cases in eastern of Minas Gerais Brazil for assist in socio-demographic and clinical characterization.

TÍTULO: (Abstract 02) Immunological response to *Mycobacterium leprae*: potential application for leprosy diagnosis.

TÍTULO: (Abstract 03) Regulatory B cells in patients with leprosy and in household contacts.

5) XLI International Congress of the Brazilian Society of Immunology (SBI). Immuno 2016. Campos do Jordão. Outubro/2016.

TÍTULO: (Abstract 01) Regulatory B cells in patients with leprosy and in household contacts.

TÍTULO: (Abstract 02) Immunological response to *Mycobacterium leprae*: potential application for leprosy diagnosis.

6) Mostra de Pesquisa e extensão. Semana de Ciência tecnologia e Sociedade. UFJF/GV. Novembro/2016.

TÍTULO: Aspectos da transmissibilidade da hanseníase no município de Governador Valadares.

7) Workshop em Hanseníase UFJF/GV. Junho/2016.

ABERTURA: Profa. Lucia Alves de Oliveira Fraga (Organizadora).

APRESENTAÇÕES:

a) Rafael Silva Gama –Doutorando /UFJF-JF - Aspectos do diagnostico molecular.

b) Pedro Henrique F Marçal- Doutorando /UFJF-JF-Aspectos do diagnostico sorológico.

c) Lorena Bruna P de Oliveira- Doutorando /UFJF/GV- Aspectos da imunoregulação.

d) Médica Katiuscia Ramalho - Me/Univale/SMS – Aspectos epidemiológicos.

e) Enfermeira: Profa Flavia Me/CREDENPES/-Aspectos sociais.

f) Jessica Stephens: Emory University/Atlanta/USA.

g) Laura de Mondesert: Emory University /Atlanta/USA.

8) Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (Sbbq). Julho/2017.

Título: Risk factors for leprosy.

9) Sociedade Brasileira de Hansenologia (SBH). Belém/Pará. Novembro/2018.

TÍTULO: Experiência exitosa: busca ativa de pacientes com hanseníase em zona rural.

10) American Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). EUA. November/2018.

TÍTULO: Exploring poverty-related risk factors for leprosy transmission in a highly endemic area of Brazil: Focus on helminth co-infections.

11) Sociedade Brasileira de Hansenologia (SBH). Palmas. Novembro/2018.

TÍTULO: Explorando os fatores de risco relacionados à pobreza da transmissão da hanseníase em uma área altamente endêmica do Brasil.

12) Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (Sbbq). Maio/2019.

Título: Identification of immunological, nutritional, parasitological/serological parameters in a casecontrol study associated with leprosy.