

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

**Heloine Martins Leite**

**Marcadores imunológicos para detecção de hanseníase subclínica: resposta  
imune aos antígenos LID-1 e PGL-1**

Governador Valadares  
2024

**Heloine Martins Leite**

**Marcadores imunológicos para detecção de hanseníase subclínica:  
resposta imune aos antígenos LID-1 e PGL-1**

Defesa de doutorado 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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga  
Co-Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Ferreira Marçal

Governador Valadares  
2024

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

Leite, Heloíne Martins .

Marcadores imunológicos para detecção de hanseníase subclínica : resposta imune aos antígenos LID-1 e PGL-1 / Heloíne Martins Leite. -- 2024.  
126 f.

Orientadora: Lucia Alves de Oliveira Fraga

Coorientador: Pedro Henrique Ferreira Marçal

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

1. Hanseníase. 2. Biomarcadores imunológicos. 3. LID-1. 4. PGL-1. I. Fraga, Lucia Alves de Oliveira, orient. II. Marçal, Pedro Henrique Ferreira, coorient. III. Título.

**Heloine Martins Leite**

**Marcadores imunológicos para detecção de hanseníase subclínica:** resposta imune aos antígenos LID -1 e PGL-1.

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 20 de novembro de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga** - Orientadora e presidente da banca

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Pedro Henrique Ferreira Marçal** - Coorientador

Universidade Vale do Rio Doce

**Prof. Dr. Caio César de Souza Alves**

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

**Profa. Dra. Maria Aparecida de Faria Grossi**

SES/UFMG

**Profa. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro**

Universidade Federal de Juiz de Fora

**Profa. Dra. Gabriella Freitas Ferreira**

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 17/10/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Lucia Alves de Oliveira Fraga, Professor(a)**, em 20/11/2024, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriella Freitas Ferreira, Professor(a)**, em 21/11/2024, às 08:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida de Faria Grossi, Usuário Externo**, em 21/11/2024, às 08:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio César de Souza Alves, Usuário Externo**, em 21/11/2024, às 08:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, Usuário Externo**, em 21/11/2024, às 12:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **PEDRO HENRIQUE FERREIRA MARCAL, Usuário Externo**, em 21/11/2024, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2048473** e o código CRC **6B38BE62**.

À minha família pelo apoio incondicional,  
em especial, ao Cristian pelo amor e compreensão  
e ao meu querido filho(a), cuja presença sempre estará em  
meu coração, e à minha amada filha Mila,  
fonte constante de força e inspiração.  
Vocês são a razão pela qual sigo em frente.

## AGRADECIMENTOS

[...]Obrigado, Senhor!

Porque eu nasci!

Obrigado porque creio em Ti.

Pelo teu amor, obrigado, Senhor!"

Poema de Gratidão - Amélia Rodrigues (Divaldo Pereira Franco).

Me lembro de quando decidi fazer o doutorado. Pensei silenciosamente: "Será que é possível ser mãe, esposa, filha, irmã, professora e ainda encarar mais esse desejo do meu coração?" Muitas vezes, a resposta foi não; outras, foi apenas de forma mediana; mas, em alguns momentos, consegui de maneira brilhante. Isso porque sempre tive ao meu lado pessoas que me deram apoio e, acima de tudo, amor.

A jornada do doutorado foi um período de muitos desafios, que me proporcionaram muito mais do que conhecimento científico: me trouxeram evolução pessoal. Hoje, olho para trás e vejo o quanto cresci e evoluí.

Por isso, começo agradecendo à minha amada filha Mila, meu arco-íris, minha maior fonte de força e inspiração. Minha cacheada, o verdadeiro amor da minha vida.

Ao meu amor e melhor amigo, Cristian, por estar ao meu lado em todos os momentos. Sem você, eu não teria chegado até aqui. Minha fortaleza, meu aconchego, sou eternamente grata pelo pai dedicado e amoroso que você é. (...) "Se você vier, pro que der e vier, comigo. Eu te prometo o sol, se hoje o sol sair, ou a chuva, se a chuva cair. Se você vier, até onde a gente chegar, numa praça, na beira do mar, num pedaço de qualquer lugar (...). Esse tanto, esse tão grande amor (...) se você quiser e vier, pro que der e vier, comigo. Comigo!" (Dia Branco – Geraldo Azevedo).

Aos meus pais, Paulinho e Zita, pelo amor, apoio e dedicação incondicional ao longo de minha vida. Não há palavras suficientes para expressar minha gratidão por tudo o que fizeram por mim. Vocês foram, e sempre serão, minha base e minha inspiração. Agradeço pelo incentivo constante, pela paciência e por sempre acreditarem em mim.

Às minhas lindas irmãs Pauline e Ellen, presentes de Deus em minha vida. Obrigada por serem minhas melhores amigas. Unidas, sempre fomos e

continuaremos a ir além do que um dia sonhamos. Nossa relação é marcada por união, amor e cumplicidade, e por isso sou imensamente grata.

Aos meus cunhados, Alenoir e Cristiano, verdadeiros irmãos que a vida me presenteou. Aos meus sobrinhos, Thais, Kadu e Luka, cada abraço de vocês foi uma fonte inesgotável de amor.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Lúcia Alves de Oliveira Fraga, um exemplo de dedicação à pesquisa. Agradeço por acreditar em meu potencial e por estar ao meu lado em todos os momentos. Sou profundamente grata pelo apoio constante e, especialmente, pela orientação de altíssima qualidade.

Ao meu coorientador, Dr. Pedro Marçal, que desde o início se dedicou para garantir a qualidade desta pesquisa. Sou imensamente grata por todos os ensinamentos e contribuições valiosas. Agradeço também à sua família pelo carinho e acolhimento nos EUA. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – UFJF/campus GV.

Ao grupo de pesquisa NuPqHans/UFJF, especialmente à Daisy e à Karol, pelo companheirismo nos longos finais de semana de processamento de material no laboratório, e pela amizade, que tornaram essa trajetória ainda mais doce.

Aos colegas de trabalho da Universidade Vale do Rio Doce - UNIVALE, por compartilharem da minha alegria na concretização de mais essa etapa na minha vida.

À equipe de saúde do CREDEN-PES, pelo acompanhamento dos pacientes.

Aos participantes do estudo, que cederam amostras biológicas para a realização dos testes.

À Universidade Emory, pela parceria e apoio.

Ao CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) dos EUA, pela colaboração e doação dos antígenos utilizados neste estudo.

À CAPES, ao CNPq, à FAPEMIG e ao NIH, pelo suporte financeiro fornecido ao projeto.

## RESUMO

A hanseníase é uma doença negligenciada, de evolução lenta e com formas clínicas muito diversas, tornando o diagnóstico difícil e ainda muitas vezes inconclusivo e tardio, permitindo o desenvolvimento de incapacidades e deformidades nos pacientes. Esta doença antiga e estigmatizante apresentou em 2021, 140.594 casos novos no mundo, e o Brasil ocupa o segundo lugar. As ações de controle baseiam-se no diagnóstico, tratamento e vigilância dos contatos. No entanto, esta doença requer abordagens mais inovadoras para um controle absoluto. Dessa forma, propõe-se definir biomarcadores imunológicos para detecção de hanseníase subclínica, utilizando os antígenos LID-1 e PGL-1. Este estudo foi realizado em larga escala por meio de um ensaio multiplex com esferas denominado (MBA-*Multiplex Beaded Assay* e Teste Rápido anti-PGL-1) para avaliar aspectos imunológicos nas comunidades investigadas. Foi possível monitorar prospectivamente os grupos estudados quanto à presença de anticorpos sorológicos anti-LID-1 e anti-PGL-1. Bem como, investigar outros biomarcadores por meio da análise de citocinas e quimiocinas pela técnica de citometria de fluxo, em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) *in vitro*. O desenho deste projeto permitiu uma abordagem avançada para estudar o perfil imunológico de indivíduos expostos à hanseníase residentes em áreas consideradas hiperendêmicas no Leste de Minas. Neste estudo foram selecionados 1.200 indivíduos, dos quais 79 testaram positivo para LID-1 [LID-1 (+)] e do restante selecionou-se 76 indivíduos [LID-1(-)] com pareamento considerando sexo e idade. O teste PGL-1 mostrou que 47 indivíduos apresentaram resultado positivo [PGL-1 (+)], enquanto que 104 tiveram resultado negativo [PGL-1 (-)]. Os resultados demonstraram que o grupo LID-1 (+) apresentou uma resposta inflamatória acentuada, com níveis elevados de IFN- $\gamma$  e CXCL10. Além disso, o grupo PGL-1 (-) mostrou um aumento de CXCL10 associado a uma resposta inflamatória moderada. Na análise integrada dos grupos, LID-1 (+) vs PGL-1 (-) verificou-se um perfil inflamatório mais intenso com aumento de IFN- $\gamma$ , CXCL10, TNF, IL-17 e IL-2. Esses achados enfatizam o papel de mediadores imunológicos como CXCL10, IFN- $\gamma$  e TNF, e destacam a relevância de ensaios multiplex na detecção de perfis TNF imunológicos específicos. O estudo contribui para o desenvolvimento de métodos diagnósticos aprimorados que, ao serem validados, podem fortalecer a vigilância epidemiológica e o manejo clínico da hanseníase em regiões de alta endemicidade.

**Palavras-chave:** hanseníase; biomarcadores imunológicos; LID-1; PGL-1.

## ABSTRACT

Leprosy is a neglected, slow-progressing disease with highly diverse clinical forms, making diagnosis challenging and often inconclusive or delayed, allowing the development of disabilities and deformities in patients. This ancient and stigmatizing disease recorded 140,594 new cases globally in 2021, with Brazil ranking second. Control measures are based on diagnosis, treatment, and contact surveillance. However, this disease requires more innovative approaches for complete control. Therefore, this study proposes to define immunological biomarkers for detecting subclinical leprosy using the antigens LID-1 and PGL-1. The study was conducted on a large scale through a bead-based multiplex assay (MBA-Multiplex Beaded Assay and Rapid Test for anti-PGL-1) to evaluate immunological aspects within the investigated communities. The study allowed for the prospective monitoring of the groups based on the presence of anti-LID-1 and anti-PGL-1 serological antibodies, as well as examining other biomarkers through the analysis of cytokines and chemokines via flow cytometry in the supernatant of *in vitro* peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures. This project design enabled an advanced approach to studying the immune profile of individuals exposed to leprosy who reside in hyperendemic areas in Eastern Minas Gerais, Brazil. In this study, 1,200 individuals were selected, 79 of whom tested positive for LID-1 [LID-1 (+)]; 76 LID-1(-) individuals matched by sex and age were selected from the remainder. The PGL-1 test showed 47 individuals with positive results [PGL-1 (+)] and 104 with negative results [PGL-1 (-)]. Results demonstrated that the LID-1 (+) group exhibited a heightened inflammatory response with elevated levels of IFN- $\gamma$  and CXCL10. The PGL-1 (-) group also showed increased CXCL10 associated with a moderate inflammatory reaction. In the integrated analysis of the LID-1 (+) vs PGL-1 (-) groups, a more intense inflammatory profile was observed, with increased IFN- $\gamma$ , CXCL10, TNF, IL-17, and IL-2. These findings highlight the role of immune mediators such as CXCL10, IFN- $\gamma$ , and TNF and underscore the relevance of multiplex assays in detecting specific immune profiles. The study contributes to developing improved diagnostic methods, which, once validated, could strengthen epidemiological surveillance and clinical management of leprosy in high-endemicity regions.

**Keywords:** leprosy; immunological biomarkers; LID-1; PGL-1.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Proporção de casos de hanseníase segundo o modo de entrada – Brasil, 2013 a 2022 .....	22
<b>Figura 2</b> - Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley e Jopling. ....	23
<b>Figura 3</b> - Paradigma imunológico da resposta T helper (Th) 1/Th2 nas formas polares da hanseníase .....	29
<b>Figura 4</b> - Estrutura das quimiocinas .....	31
<b>Figura 5</b> - Esquema do envolvimento dos participantes e desenho do estudo. ....	38
<b>Figura 6</b> - Protocolo de Coleta, Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs) e Ensaio CBA. ....	43
<b>Figura 7</b> - Secreção de quimiocinas e citocinas por Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) dos indivíduos dos grupos LID-1 (-) e LID-1 (+) após cultura in vitro. ....	52
<b>Figura 8</b> - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos LID-1 (-) e LID-1(+). – Gráfico de Barras Circulares / Diagrama de Venn. ....	54
<b>Figura 9</b> - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos LID-1 (-) e LID-1(+). – Volcano Plot.....	55
<b>Figura 10</b> - Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+).....	57
<b>Figura 11</b> - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+) por meio de avaliação quantitativa e qualitativa.....	59
<b>Figura 12</b> - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+) por meio de análises de Redes.....	61
<b>Figura 13</b> - Secreção de quimiocinas e citocinas por Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) dos indivíduos dos grupos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) após cultura in vitro. ....	63
<b>Figura 14</b> - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos	

PGL-1 (-) e PGL-1(+) – Gráfico de Barras Circulares / Diagrama de Venn. .....	65
<b>Figura 15</b> - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos PGL-1 (-) e PGL-1(+) – Volcano Plot / Fold change e Delta.....	67
<b>Figura 16</b> - Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos PGL-1 (-) e PGL-1 (+).....	69
<b>Figura 17</b> - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) por meio de avaliação quantitativa e qualitativa.....	71
<b>Figura 18</b> - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) por meio de análises de Redes.....	73
<b>Figura 19</b> - Secreção de quimiocinas e citocinas por Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) dos grupos de indivíduos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+PGL1(-) e LID1(+PGL1(+ após cultura in vitro. .....	75
<b>Figura 20</b> - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos grupos de indivíduos para LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+PGL1(-) e LID1(+PGL1(+ – Curva Ascendente / Diagrama de Venn. ....	78
<b>Figura 21</b> - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+PGL1(-), LID1(+PGL1(+ – Volcano Plot/ Fold change. ....	80
<b>Figura 22</b> - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+PGL1(-), LID1(+PGL1(+ – Volcano/ Delta.....	82
<b>Figura 23 A</b> - Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID1 vs PGL1.....	85
<b>Figura 23 B</b> - Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID1 vs PGL1.....	85

<b>Figura 24</b> - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+)PGL1(-) e LID1(+)PGL1(+) por meio de análises de Redes. ....	88
<b>Figura 25</b> - Visão Integrada .....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B: Borderline

BB Borderline borderline

BL: Borderline lepromatoso

BT: Borderline tuberculoide

BAAR: Bacilo Álcool-Ácido Resistente.

CBA: Cytometric Bead Array.

CCL2/MCP-1: *Monocyte chemoattractant protein*.

CCL2: Quimiocina C-C ligante-2

CCL5/RANTES: *Chemokine (C-C motif) ligand 5*.

CREDEN-PES: Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais.

CSF: Fator Estimulador de Colônias

CXCL10/IP-10: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 10/Interferon Gamma-Induced Protein 10*.

CXCL8/IL-8: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 8/Interleucina-8*.

CXCL9/MIG: *Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (CXCL9) /Monokine induced by gamma interferon*.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

ENH: Eritema Nodoso Hansênico.

ESF: Estratégia de Saúde da Família

I: Indeterminado

IB: Índice Baciloscópico.

IDRI: *Infectious Disease Research Institute*

IFN- $\gamma$ : Interferon-gama.

IFN: Interferon

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL: Interleucina

IL-1: Interleucina-1

IL-2: Interleucina-2  
IL-4: Interleucina-4  
IL-5: Interleucina-5  
IL-6: Interleucina-6  
IL-9: Interleucina-9  
IL-10: Interleucina-10  
IL-12: Interleucina-12  
IL-15: Interleucina-15  
IL-17: Interleucina-17  
IL-17A: Interleucina-17A  
IL-21: Interleucina-21  
IL-22: Interleucina-22  
IL-23: Interleucina-23  
IP-10: *Interferon Gamma-Induced Protein 10*  
L: Lepromatoso  
LID-1: *Leprosy Infectious Disease Research Institute Diagnostic-1*  
LL: Lepra Lepromatoso.  
MB: Multibacilar.  
MCP-1: proteína quimiotática de macrófago-1  
ML: *Mycobacterium leprae*  
NDO: *natural octyl disaccharide*  
NuPqHans: Núcleo de Pesquisa em Hansenologia.  
OMS: Organização Mundial de Saúde.  
PB: Paucibacilar.  
PBMC: Células Mononucleares Do Sangue Periférico  
PBS: Tampão fosfato salino.  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*).  
PGL-1: Glicolípídeo fenólico-1.  
PQT: Poliquimioterapia.  
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*).  
RPM: Rotações Por Minuto  
RR: Reação reversa

SFB: Soro Fetal Bovino  
SUS: Sistema Único de Saúde.  
T: Tuberculóide  
T1R: Reações Hansênicas do Tipo I  
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.  
TCR: Receptor de célula T  
TGF: fator de transformação de crescimento  
TGF- $\beta$ : Fator de transformação de crescimento- $\beta$   
Th1: linfócitos T *helper*  
TLR: Receptor do tipo *Toll*.  
TNF: Fator de Necrose Tumoral  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa  
Treg: Células T reguladoras.  
TT: Tuberculoide-Tuberculóide  
UFJF: Universidade federal de Juiz de Fora  
Vs: Versus

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$ : Letra grega minúscula Alfa

$\beta$ : Letra grega minúscula Beta

$\gamma$ : Letra grega minúscula Gama

m: Letra arábica minúscula *Eme* que representa o prefixo mili, equivalente a  $10^{-3}$

$\mu$ : Letra grega minúscula *Mi* que representa o prefixo micro, equivalente a  $10^{-6}$

$\eta$ : Letra grega minúscula *Eta* que representa o prefixo nano, equivalente a  $10^{-9}$ .

$\chi$ : Letra grega minúscula *Qui*

k: Letra arábica minúscula *Ka* que representa o prefixo kilo, equivalente a  $10^3$

Da: Representação de unidade de massa atômica: Dalton

g: Letra arábica minúscula *Gê* que representa uma unidade de massa: grama

M: Letra arábica maiúscula *Eme* que representa a quantidade de matéria do soluto por litro da solução: mol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1 EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS FORMAS CLÍNICAS.....	22
2.3 TRANSMISSÃO E DIAGNÓSTICO .....	24
2.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA HANSENÍASE.....	26
2.4.1 Imunidade inata .....	26
2.4.2 Imunidade Adquirida - Celular e Humoral .....	27
2.4.3 Citocinas e quimiocinas .....	30
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>4 OBJETIVO GERAL</b> .....	36
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>5 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	37
5.1 DESENHO DO ESTUDO .....	37
5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	38
5.3 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) .....	39
5.4 CONFIDENCIALIDADE.....	39
5.5 ENSAIO DE MULTIPLEX <i>BEADED ASSAY</i> (MBA) PARA ANTICORPO ANTI-LID1 .....	40
5.6 ESTUDOS IMUNOLÓGICOS.....	40
5.7 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTES DE CULTURA DE PBMC .....	41
5.8 ANTÍGENO.....	42
5.9 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS EM SOBRENADANTES DE CULTURAS DE PBMC <i>in vitro</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
5.10 TESTE SOROLÓGICO DE FLUXO LATERAL (ML <i>FLOW</i> / PGL-1).....	43
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	44
5.11.1 Análise Estatística.....	44
5.11.2 Análise convencional.....	45
5.11.3 Análise de assinatura de citocinas e quimiocinas .....	45
5.11.4 Diagrama de Venn .....	46
5.11.5 Volcano plot.....	47

<b>5.11.6 Análises de redes</b> .....	48
<b>6 RESULTADOS</b> .....	50
6.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO .....	50
6.2 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCIAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS LID-1 (-) E LID-1 (+) APÓS CULTURA <i>in vitro</i> .....	51
6.3 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCIAS E CITOCINAS SECRETADAS POR PBMC DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS LID-1 (-) E LID-1 (+) APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> .....	53
6.4 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCIAS E CITOCINAS SECRETADAS POR PBMC DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS LID-1 (-) E LID-1 (+) APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> . COMPARAÇÃO DAS ASSINATURAS ENTRE GRUPOS - CURVA ROC .....	56
<b>6.4.1 Resultados das redes.</b> .....	59
6.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCIAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS PGL (-) E PGL (+) APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> .....	62
6.6 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCIAS E CITOCINAS SECRETADAS POR PBMC DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS PGL-1 (-) E PGL-1 (+) APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> .....	64
6.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCIAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS GRUPOS INDIVÍDUOS LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+PGL1(-) e LID1(+PGL1(+) APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> .....	74
6.8 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCIAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS Grupos INDIVÍDUOS LID-1(-)PGL-1(-), LID-1(-)PGL-1(+), LID-1(+PGL-1(-) e LID- 1(+PGL-1(+ APÓS CULTURA <i>IN VITRO</i> . .....	76
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	90
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	94
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96
<b>ANEXO A – Questionário sociodemográfico</b> .....	109
<b>ANEXO B – Questionário com aspectos clínicos</b> .....	115
<b>ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido</b> .....	118

## 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, infectando, preferencialmente, macrófagos e células de *Schwann* (Harboe, 1994). O tropismo específico pelas células de *Schwann* pode ser explicado pela ligação à laminina 2 que compõe a lâmina basal destas células, sendo, portanto, esta forma restrita aos nervos periféricos (Rambukkana *et al.*, 1997).

Muitos países incluindo o Brasil têm bolsões de hanseníase “hiperendêmicos” com > 40 casos novos/100.000 pessoas por ano (Barreto *et al.*, 2014), sendo que a verdadeira carga de infecção tem sido grosseiramente subestimada (Barreto *et al.*, 2012).

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 (Job *et al.*, 2008; Klatser *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 2010; Shepard, 1962). Outro fator importante na transmissão da hanseníase é o tipo de forma clínica e a carga bacilar do paciente (Martins *et al.*, 2012). Vale ressaltar que o baixo poder aquisitivo também está associado à infecção, mas a maneira como esse fator contribui para transmissão é ainda desconhecido. Alguns fatores têm sido propostos e incluem superpopulação, solo contaminado e desnutrição (Cabral-Miranda; Chiaravalloti Neto; Barrozo, 2014; Feenstra *et al.*, 2011; Freitas; Duarte; Garcia, 2014). As infecções por helmintos são predominantemente relacionadas à pobreza e condições sanitárias afetando cerca de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo (World Health Organization, 2012). 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 pode dar suporte a essa hipótese e apoiar mais estudos e expandir estratégias de controle (Feenstra *et al.*, 2011).

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 (Cunha *et al.*, 2023; Sapkota *et al.*, 2010; Schreuder; Noto; Richardus, 2016; White; Franco-Paredes, 2015)

Quando se trata de diagnóstico é possível afirmar que existe uma clara necessidade de novos testes com valores mais acessíveis, altamente específicos e sensíveis que sejam capazes de detectar infecção subclínica e, que poderiam ser utilizados 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 testes sorológicos têm mostrado ser uma boa ferramenta para diagnosticar infecções subclínicas, infecções ativas ou passadas, representando um meio eficaz de vigilância que permite o monitoramento da cobertura vacinal, a identificação de doenças infecciosas emergentes e a avaliação da eficácia de programas de controle de doenças infecciosas (Amorim *et al.*, 2016; Oguttu *et al.*, 2014). Além disso, torna-se um componente fundamental do controle da doença, uma vez que permite identificar os indivíduos em risco de adquirir hanseníase nas comunidades. Assim, o uso da sorologia pode ser significativamente importante para a vigilância.

Para a hanseníase, recentes avanços no desenvolvimento de ensaios sorológicos contra antígenos específicos, como o glicolípido fenólico-1 (PGL-1) e o (LID-1) disponibilizado pela IDRI Diagnostic têm ocorrido. Esses ensaios têm contribuído para uma melhor compreensão do risco de infecção em contatos domiciliares (Cooley *et al.*, 2016; Duvall *et al.*, 2014; O'Hearn *et al.*, 2016).

O (LID-1) é uma fusão de duas proteínas recombinantes conhecidas do *M. leprae* (ML0405/ML2331) desenvolvido pelo Instituto de Pesquisa de Doenças Infecciosas (IDRI/Seattle, EUA). Duthie *et al.*, (2014) demonstraram que o teste para a maioria dos pacientes com hanseníase multibacilar apresentou resultado positivo. O antígeno específico do *M. leprae* foi descoberto com a purificação do glicolípido fenólico-I ou PGL I (*phenolic glycolipid-I*) da parede celular e o reconhecimento de seu açúcar terminal, que é o alvo para anticorpos IgM em pacientes virchowianos, como determinante imunodominante espécie-específica. O açúcar foi sintetizado e ligado diretamente a uma soroalbumina bovina ou mediante uma ligação octyl (O) ou phenyl

(P) para traduzir reação imunológica em análise de anticorpo. Ambos, PGL-I nativo e o açúcar sintético, mostraram-se capazes de reagir com IgM de modo altamente específico em pacientes com hanseníase. (Roche *et al.*, 1999). Mais recentemente Silva *et al.*, (2021) avaliaram por meio dos testes PGL-1 e RLEP a presença de infecção pelo *M. leprae* em contato de pacientes com hanseníases. Os resultados mostraram que os contatos domiciliares duplamente positivos (PGL-1 e RLEP) apresentam presença da doença latente, e estão provavelmente contribuindo para a disseminação e transmissão da doença aos seus contatos próximos.

As reatividades sorológicas contra o antígeno LID-1(IgG) bem como anti antígeno PGL-1 serão utilizadas como marcadores de infecção subclínica em nosso estudo. Diante do exposto, o presente estudo pretende caracterizar o perfil imunológico de indivíduos residentes em áreas hiperendêmicas do leste de Minas Gerais, considerando aspectos da imunidade celular e humoral.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

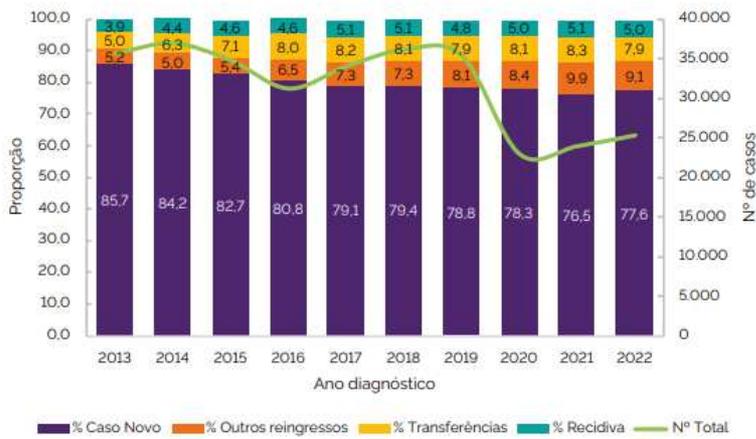
### 2.1 EPIDEMIOLOGIA

Em 2022, foram registrados 174.087 casos novos de hanseníase, correspondendo a uma taxa de detecção de 21,8 casos por 1 milhão de habitantes. Índia, Brasil e Indonésia reportaram mais de 10 mil casos novos de hanseníase cada. O Brasil permanece em segundo lugar no ranking mundial em número de casos novos, o que o classifica como um país prioritário para hanseníase pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2023).

Durante o período de 2013 a 2022 foram notificados 316.182 casos de hanseníase no País. De 2013 a 2022 houve uma redução de 28,9% no número de casos notificados. Nos anos pré-pandemia da covid-19 (2013 a 2019) houve uma redução de 0,8%. No período de 2019 a 2022, a redução foi de 28,4%. Quanto ao modo de entrada, 80,6% (n=254.918) são "casos novos"; 7,4% (n=23.432), "transferências"; 7,0% (n=22.177), "outros reingressos"; e 4,7% (n=14.926), "recidivas" (Figura 1). (Brasil, 2024).

Estudos epidemiológicos indicam que a hanseníase permanece com alta endemicidade, evidenciada pela identificação de um número expressivo de casos ocultos, frequentemente revelados durante campanhas intensivas de detecção ativa de casos em nível local (Blok; De Vlas; Richardus, 2016; De Sousa *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2013a; Leite *et al.*, 2023; Rao; Suneetha, 2018; Salgado *et al.*, 2016; 2018; Smith *et al.*, 2015)

Figura 1 - Proporção de casos de hanseníase segundo o modo de entrada – Brasil, 2013 a 2022



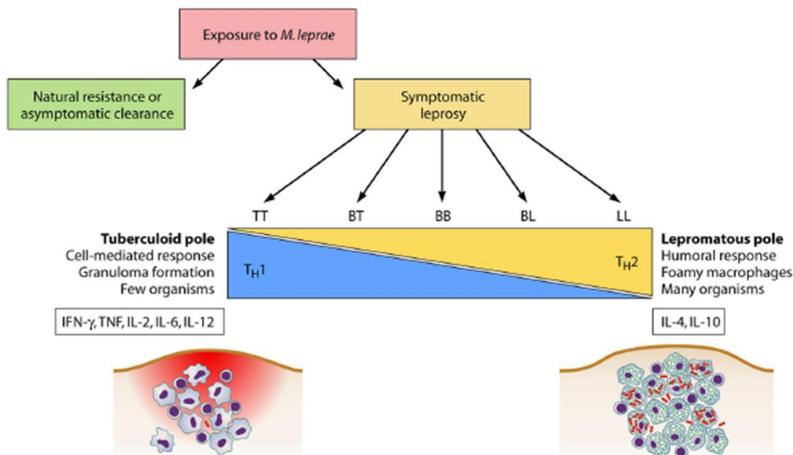
Fonte: Brasil (2024)

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS FORMAS CLÍNICAS

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). Nesse contexto, a classificação de Ridley & Joplin (1966) envolve dois polos, Tuberculóide e Lepromatoso, entre os dois polos há três formas intermediárias e dinâmicas, quanto mais próximo da forma Tuberculóide é chamada Borderline tuberculóide (BT), a mais centralizada é conhecida como Borderline borderline (BB), assemelhando-se ao polo Lepromatoso têm-se a forma Borderline lepromatoso (BL). Outra forma que pode ser observada é a hanseníase neural pura, que pode não acometer a pele e apresenta-se com raros bacilos, mesmo em biópsia de nervo (Cunha, *et al.*, 2006; Hungria *et al.*, 2016; Tiwari, *et al.*, 2017). O espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Joplin (1966) está ilustrado na Figura 2. No polo tuberculóide, o hospedeiro apresenta uma boa resposta imune celular ao *M. leprae* formando granulomas epitelioides e secretando citocinas pró inflamatórias, combatendo eficientemente a infecção. Neste

polo há um pequeno número de bacilos presentes nas lesões. Já os pacientes do polo lepromatoso apresentam uma resposta imune do tipo humoral e secreção de citocinas anti-inflamatórias. Neste polo há intensa proliferação bacilar e múltiplas lesões com a presença de macrófagos espumosos repletos de bacilos em seu interior. Os pacientes “borderline” apresentam características intermediárias, aproximando-se mais de um polo ou outro de acordo com seu perfil de resposta imunológica ao *M. leprae*. (Misch, et. al., 2010).

Figura 2 - Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley e Jopling.



Fonte: Adaptado de Misch *et. al.* (2010).

**Figura 2:** As formas clínicas da hanseníase apresentam dois pólos, polo tuberculóide (TT) e polo lepromatoso (LL), com as diferentes formas intermediárias “borderline tuberculóide” (BT), “borderline borderline” (BB) e “borderline lepromatosa” (BL). O padrão de resposta Th1 é observado nas formas TT, BT e BB, apresentando características pró-inflamatórias, onde IFN- $\gamma$  ativa os macrófagos (imunidade celular) levando a diminuição da carga bacilar e formação de granulomas. As formas LL e BL exibem um padrão de resposta Th2, com características anti-inflamatórias levando a produção de anticorpos (imunidade humoral) apresentando alta carga bacilar e formação de macrófagos espumosos.

Em 1982, a Organização Mundial da Saúde (OMS), instituiu as normas para operacionalização do tratamento da doença. Com isso, estabeleceu-se a classificação operacional de acordo com os seguintes parâmetros: pacientes apresentando até 05 (cinco) lesões de pele é classificado como Paucibacilar (PB) e tendo 05 (cinco) ou

mais lesões de pele como Multibacilar (MB). O intuito da classificação operacional é nortear o tratamento com a Poliquimioterapia (PQT). A baciloscopia auxilia no processo desta classificação, onde um resultado positivo indica paciente MB, no entanto baciloscopia negativa não descarta a possibilidade de hanseníase (Brasil, 2016).

Vale ressaltar que cerca de 95% dos indivíduos expostos ao *M. leprae* são resistentes à infecção ou a eliminam sem sintomas. Entretanto, 5% restantes poderá desenvolver a doença em uma das formas clínicas dependendo da capacidade de resposta imune mediada por células aos antígenos do *M. leprae* (Gonçalves, 2013).

### 2.3 TRANSMISSÃO E DIAGNÓSTICO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica e transmissível que persiste como um importante problema de saúde pública no Brasil. A Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs uma nova estratégia global focada na interrupção da transmissão e na eliminação dos casos autóctones, com o objetivo de alcançar "zero hanseníase" — ou seja, zero infecções, zero incapacidades, e zero estigmatização e discriminação associadas (World Health Organization, 2021b).

A transmissão da hanseníase ocorre, predominantemente, por contato próximo e prolongado entre um indivíduo suscetível e um paciente infectado pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, geralmente por meio da inalação de bacilos presentes na secreção nasal do infectado. A mucosa nasal é considerada a principal via de transmissão (Job *et al.*, 2008; Klatser *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 2010; Shepard, 1962). A proximidade contínua com um paciente sem tratamento é o principal fator de risco para a transmissão da hanseníase, abrangendo não apenas contatos domiciliares, mas também vizinhos e indivíduos com relações sociais próximas. Estudos indicam que a maioria dos novos casos ocorre entre indivíduos com histórico de exposição a pacientes sem tratamento (Douglas *et al.*, 2004; Moet *et al.*, 2006).

Aspectos socioeconômicos e demográficos, como pobreza, baixo nível de acesso à informação e precárias condições de vida, também estão associados à prevalência da hanseníase, conforme indicado por Sousa *et al.* (2020), utilizando o teste ML *Flow*.

O diagnóstico da hanseníase deve ser baseado, essencialmente, no quadro clínico. Quando disponíveis, de qualidade e confiáveis, os exames subsidiários

(baciloscopia e biópsia de pele) podem ser feitos. Na interpretação dos resultados desses exames, especialmente a baciloscopia, os resultados devem ser correlacionados com a clínica, pois hoje ainda há muitas dificuldades e erros no processo de coleta, fixação, envio, coloração, e mesmo na leitura de lâminas de baciloscopia ou biópsia. (World Health Organization, 2017). Identificam a doença apenas em estágios avançados e não permitem o diagnóstico de infecção subclínica. Além disso, a baciloscopia é invasiva e possui baixa sensibilidade para detectar casos paucibacilares (Reibel; Cambau; Aubry, 2015).

A impossibilidade de cultivar o *M. leprae* in vitro complica ainda mais o diagnóstico; atualmente, modelos de infecção em camundongos e tatus são utilizados para obtenção do bacilo e para pesquisas genéticas (Martinez *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2020; Turankar *et al.*, 2015).

O teste imunocromatográfico rápido, que será implementado no Sistema Único de Saúde (SUS), detecta qualitativamente anticorpos IgM anti-*M. leprae* em soro, plasma ou sangue total, com resultado visual em menos de 20 minutos (Brasil, 2023). Esses testes são baseados na detecção de anticorpos contra o glicolípido fenólico-I (PGL-1), antígeno específico de *M. leprae*. No entanto, em casos paucibacilares, os títulos de anticorpos anti-PGL-I frequentemente são baixos, limitando a sensibilidade do teste (Geluk; Duthie; Spencer, 2011).

Dado o cenário atual, há uma necessidade urgente de testes diagnósticos acessíveis, específicos e sensíveis que possam identificar infecções subclínicas, servindo tanto para confirmação diagnóstica em pacientes sintomáticos quanto para rastreamento de contatos assintomáticos (Bahmanyar *et al.*, 2016; Corstjens *et al.*, 2016). Nesse contexto, o ensaio de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) baseado no conjugado NDO-LID surge como uma alternativa promissora. Este ensaio utiliza o antígeno *octyl disaccharide* natural (NDO) associado à proteína recombinante LID-1, uma fusão dos genes ML0405 e ML2331, desenvolvida no Leprosy Infectious Disease Research Institute (Duthie *et al.*, 2014).

Estudos mostraram que o LID-1 tem alta sensibilidade e especificidade, especialmente em casos multibacilares, e poderia substituir a baciloscopia como teste de confirmação, dada sua capacidade de diferenciar pacientes MB de PB com base na detecção de anticorpos IgG1 específicos (Marçal *et al.*, 2018). Além disso, investigações sobre a resposta imunológica a proteínas recombinantes do *M. leprae* identificaram que LID-1 gera uma resposta imunológica robusta em ambas as

respostas celular e humoral (Sampaio *et al.*, 2011), o que a torna um biomarcador fundamental para o diagnóstico sorológico da hanseníase.

A ampliação do diagnóstico precoce e a interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase são viabilizadas por ferramentas de alta sensibilidade, como a qPCR, que detecta DNA bacilar em contatos assintomáticos (Gama *et al.*, 2018). Estudos recentes mostram que até 47,43% dos contatos de pacientes com hanseníase apresentam DNA bacilar detectável em raspados dérmicos (Pinheiro *et al.*, 2023), indicando que a qPCR também pode ser um método eficaz de triagem e monitoramento para protocolos de quimioprofilaxia.

Portanto, a implementação de novos métodos diagnósticos, tanto sorológicos (LID-1 e PGL-1) quanto moleculares (qPCR), é essencial para avançar no manejo clínico e na vigilância epidemiológica da hanseníase, promovendo o diagnóstico precoce e potencialmente controlando a transmissão em áreas endêmicas (Richardus *et al.*, 2017; Romero-Montoya; Beltran-Alzate; Cardona-Castro, 2017; Turankar *et al.*, 2015)

## 2.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA HANSENÍASE

### 2.4.1 Imunidade inata

A imunidade inata, também conhecida como imunidade natural, é uma defesa inespecífica que age imediatamente após o contato inicial com um patógeno. No contexto da hanseníase, esse sistema imunológico pode ser um fator determinante na resistência de grande parte dos indivíduos ao desenvolvimento da doença. No entanto, as interações iniciais entre *Mycobacterium leprae* e o hospedeiro permanecem insuficientemente compreendidas, especialmente com os avanços no entendimento sobre o papel dos receptores de reconhecimento e fagócitos na detecção de patógenos e na ativação da resposta imune adaptativa (Souza, 2014). O fato de que a maioria das pessoas expostas ao *M. leprae* não evolui para a doença pode ser, em parte, atribuído a uma resposta inata eficaz (Mazini *et al.*, 2016).

Uma das principais características de *M. leprae* é sua habilidade de sobreviver em células do hospedeiro, como macrófagos, células dendríticas e células de

Schwann, utilizando diversos mecanismos que facilitam sua internalização e permanência nesses tipos celulares (Nath *et al.*, 2015).

Os padrões de reconhecimento celular (PRRs), como os do tipo Toll (TLRs), do tipo NOD e de lectina do tipo C, têm papel fundamental na detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) durante a resposta inata ao bacilo *M. leprae* (Modlin, 2010; Nath *et al.*, 2015). A interação dos PAMPs com os PRRs desencadeia sinais intracelulares que ativam a transcrição de genes essenciais para a ativação celular e o processo de fagocitose (Fonseca *et al.*, 2017; Pinheiro *et al.*, 2018).

Estudos de Krutzik *et al.* (2003) mostraram que os complexos TLR2 e TLR1 estão mais expressos em lesões de hanseníase tuberculóide do que em lesões da forma lepromatosa. Esses achados sugerem que a expressão e ativação regulada de TLRs no local da infecção desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos. Além disso, a ativação do complexo TLR2/TLR1 por lipopeptídeos derivados de *M. leprae* promove a produção de TNF- $\alpha$ , uma citocina crucial para a resposta Th1 dos linfócitos T *helper*.

Diversas lipoproteínas de *M. leprae* foram identificadas como ligantes e estimuladores potentes dos TLRs, com destaque para a ativação de TLR2. O reconhecimento do bacilo por células dendríticas inicia uma cascata de sinalização que leva à produção de citocinas, como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12. Essas citocinas não apenas regulam a resposta inflamatória, mas também modulam o desenvolvimento subsequente da imunidade adaptativa, direcionando-a para uma resposta do tipo Th1 ou Th2 através da ativação de linfócitos T (Fonseca *et al.*, 2017; Krutzik *et al.*, 2003; Pinheiro *et al.*, 2018; Suzuki *et al.*, 2012).

#### **2.4.2 Imunidade Adquirida - Celular e Humoral**

A resposta imunológica de um indivíduo após o contato com *Mycobacterium leprae* é fundamental para compreender o desenvolvimento e a progressão da hanseníase no organismo. Dessa forma, entender o papel dos mediadores imunológicos na diferenciação celular e na coordenação da resposta imunológica é essencial.

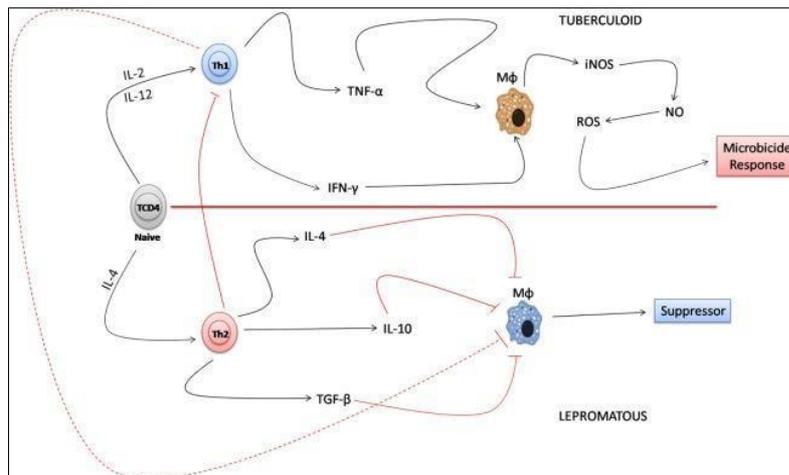
A imunidade adaptativa envolve a interação altamente específica entre linfócitos, células dendríticas, macrófagos e fatores solúveis, como anticorpos

secretados pelas células B, sendo dividida em resposta celular (Th1) e humoral (Th2) (Nath *et al.*, 2015). A diferenciação das células T CD4+ naive em células T auxiliares efectoras ocorre através da ligação do receptor de célula T (TCR) e de moléculas co-estimuladoras, com a presença de citocinas específicas produzidas pelo sistema imunológico inato em resposta aos antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). As citocinas interferon-gama (IFN-g) e interleucina-12 (IL-12) promovem a diferenciação das células Th1, que são cruciais na produção de IFN-g e na eliminação de patógenos intracelulares. Em contrapartida, a interleucina-4 (IL-4) direciona a diferenciação das células T naive para a via Th2.

As células Th2 desempenham um papel fundamental na defesa contra patógenos extracelulares e na ativação das células B para a produção de anticorpos. Tanto a diferenciação de células Th1 quanto de células Th2 depende da resposta inicial do sistema imune inato aos antígenos microbianos, parasitários ou alérgenos. É conhecido que IFN-g e IL-4 atuam de forma antagonista. O modelo Th1/Th2, introduzido por Mosmann & Coffman (1989), forneceu uma base para explicar diversos fenômenos da imunidade adaptativa. Citocinas do tipo Th1 foram observadas em lesões de pacientes com a forma tuberculóide (TT), enquanto uma resposta de citocinas Th2 foi associada à forma lepromatosa (LL) (Modlin, 2002).

O paradigma Th1 / Th2 pode explicar as manifestações e histopatologia das duas formas polares da hanseníase. Em forma TT, a resposta imune mediada por células é forte e os bacilos raramente são observados e imunologicamente observamos um perfil de citocinas predominantemente Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-12) e a expressão dos fatores de transcrição envolvidos nas vias de sinalização de citocinas Th1, como STAT1, STAT4, JAK2 e NF $\kappa$ B, foram encontrados em níveis mais elevados na hanseníase tuberculóide (Silva *et al.*, 2015), enquanto no LL as manifestações são disseminadas, a resposta humoral domina e a carga de bacilos é alta, com predominância de citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-6) (Froes Jr; Trindade; Sotto, 2020; Mi; Liu; Zhang, 2020; Sadhu; Mitra, 2018).

Figura 3 - Paradigma imunológico da resposta T *helper* (Th) 1/Th2 nas formas polares da hanseníase



Fonte: Sousa; Sotto; Quaresma (2017).

A produção de interleucina-2 (IL-2) promove a expansão de células T específicas ao antígeno, contribuindo para a redução da carga bacilar e, eventualmente, para a cura. Em contraste, a resposta Th2 envolve citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10, que fortalecem a resposta humoral. A IL-4 induz a produção de imunoglobulina E (IgE), enquanto IL-4 e IL-10 estimulam as células B e inibem a ativação de macrófagos, resultando em infecção progressiva (Lastória; Abreu, 2012; 2014).

A presença de IL-10 nas lesões inibe a produção de citocinas Th1 pelas células T CD4, reduzindo significativamente os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-2, o que compromete a resposta ao *M. leprae* (Lastória; Abreu, 2014). A polarização da resposta imune induzida pelo *M. leprae* é um fator crucial na patogênese da hanseníase e na definição de suas manifestações clínicas.

As células Th17, do subtipo CD4+, são importantes na resposta inflamatória autoimune, na eliminação de patógenos e na inflamação tecidual (Bettelli; Oukka; Kuchroo, 2007; Curtis; Way, 2009; Park *et al.*, 2005)

A diferenciação das células Th17 depende de várias citocinas, como IL-6, IL-21 e IL-1 $\beta$ , combinadas com concentrações mínimas de TGF- $\beta$ , que favorecem o

desenvolvimento das células Th17 enquanto inibem as células T reguladoras (Treg) (Deenick; Tangye, 2007; Mcgeachy *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2007). A IL-23 é essencial para a manutenção das células Th17 (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Stritesky; Yeh; Kaplan, 2008; Veldhoen *et al.*, 2006), e essas células secretam citocinas como IL-17A, IL-17F e IL-22, que promovem inflamação e dano tecidual (Ouyang; Kolls; Zheng, 2008; Zheng *et al.*, 2007).

Por outro lado, as células T reguladoras (Treg) desempenham um papel supressor na regulação da inflamação e na manutenção da tolerância imunológica (Bettelli *et al.*, 2006; Sakaguchi, 2004, 2008). As Tregs exercem sua função imunossupressora principalmente pela secreção de IL-10, IL-35 e TGF- $\beta$  (Kumar *et al.*, 2013b; Saini; Ramesh; Nath, 2014; Tarique *et al.*, 2017). Alguns estudos indicam que o aumento de Tregs em pacientes com hanseníase suprime a resposta imunológica do hospedeiro. Citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- $\beta$ , produzidas por células Th2 e Tregs, podem alterar a resposta ao *M. leprae*, contribuindo para a modulação da doença (Saini; Ramesh; Nath, 2014; Tarique *et al.*, 2017).

### 2.4.3 Citocinas e quimiocinas

As citocinas e quimiocinas são biomarcadores essenciais que desempenham papéis cruciais na mediação e modulação das respostas imunológicas. As citocinas compreendem várias superfamílias, incluindo as quimiocinas (com função quimiotática), interleucinas (IL), interferons (IFN), fatores estimuladores de colônias (CSF), fatores de transformação do crescimento (TGF) e fatores de necrose tumoral (TNF). Embora todas as citocinas sejam pequenas proteínas secretadas que influenciam outras células, as quimiocinas se destacam como uma subclasse com propriedades quimiotáticas específicas, atraindo leucócitos para locais de inflamação (Borish; Steinke, 2003; Palomino; Marti, 2015).

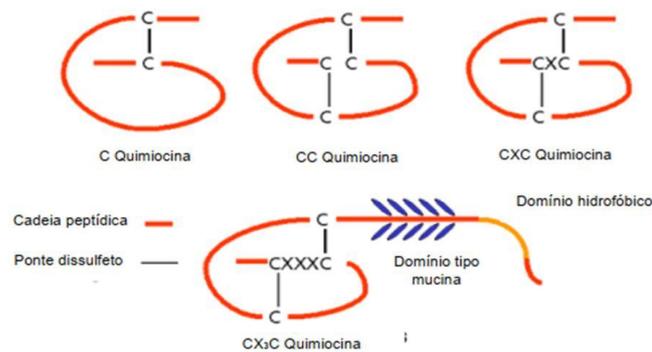
Inicialmente, as quimiocinas foram identificadas pela sua associação com respostas inflamatórias. Contudo, com os avanços no sequenciamento genômico, novos membros foram descobertos, ampliando o entendimento de suas funções. Em humanos, já foram descritas mais de 40 quimiocinas e cerca de 20 receptores específicos (Mackay, 2001). As quimiocinas estão organizadas em quatro principais

famílias, de acordo com o número e o arranjo dos resíduos de cisteína em sua estrutura N-terminal, conforme ilustrado na Figura 4: C, CC, CXC e CX3C.

As quimiocinas da família CC, nas quais as cisteínas são adjacentes, atraem predominantemente monócitos, basófilos e linfócitos. Já as quimiocinas da família CXC, onde as cisteínas são separadas por um aminoácido, são mais associadas à atração de neutrófilos (Charo; Ransohoff, 2006). Essas proteínas, com massa molecular entre 7 e 15 kDa, coordenam a migração de leucócitos específicos, sendo essenciais no direcionamento da infiltração celular em diferentes tipos de lesões, como as observadas na hanseníase (Kirkaldy *et al.*, 2003; Palomino; Marti, 2015).

As quimiocinas podem ser classificadas como homeostáticas, envolvidas na migração celular para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos, ou pró-inflamatórias, induzidas em resposta imune durante infecções (Palomino; Marti, 2015). A Figura 3 ilustra as quatro famílias principais, diferenciadas pela disposição dos resíduos de cisteína: na família C há apenas um par de cisteínas; na família CC, as cisteínas são adjacentes; na CXC, elas são separadas por um aminoácido; e na CX3C, três aminoácidos as separam (Guerreiro *et al.*, 2011; Sahingur; Yeudall, 2015).

Figura 4 - Estrutura das quimiocinas.



A formação de granulomas é fundamental para conter e restringir infecções por micobactérias. Nesse processo, as citocinas IFN- $\gamma$  (interferon-gama) e TNF (fator de necrose tumoral) desempenham papéis centrais, pois promovem a ativação de macrófagos e regulam a expressão de quimiocinas, como CCL2 (proteína quimiotática

de monócitos, também conhecida como MCP-1) e CXCL10 (*Interferon Gamma-Induced Protein 10* - IP-10), que são essenciais para o recrutamento celular e a resposta inflamatória (Qiu *et al.*, 2001; Roach *et al.*, 2002). O CCL2, por exemplo, é um quimiotático potente e ativador de monócitos que atrai linfócitos TCD4 e  $\gamma\delta$ . Além disso, as células de *Schwann* produzem CCL2, o que facilita o recrutamento de macrófagos após lesões nervosas experimentais (Fischer *et al.*, 2008; Tofaris *et al.*, 2002).

Estudos revelam que pacientes com hanseníase borderline (BT) apresentam expressão elevada de CCL2 e CCL5 em lesões quando estão em reação hansênica, em comparação com aqueles que não apresentam reações, sugerindo que essas quimiocinas podem estar envolvidas na resposta imunológica exacerbada observada nessas reações (Kirkaldy *et al.*, 2003).

A quimiocina CXCL8 (IL-8) também se destaca na hanseníase, pois é responsável principalmente pelo recrutamento de neutrófilos, além de atrair monócitos e linfócitos T que expressam receptores específicos para IL-8, como CXCR1 e CXCR2 (Moser *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2003). Altos níveis circulantes de CXCL8 e CCL2 são frequentemente observados em pacientes com hanseníase lepromatosa, o que reforça seu papel no recrutamento celular e na manutenção da inflamação em infecções disseminadas (Hasan *et al.*, 2004; Lew; Tada, 2002).

A CXCL10, também conhecida como IP-10, é outra quimiocina de relevância, atuando diretamente na resposta inflamatória induzida pelo IFN- $\gamma$ . Ela é produzida por macrófagos, células T e queratinócitos ativados, e promove a quimiotaxia de células T para locais de inflamação tecidual, especialmente em resposta ao IFN- $\gamma$ . Esse mecanismo é crucial, pois permite o recrutamento de células Th1 em áreas de inflamação tardia, como observado em lesões hansênicas (Kaplan *et al.*, 1986). Em reações hansênicas tipo I, níveis elevados de CXCL10 no soro foram documentados, indicando um possível papel como biomarcador para diagnóstico e monitoramento de reações (Scollard *et al.*, 2011; Stefani *et al.*, 2009).

Estudos de Geluk *et al.* (2012) avaliaram a produção de múltiplas citocinas, como IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , em hemoculturas estimuladas com a proteína recombinante ML1601c (p11 e p16), observando aumentos significativos nas concentrações dessas citocinas em indivíduos de áreas endêmicas para hanseníase. Especificamente, diferenças expressivas para IL-1 $\beta$  e IL-6 sugerem que respostas imunes inatas podem variar entre indivíduos expostos,

refletindo diferentes estágios de susceptibilidade ou resposta à infecção pelo *M. leprae*.

Os dados disponíveis destacam a importância das quimiocinas, especialmente CXCL10, nos eventos associados às reações hansênicas e evidenciam uma lacuna de informações sobre a resposta imunológica em contatos de pacientes hansenianos. Neste contexto, o presente estudo contribui para expandir o conhecimento sobre o papel de mediadores imunológicos, como IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17 e CXCL10, na infecção subclínica, podendo indicar potenciais biomarcadores para diagnóstico precoce e monitoramento de hanseníase em estágios iniciais.

### 3 JUSTIFICATIVA

A vigilância epidemiológica em áreas de alta endemicidade é considerada uma estratégia eficaz no controle da hanseníase, destacando-se a busca ativa de novos casos como um método essencial para a detecção precoce da doença, interrupção da transmissão e prevenção de incapacidades decorrentes de diagnósticos tardios (Brasil, 2016; Hacker *et al.*, 2012). Indivíduos que mantêm contato próximo com pacientes multibacilares (MB) apresentam um risco 5 a 10 vezes maior de desenvolver hanseníase em comparação à população geral. Além disso, contatos mais expostos que não manifestam a doença podem atuar como portadores assintomáticos, potencialmente disseminando *Mycobacterium leprae* para indivíduos suscetíveis (Araújo *et al.*, 2016; Goulart; Goulart, 2008).

Em relação ao diagnóstico, observa-se uma necessidade premente de novos testes mais específicos e sensíveis, capazes de detectar infecção subclínica (Bahmanyar *et al.*, 2016; Corstjens *et al.*, 2016). Testes sorológicos têm se mostrado promissores para o diagnóstico de infecções subclínicas (Amorim *et al.*, 2016; Oguttu *et al.*, 2014). Os kits sorológicos, geralmente, detectam anticorpos contra o glicolípido fenólico-I (PGL-I), antígeno específico do *M. leprae*, com maior produção de IgM observada especialmente em casos MB. Paralelamente, proteínas recombinantes, como a LID, têm sido investigadas devido ao seu potencial de aplicação em testes sorológicos, apresentando melhor performance diagnóstica em comparação a antígenos brutos (Gomes *et al.*, 2008). A proteína LID, especificamente, tem sido apontada como uma candidata promissora para o diagnóstico precoce da hanseníase (Duthie *et al.*, 2014, 2016).

O NuPqHans/GV, grupo de pesquisa responsável por este estudo, tem focado nos últimos anos no desenvolvimento de métodos para o diagnóstico precoce da hanseníase, especialmente utilizando técnicas moleculares e sorológicas para monitorar indivíduos expostos ao *M. leprae* (Cunha *et al.*, 2023; Dennison *et al.*, 2021; Gama *et al.*, 2018; 2019; 2020; Marçal *et al.*, 2018; 2020; Pinheiro *et al.*, 2023).

Neste estudo, enfatiza-se a importância de introduzir abordagens inovadoras para a identificação de biomarcadores em indivíduos residentes de áreas hiperendêmicas, visando definir perfis imunológicos indicativos de infecção subclínica com maior precisão. Para isso, serão analisadas alterações qualitativas e quantitativas

de biomarcadores, como citocinas, quimiocinas e anticorpos, com o objetivo de estabelecer associações robustas com infecções subclínicas.

#### 4 OBJETIVO GERAL

Definir biomarcadores imunológicos para detecção de hanseníase subclínica, utilizando os antígenos LID-1 e PGL-1.

##### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a presença de anticorpos sorológicos anti-LID nos participantes das comunidades investigadas.
- 2) Caracterizar o grupo de estudo por meio de parâmetros demográficos.
- 3) Avaliar a produção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de culturas de PBMC *in vitro* estimuladas com antígenos de *M. leprae*.
- 4) Avaliar a presença de anticorpos sorológicos anti-PGL na população estudada.
- 5) Definir biomarcadores associados com infecção subclínica na hanseníase.

## 5 MATERIAS E MÉTODOS

### 5.1 DESENHO DO ESTUDO

A população-alvo deste estudo é composta de indivíduos residentes nos municípios de Governador Valadares, Teófilo Otoni, Inhapim, Mantena e no distrito de Limeira de Mantena, Minas Gerais.

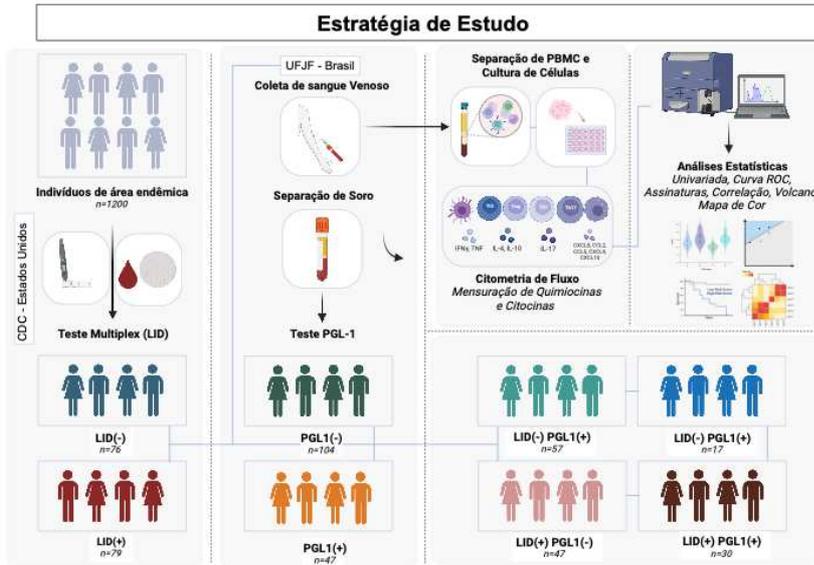
Os participantes foram selecionados através de uma estratégia de amostragem aleatória, constando de 1200 indivíduos residentes em áreas hiperendêmicas (incidência > 40 casos / 100.000 habitantes anualmente) e em municípios de alta endemicidade (incidência 20-39,9 casos / 100.000 habitantes anualmente) de Minas Gerais.

Desses 1200 indivíduos, 79 apresentaram anticorpos anti proteína recombinante do *M. leprae* LID-1 (+). Foram também incluídos 79 indivíduos controles, ou seja, que não apresentaram anticorpos anti-LID considerados LID-1 (-) e pareados de acordo com a faixa etária e gênero. Entretanto, 03 desses indivíduos não participaram do estudo por questões pessoais, ficando, portanto, 76 no grupo LID-1 (-), constituindo um total de 155 indivíduos.

Na segunda etapa do estudo, foi realizado o teste sorológico para identificar anticorpos anti-glicolipídeo fenólico (PGL-1), atualmente empregado para auxiliar no diagnóstico da hanseníase. Nessa etapa, foram avaliados 151 indivíduos, uma vez que ocorreu uma perda de 04 participantes por diferentes motivos: mudança de país, falecimento e insuficiência de amostra. Destes 151, 104 indivíduos não apresentaram anticorpos anti-PGL-1 considerados PGL-1 (-) e 47 testaram positivos, sendo considerados PGL-1 (+).

Dessa forma, foram construídos quatro subgrupos para as diferentes análises. LID-1 (+) / PGL-1(+) 30 indivíduos, LID-1 (+) / PGL-1 (-) 47 indivíduos, LID-1 (-) / PGL-1 (+) 17 indivíduos, LID-1 (-) / PGL-1 (-) 57 indivíduos. (Figura 5)

Figura 5 - Esquema do envolvimento dos participantes e desenho do estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 5:** 1200 indivíduos residentes em áreas hiperendêmicas foram selecionados aleatoriamente para compor a amostra de estudo. Destes foram coletados sangue subcutâneo para realização do teste multiplex (LID-1), 79 indivíduos LID-1(+) e 76 LID-1(-). A coleta de sangue venoso foi realizada para obtenção de PBMC e separação de soro. Em seguida, as células foram utilizadas no ensaio de cultura *in vitro* para obtenção de sobrenadante e quantificação dos níveis de citocinas e de quimiocinas (CBA). Teste sorológico de fluxo lateral (*ML Flow*) foi utilizado para detectar anticorpos contra antígenos do *M. leprae* (PGL-1), indicando 104 indivíduos PGL-1(-) e 47 indivíduos PGL-1(+). Análises estatísticas foram realizadas contemplando todos os grupos do estudo.

## 5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram recrutados indivíduos de ambos os sexos, residentes em áreas hiperendêmicas no município de Governador Valadares e entorno. Para atender a estratégia de buscar uma amostra heterogênea de participantes, definiu-se selecionar no máximo dois indivíduos por família.

Os indivíduos foram convidados a participar do estudo, através da Estratégia de Saúde da Família (ESF) das comunidades avaliadas. As atividades foram desenvolvidas de acordo com as estratégias abaixo:

Primeiro momento:

I – Convite e Agendamento dos participantes, II- Atendimentos nas Estratégias de Saúde da Família (ESF) nos respectivos locais de residência, III – Aplicação do questionário sociodemográfico (Anexo A), IV- Exame dermatoneurológico, V– Avaliação Antropométrica; VI – Coleta de sangue subcutâneo para o ensaio de multiplex.

Segundo momento:

Após a realização do ensaio Multiplex, separou-se os indivíduos considerados LID-1 (+) e realizado o pareamento com indivíduos LID-1 (-) para compor o grupo controle. Assim, os grupos de estudo foram compostos de 79 indivíduos LID-1 (+) e 76 indivíduos LID-1 (-). As seguintes atividades foram realizadas: I – Aplicação de um segundo questionário com aspectos clínicos (Anexo B), II – Exame dermatoneurológico, III – Coleta de sangue venoso para a identificação de biomarcadores imunológicos. IV – Foi realizado o Teste sorológico de fluxo lateral (ML Flow) para detectar anticorpos específicos contra antígenos do *Mycobacterium leprae* (PGL-1) no soro dos participantes.

### 5.3 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Os voluntários receberam uma explicação da natureza e dos objetivos do estudo, enfatizando a finalidade da pesquisa e assinaram o TCLE (Anexo C). O projeto foi aprovado no comitê de ética da UFJF/GV sob o número (CAAE: 56863016.6.1001.5147).

### 5.4 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 esteve disponível exclusivamente para os investigadores, cuja obrigatoriedade de manutenção do sigilo é inerente à sua função. Cópias dos resultados dos testes laboratoriais foram fornecidas aos participantes da pesquisa, ao final do estudo, e também quando solicitado. Orientações sobre a relevância dos achados foram também fornecidas para os participantes da pesquisa.

## 5.5 ENSAIO DE MULTIPLEX *BEADED ASSAY* (MBA) PARA ANTICORPO ANTI-LID1

Esse ensaio foi realizado para todos os participantes do estudo e encaminhado para o laboratório do CDC - Centro de Controle de Doenças nos EUA, cujo estudo está vinculado à *Emory University* sob a responsabilidade da Dra. Jessica Fairley, colaboradora deste Projeto (NIH/CNPq/Processo (CAAE: 56863016.6.1001.5147.)) A amostra de sangue foi coletada por meio de punção digital e adicionada em papel de filtro especial (*whatman*). Após secagem do sangue este material foi adequadamente acondicionado para envio ao CDC nos EUA. No laboratório do CDC o sangue foi apropriadamente removido do papel de filtro e após centrifugação o soro foi utilizado para realização do ensaio Multiplex.

Resumidamente, o ensaio Multiplex foi realizado no Centro de Controle de Doenças dos EUA CDC/ATLANTA de acordo com o protocolo estabelecido (*Multiplex Bead Assay*) utilizando o equipamento MAGPIX BioPLEX *Manager* MP. Esferas de poliacrilamida foram acopladas ao antígeno LID-1, uma proteína recombinante do *M. leprae*, produzida pelo *Infectious Disease Research Institute*, Seattle, Washington juntamente com outros 3 antígenos, já incorporados na plataforma Multiplex. A reatividade total de IgG para LID-1 foi avaliada através de análises na respectiva plataforma. Níveis de anticorpos (IgG e IgG4) para os vários antígenos foram medidos por fluorescência e valores positivos foram determinados utilizando-se um ponto de corte de 3 desvios-padrão acima da média dos controles não endêmicos (Won *et al.*, 2017).

## 5.6 ESTUDOS IMUNOLÓGICOS

Após o resultado do teste sorológico para ensaio de *Multiplex Beaded Assay* (MBA) para anti-LID-1, foi realizada a coleta de sangue venoso dos indivíduos positivos para LID-1 e dos indivíduos negativos para LID-1 que foram pareados por sexo (M/F), faixa etária e considerados controles.

A coleta de sangue foi realizada por profissionais qualificados da área de saúde, respeitando as técnicas de biossegurança, tais como uso de luvas, material estéril e descartável. 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). As amostras de sangue foram transportadas imediatamente para o Laboratório Multiusuário de Imunologia da UFJF/GV e Univale, e realizada a técnica de separação das células mononucleares de sangue periférico (PMBC) em centrifuga. Os perfis imunológicos foram descritos através de respostas de quimiocinas (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10) e citocinas Th1, Th2 e Th17 (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17).

Resumidamente, o procedimento utiliza o sangue coletado heparinizado para separação das células por gradiente de densidade em *Ficoll Hypaque* (GE *Healthcare*, Suécia). Após centrifugação a 1350 rpm, por 45 minutos, à temperatura ambiente, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS (1250 rpm, 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), Lglutamina (Gibco *Invitrogen Corporation*, EUA) a 2mM, penicilina a 100 U/mL e estreptomicina (Gibco *Invitrogen Corporation*, EUA) a 100 $\mu$ g/mL (meio completo). Uma pequena alíquota desta suspensão celular foi diluída em azul de Trypan 0.4% (1:20) (Bio WHITTAKER, EUA) e contada em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis.

#### 5.7 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTES DE CULTURA DE PBMC

As células mononucleares do sangue periférico obtidas do procedimento anterior foram cultivadas em duplicata na concentração de 2x10<sup>5</sup> células/poço, em placas de 96 poços (Falcon, BD) durante 05 dias para os poços sem estímulo (controle) 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<sub>2</sub> (*Thermo Electron*), em atmosfera úmida. Os sobrenadantes de cada duplicata foram recuperados e mantidos congelados a -80 °C, até o uso.

## 5.8 ANTÍGENO

*M. leprae*, mortos por irradiação ( $3,48 \times 10^8$  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.

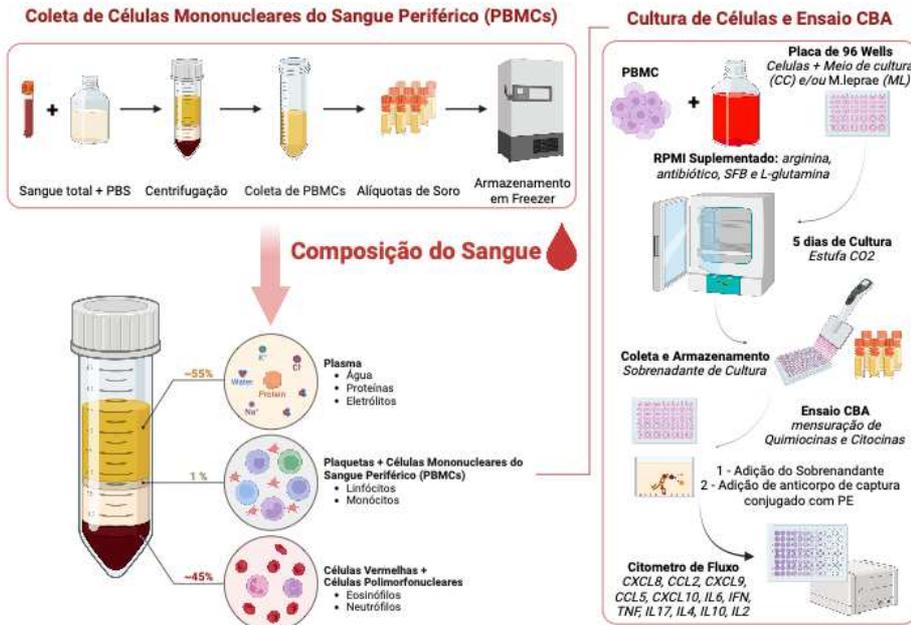
## 5.9 DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS EM SOBRENADANTES DE CULTURAS DE PBMC IN VITRO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A partir dos sobrenadantes coletados das culturas descritas acima, foram quantificados os níveis de citocinas e de quimiocinas utilizando-se o método CBA da *Becton Dickinson*-BD. Esse sistema emprega uma mistura de sete esferas de poliestireno para citocinas e cinco esferas de poliestireno para quimiocinas de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas e quimiocinas humanas. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17) e quimiocinas (IL8/CXCL8, RANTES/CCL5, MIG/CXCL9, MCP-1/CCL2 e IP-10/CXCL10) empregando-se pequenos volumes de amostra.

Inicialmente as amostras de sobrenadante de cultura mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas em banho maria à  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos e centrifugadas a 500G por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo. Alíquotas de 26 $\mu\text{L}$  de diluente G apenas (Controle Negativo), de 26 $\mu\text{L}$  dos padrões de citocinas, submetidos a diluição seriada com diluente G (reagente presente no kit CBA) e 26 $\mu\text{L}$  do sobrenadante de cultura, foram transferidas para placa de 96 poços. Em seguida, a cada poço da placa foi adicionado 18 $\mu\text{L}$  da mistura de esferas de captura, adsorvidas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, 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*, com subsequente incubação por 3 horas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 160 $\mu\text{L}$  da solução F (*Wash buffer*, reagente presente no kit CBA). Em seguida, as placas de 96 poços foram centrifugadas a 200G, por 7 minutos a  $18^{\circ}\text{C}$  e, o sobrenadante cuidadosamente descartado. Posteriormente, é adicionado o reagente de detecção

(anticorpo secundário conjugado com *phycoerythrin* (PE)). Uma vez formado o complexo sanduíche contendo as esferas de captura, o analito presente no sobrenadante de cultura e o reagente de detecção, seguiu-se para a etapa final do procedimento onde as esferas foram ressuspensas em 200µL de reagente F e imediatamente analisadas no FACS VERSE (BD Biosciences). (Figura 6)

Figura 6 - Protocolo de Coleta, Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs) e Ensaio CBA.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 6.** Diagrama ilustrando o protocolo para a coleta e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e o ensaio CBA (Cytometric Bead Array). O sangue total é misturado com PBS/EDTA, seguido de centrifugação para a coleta das PBMCs, que são então aliquoteadas em criotubos e congeladas. As PBMCs são posteriormente cultivadas em placas de 96 poços com meio RPMI suplementado por 5 dias em estufa de CO<sub>2</sub>, e o sobrenadante é coletado para mensuração de quimiocinas e citocinas utilizando o ensaio CBA.

#### 5.10 TESTE SOROLÓGICO DE FLUXO LATERAL (ML FLOW / PGL-1)

Teste sorológico de fluxo lateral (ML Flow) foi inicialmente descrito por Bühner Sékula *et al.*, (2003) e posteriormente produzido comercialmente e aprovado pela

ANVISA (BIOCLIN *FAST ML FLOW*). O kit BIOCLIN *FAST ML FLOW* (anticorpos IgM anti-*Mycobacterium leprae*) é um ensaio imunocromatográfico (teste rápido) para determinação qualitativa de anticorpos IgM em amostras de soro, plasma ou sangue total (punção digital). Neste kit, um antígeno específico de *M. leprae* (glicolípido I fenólico de *M. leprae* ou PGL-1) está imobilizado na linha teste. O conjugado é formado por anticorpos anti-IgM humano ligado a nanopartículas de ouro coloidal. Quando uma amostra positiva é adicionada no teste, os anticorpos IgM presentes na amostra são capturados pelos anticorpos anti-IgM conjugados ao ouro coloidal, formando o complexo: IgM – anticorpos anti-IgM. A amostra continua a migrar ao longo da tira-teste por capilaridade e ocorre a ligação dos anticorpos IgM anti-*M. leprae* com o antígeno PGL-I imobilizado na linha teste, formando o complexo: PGL-I – IgM anti-*M. leprae*. Com isso ocorre a formação de uma banda vermelha nesta região, indicando um resultado positivo (amostra reativa). Amostras negativas não possuem anticorpos IgM anti-*M. leprae*. Desta forma não ocorre ligação de anticorpos IgM ao antígeno PGL-1 da linha teste e não ocorre a formação da linha vermelha, indicando resultado negativo (amostra não reativa). A linha controle é constituída de proteína A imobilizada. Nesta região o excesso de conjugado é capturado por esta proteína, independentemente se a amostra é positiva ou negativa, formando o complexo: anticorpos anti-IgM – proteína A (Bioclin, 2023).

Considera-se um teste reagente a formação de uma linha vermelha, em qualquer intensidade, fraca ou forte, na região teste (T) e outra linha na região controle (C) nos primeiros 15 a 20 minutos. Considera-se um teste não reagente, a formação de uma linha vermelha na região controle (C) e ausência completa de linha vermelha na região teste (T). O resultado não deve ser interpretado após os 20 minutos. Considera-se um teste inválido, a ausência completa de linha na região controle com ou sem linha vermelha na região teste (T). Neste caso, deve-se realizar um novo teste (Brasil, 2023).

## 5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

### 5.11.1 Análise Estatística

O banco de dados foi organizado usando planilha de Excel. Ao final da etapa de coleta, os dados foram exportados e analisados com auxílio do software GraphPad

Prism 8.0® (San Diego, CA, EUA), em que também foram elaborados os gráficos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ .

No presente estudo foram utilizadas as seguintes estratégias de análise dos dados: análise convencional, análise de assinaturas de citocinas e quimiocinas, sobreposição de curvas de assinaturas, confecção dos diagramas de Venn e Heatmap.

### 5.11.2 Análise convencional

A análise estatística convencional das quimiocinas e citocinas foi realizada para caracterizar os indivíduos dos grupos LID-1 (+) vs LID-1 (-); PGL-1 (+) vs PGL-1 (-); LID-1(-)PGL-1(-), LID-1(-)PGL-1(+), LID-1(+)PGL-1(-) e LID-1(+)PGL-1(+), considerando a produção desses biomarcadores em sobrenadantes de culturas de PBMC *in vitro*. A normalidade da distribuição (Gaussiana) foi verificada, aplicando-se o teste de Shapiro-Wilk para confirmar o padrão de distribuição das variáveis. Para dados paramétricos, utilizou-se o teste t de Student, e, para dados não paramétricos, o teste de Mann-Whitney (Figuras 6, 12, 18). Essa análise foi realizada com o software Prism GraphPad (versão 8.01, San Diego, Califórnia, EUA).

### 5.11.3 Análise de assinatura de citocinas e quimiocinas

Adicionalmente, a análise descritiva das assinaturas de biomarcadores foi realizada conforme descrito previamente (Costa-Silva *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2023; Luiza-Silva *et al.*, 2011; Marçal *et al.* 2020; Queiroz *et al.*, 2019; Silveira-Nunes *et al.*, 2020). Esse método tem sido empregado para detectar variações sutis nos níveis de quimiocinas e citocinas que não são evidentes em análises estatísticas convencionais.

A metodologia consiste na conversão dos valores quantitativos de produção de quimiocinas/citocinas em dados categóricos. Os participantes do estudo foram classificados como "ALTOS" e "BAIXOS" produtores de cada quimiocina/citocina, utilizando-se a média ou mediana intrínseca (conforme o caráter paramétrico ou não paramétrico dos dados) como ponto de corte específico para cada marcador. A média ou mediana foi considerada "intrínseca" por ter sido obtida a partir de culturas de PBMC *in vitro*, tanto não estimuladas quanto estimuladas com *M. leprae*.

Para o cálculo da média/mediana intrínseca, inicialmente realizou-se o somatório dos valores do conjunto completo de dados, ou seja, a soma dos valores de cada quimiocina/citocina em todos os grupos (LID-1(+) vs LID-1 (-); PGL-1 (+) vs PGL-1 (-); LID-1(-)PGL-1(-), LID-1(-)PGL-1(+), LID-1(+PGL-1(-) e LID-1(+PGL-1(+)), Com base nesses valores, determinou-se o ponto de corte. Indivíduos com níveis de quimiocinas/citocinas iguais ou superiores à média/mediana intrínseca foram categorizados como altos produtores (*high*) para o respectivo marcador. Aqueles com níveis abaixo da média/mediana foram classificados como baixos produtores (*low*).

Além disso, foram geradas e sobrepostas curvas ascendentes da assinatura das quimiocinas/citocinas para identificar alterações no perfil global dessas moléculas. Essa análise permitiu observar o comportamento e a hierarquia de produção das quimiocinas/citocinas, contribuindo assim para a caracterização do perfil imunológico dos participantes. A categorização funcional incluiu citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e IL-2) e reguladoras (IL-4 e IL-10). Consideraram-se produções relevantes quando a porcentagem de indivíduos altos produtores de uma determinada quimiocina/citocina superou o valor de 50% (Figuras 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22 e 23).

#### 5.11.4 Diagrama de Venn

Os diagramas de Venn são representações gráficas amplamente empregadas na bioinformática e em outras áreas científicas para ilustrar as relações entre conjuntos de dados. Esse tipo de diagrama utiliza círculos sobrepostos para indicar os elementos compartilhados e exclusivos entre diferentes conjuntos. Cada círculo representa um conjunto específico, e as áreas de sobreposição entre os círculos refletem as interseções ( $\cap$ ) entre esses conjuntos, ou seja, os elementos que são comuns a mais de um conjunto (Lam *et al.*, 2016).

No contexto da bioinformática, os diagramas de Venn são particularmente úteis para visualizar interações, identificar padrões e compreender a sobreposição de dados entre diferentes grupos, como genes, proteínas ou outros biomarcadores em distintos estados ou condições experimentais. Essa visualização facilita a identificação rápida de áreas de similaridade e exclusividade entre os conjuntos, sendo uma ferramenta essencial para a análise exploratória de dados complexos e volumosos.

Para a construção dos diagramas de Venn utilizados neste estudo (Figura 7,13 e 19), foi empregado o *software Bioinformatics & Evolutionary Genomics*, uma ferramenta online que permite a criação de diagramas personalizados para a análise de interseções de conjuntos. A ferramenta está disponível em: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. A utilização deste recurso contribuiu para uma visualização clara das relações entre os conjuntos de dados analisados, auxiliando na interpretação dos resultados e na identificação de padrões relevantes para o estudo.

#### 5.11.5 Volcano plot

Os estudos envolvendo a análise de quimiocinas e citocinas geram informações valiosas para a compreensão de fenômenos biológicos em larga escala, oferecendo importantes *insights* em diversos contextos de pesquisa na biologia. Contudo, o grande volume de dados e a variabilidade presente nesses estudos requerem uma exploração cuidadosa e uma interpretação adequada. A manipulação desses dados exige conhecimento em ferramentas que permitem tanto a análise quanto a representação gráfica dos resultados obtidos. Nesse sentido, o domínio de representações gráficas, como o Volcano plot (Figuras 8, 14, 20, 21), constitui um diferencial significativo para o sucesso na interpretação e comunicação dos resultados (Bailey, 2019; Li, 2012).

O Volcano plot é uma das representações mais clássicas e amplamente utilizadas para sumarizar e visualizar resultados de expressão diferencial em estudos de larga escala. Esse gráfico integra informações de *fold change* e significância estatística, destacando os biomarcadores que apresentam maiores diferenças entre os grupos analisados. O *fold change* é uma medida da magnitude de mudança entre dois grupos, calculada pela razão entre a média (ou mediana) dos valores de expressão de um biomarcador no grupo experimental em relação ao grupo controle. Valores de *fold change* maiores que 1 indicam um aumento na expressão no grupo experimental em comparação ao controle, enquanto valores menores que 1 indicam uma diminuição.

Além disso, nas análises categóricas, onde os dados foram organizados em categorias (como "altos" e "baixos" produtores), o delta foi utilizado para avaliar a diferença nas proporções entre os grupos. Esse delta foi calculado pela diferença

entre as porcentagens de indivíduos em cada categoria para os grupos comparados. Por exemplo, se 60% dos indivíduos no grupo experimental são altos produtores de uma determinada quimiocina/citocina, em comparação com 30% no grupo controle, o delta seria de 30 pontos percentuais. Essa análise de delta permite avaliar mudanças na frequência de expressão de biomarcadores entre categorias, proporcionando uma visão mais detalhada da distribuição das respostas biológicas entre os grupos.

Neste contexto, o uso dessa linguagem e suas ferramentas associadas permite não apenas a análise estatística avançada, mas também a comunicação visual clara e eficaz dos dados, contribuindo de forma essencial para a interpretação e disseminação dos achados de pesquisa (Graffelman; Van Eeuwijk 2005; R Core Team, 2019; Wickham, 2016).

#### **5.11.6 Análises de redes**

A análise de redes é uma técnica estatística gráfica que facilita a visualização e interpretação das associações entre múltiplas variáveis em um conjunto de dados. As redes são compostas por estruturas gráficas constituídas de nodos, que são representados por círculos e indicam variáveis específicas, como quimiocinas e citocinas. Os nodos são interligados por arestas, que são linhas que representam as relações entre as variáveis.

No presente estudo, a análise de redes foi utilizada para avaliar redes integrativas de quimiocinas e citocinas, considerando apenas os coeficientes de correlação significativos ("r") com valores de, obtidos a partir de análises de correlação de Pearson e Spearman. A construção das redes foi realizada na plataforma de *software Cytoscape* (disponível em <https://cytoscape.org>), utilizando um layout circular. Nesse layout, os nodos representam as quimiocinas e citocinas, enquanto as arestas indicam as correlações fortes e significativas entre os pares de atributos. As conexões positivas são representadas por linhas contínuas, e as negativas, por linhas tracejadas. Apenas correlações fortes, com coeficientes de correlação ( $r$ ) iguais ou superiores a 0,8 em valor absoluto ( $|r| \geq 0,8$ ), foram consideradas como representativas da força das associações entre as variáveis.

Essa abordagem permite identificar padrões complexos e interdependências no conjunto de dados, sendo uma ferramenta poderosa para explorar e interpretar

associações entre variáveis em estudos de saúde e outras áreas biológicas (Leme *et al.*, 2020) (Figuras 10, 11, 17, 22).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO

Os participantes deste estudo residiam em: Governador Valadares, Inhapim, Teófilo Otoni, Mantena e distrito de Limeira Mantena. Considerando o gênero, 102 participantes são do sexo feminino (65%) e 53 do sexo masculino (44%), quanto a faixa etária, observou-se um maior número de indivíduos acima de 15 anos (86,2%). Entretanto, verificou-se que 14 apresentaram idade inferior a 15 anos (13,7%), sendo 8 deles LID-1 (+). (Tabela 1)

Vale ressaltar que no grupo de 155 indivíduos observou-se uma amostra de 79 LID-1(+) e 76 LID-1 (-). Entretanto verificou-se uma importante redução no número de indivíduos apresentando anticorpos anti PGL-1 (47 participantes).

Tabela 1 - Caracterização do grupo de estudo

Caracterização do grupo de estudo							
Cidade	Bairro	Nº de pessoas	Sexo	Faixa etária dos indivíduos LID (+) e LID (-)	LID+	Faixa etária LID+	LID-
Governador Valadares	Altinópolis	18	10 Feminino	0-15a: 2	9	0-15a: 1	9
			8 Masculino	15+: 16		15+: 8	
	Atalaia	18	15 Feminino	0-15a: 0	10	0-15a: 0	8
			3 Masculino	15+: 18		15+: 10	
	Azteca	2	0 Feminino	0-15a: 1	1	0-15a: 0	1
			2 Masculino	15+: 1		15+: 1	
	Ipê	18	7 Feminino	0-15a: 5	8	0-15a: 3	10
			11 Masculino	15+: 13		15+: 5	
	Turmalina	35	25 Feminino	0-15a: 3	18	0-15a: 2	17
			10 Masculino	15+: 32		15+: 16	
Inhapim	Cór. Januario	3	3 Feminino	0-15a: 1	2	0-15a: 1	1
			0 Masculino	15+: 2		15+: 1	
	Sto Antônio	10	6 Feminino	0-15a: 2	5	0-15a: 1	5
T. Otoni	Jdim Acácias	1	4 Masculino	15+: 8	1	15+: 4	0
			1 Feminino	0-15a: 0		0-15a: 0	
	São Jacinto	9	0 Masculino	15+: 1	4	15+: 1	5
			5 Feminino	0-15a: 0		0-15a: 0	

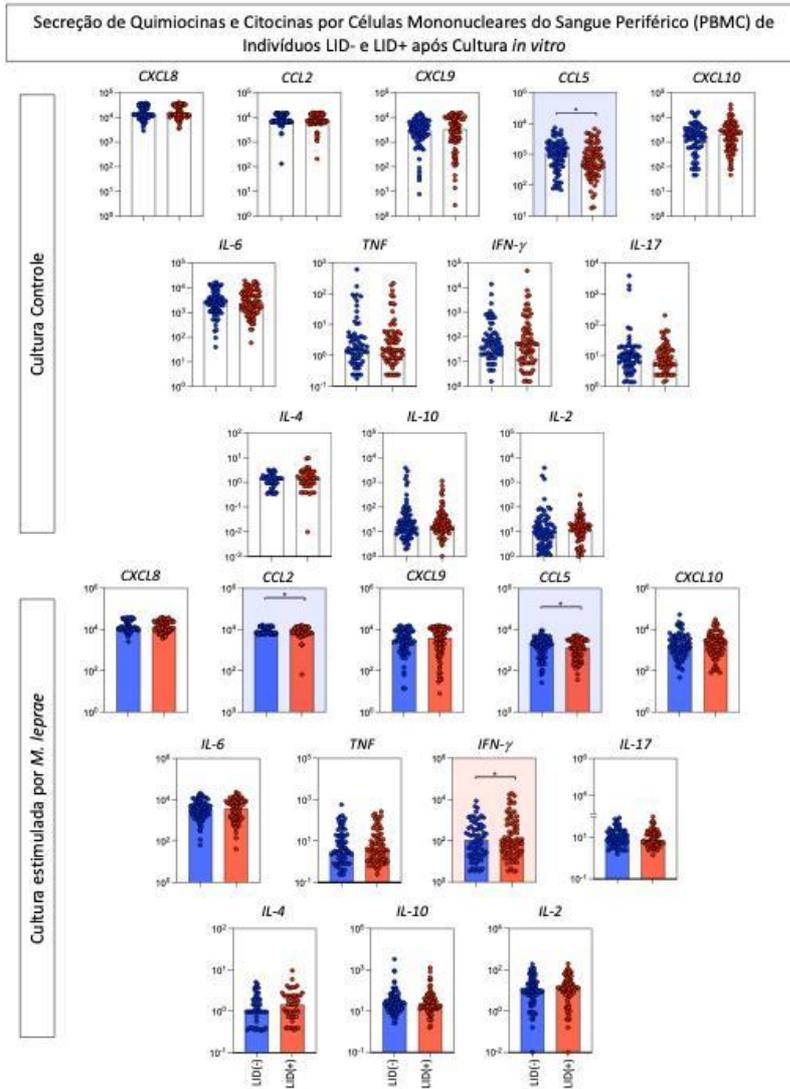
			4 Masculino	15+: 9		15+: 4	
			4 Feminino	0-15a: 0		0-15a: 0	
	Serra Verde	5	1 Masculino	15+: 5	3	15+: 3	2
			2 Feminino	0-15a: 0		0-15a: 0	
	Turma 37	2	0 Masculino	15+: 2	1	15+: 1	1
<b>Limeira de Mantena</b>	L. de Mantena	25	15 Feminino	0-15a: 0		0-15a: 0	
			10 Masculino	15+: 25	12	15+: 12	13
<b>Mantena</b>	13 de Junho	1	1 Feminino	0-15a: 0		0-15a: 0	
			0 Masculino	15+: 1	1	15+: 1	0
	V. Nova	8	7 Feminino	0-15a: 0		0-15a: 0	
			1 Masculino	15+: 8	4	15+: 4	4
<b>Total</b>		155	102 Feminino	0-15a: 14	79	0-15a: 8	76
			53 Masculino	15+: 141		15+: 71	

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

## 6.2 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS LID-1 (-) E LID-1 (+) APÓS CULTURA *IN VITRO*.

Os resultados indicaram que os indivíduos do grupo LID-1 (+) apresentaram um aumento significativo na produção da citocina IFN- $\gamma$  na cultura estimulada. Em contraste, os participantes do grupo LID-1 (-) demonstraram uma produção significativamente maior da quimiocina CCL5 em comparação com os indivíduos do grupo LID-1 (+), tanto na cultura controle quanto na estimulada. Além disso, foi observada uma maior produção da quimiocina CCL2 nos indivíduos do grupo LID-1 (-) na cultura estimulada (Figura 7).

Figura 7 - Secreção de quimiocinas e citocinas por Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) dos indivíduos dos grupos LID-1 (-) e LID-1 (+) após cultura *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 7.** Visão panorâmica das quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura *in vitro*. A análise de CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10, IL-6, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-2 e IL-10 foi realizada após cultura *in vitro* de PBMC de indivíduos LID-1 (-) (representados por ■, n=76) e LID-1 (+) (representados por ■, n=79), na ausência de estímulo antigênico (cultura não estimulada) e na presença do antígeno de *M. leprae* (cultura estimulada). Os resultados são apresentados em formato de boxplot, indicando os valores medianos (mínimo-máximo) das concentrações de quimiocinas e citocinas (pg/mL). A análise comparativa entre os grupos foi realizada utilizando o Teste de Mann-Whitney, e diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas por linhas de conexão com (\*).

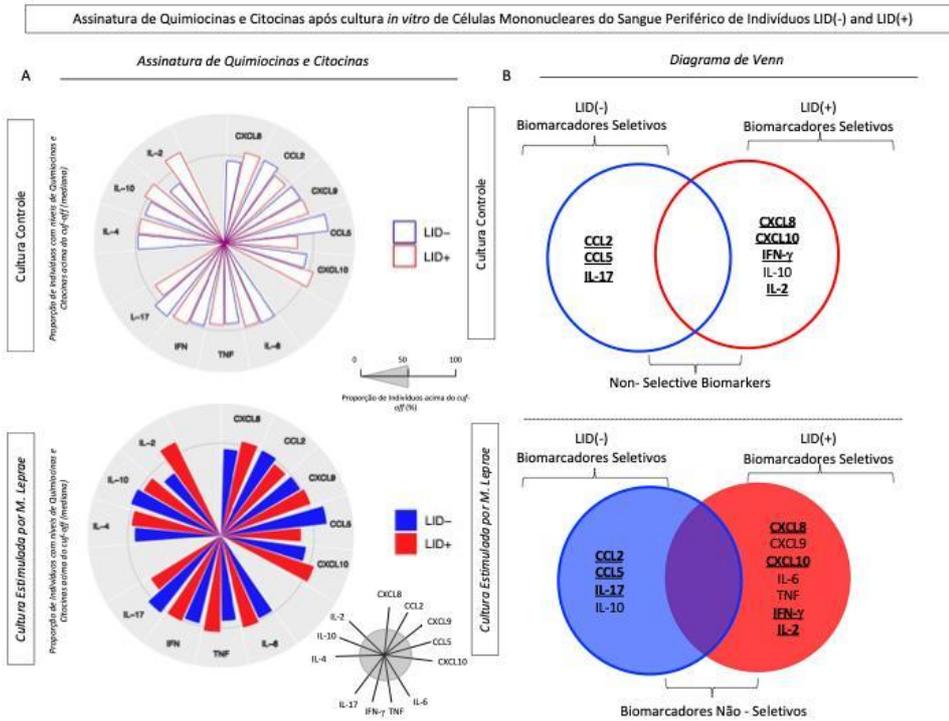
### 6.3 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR PBMC DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS LID-1 (-) E LID-1 (+) APÓS CULTURA *IN VITRO*.

A análise complementar desses resultados, mediante conversão em dados categóricos de assinaturas de quimiocinas e citocinas, apontou diferenças adicionais entre indivíduos dos grupos LID-1 (-) e LID-1 (+) não detectadas na análise das variáveis contínuas.

Construiu-se o gráfico de barras circulares de quimiocinas e citocinas, indicando os altos produtores, ou seja, aqueles valores acima da mediana/*cut-off*. Com relação ao grupo de indivíduos LID-1 (-), foi observado, na cultura não estimulada, maior proporção de indivíduos altos respondedores, ou seja, valores acima de 50% para CCL2 e CCL5. Com relação às citocinas, a IL -17 apresentou a maior proporção. Na cultura estimulada pelo *M. leprae*, ocorreu um aumento da proporção de indivíduos altos respondedores em relação às quimiocinas CCL2 e CCL5 e as citocinas IL-17 e IL-10. Para os indivíduos do grupo LID-1 (+) foi observado, na cultura não estimulada, uma maior proporção de indivíduos alto respondedores para as quimiocinas CXCL8 e CXCL10, bem como para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL -2. Entretanto, na cultura estimulada pelo *M. leprae*, observou-se maior proporção de indivíduos altos respondedores com relação à produção de quimiocinas CXCL8, CXCL9 e CXCL10, bem como de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e IL-2. (Figura 8).

Considerando a análise descrita acima, construiu-se o Diagrama de Venn onde comparou-se o perfil de resposta imune do grupo LID-1 (-) vs LID-1 (+) considerando tanto cultura não estimulada quanto estimulada. Os resultados mostraram que os marcadores de maior interesse para distinguir os grupos: LID-1 (-) e LID-1 (+) foram respectivamente CCL2, CCL5, IL17 e CXCL8, CXCL10, IFN- $\gamma$  e IL2.

Figura 8 - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos LID-1 (-) e LID-1(+) – Gráfico de Barras Circulares / Diagrama de Venn.

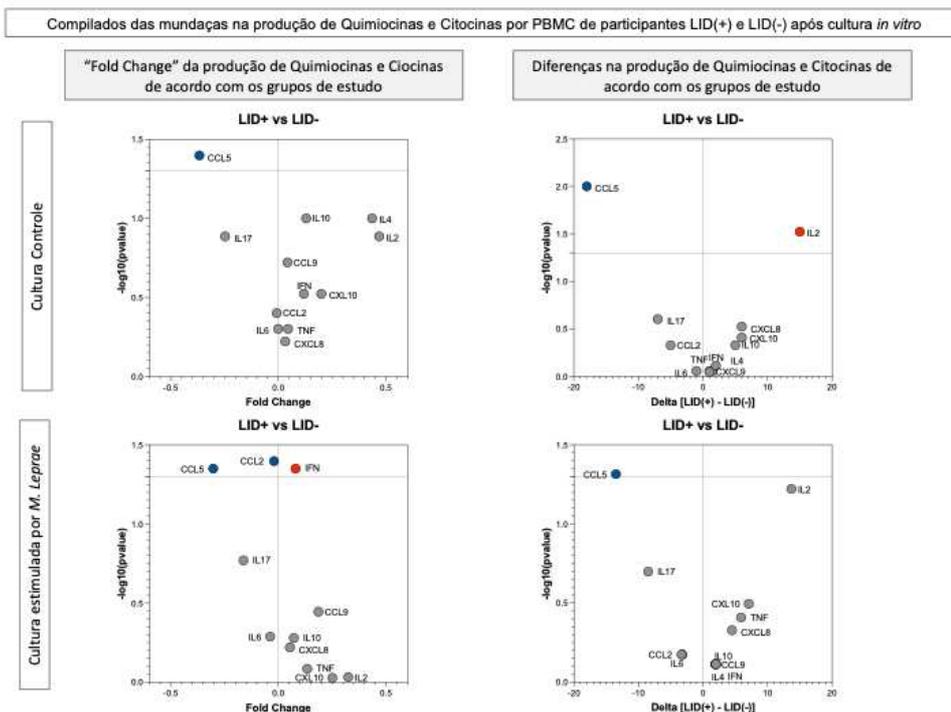


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 8.** Assinatura de quimiocinas e citocinas em indivíduos dos grupos LID-1 (-) e LID-1 (+) após cultura de PBMC *in vitro*. A análise da assinatura de quimiocinas e citocinas foi realizada conforme descrito em materiais e métodos. Variáveis contínuas expressas em pg/mL foram convertidas em dados categóricos utilizando os valores da mediana intrínseca para a cultura não estimulada do grupo LID-1 (CXCL8 = 13.133 pg/mL, CCL2 = 1.227 pg/mL, CXCL9 = 3.460 pg/mL, CCL5 = 1.231 pg/mL, CXCL10 = 1.844 pg/mL, IL-6 = 2.909 pg/mL, TNF = 2.24 pg/mL, IFN-g = 29.04 pg/mL, IL-17 = 6.61 pg/mL, IL-4 = 4 pg/mL, IL-22 = 9 pg/mL, IL-10 = 20 pg/mL) e cultura estimulada com *M. leprae* (CXCL8 = 13.133 pg/mL, CCL2 = 7.227 pg/mL, CXCL9 = 3.460 pg/mL, CCL5 = 1.231 pg/mL, CXCL10 = 1.844 pg/mL, IL-6 = 2.909 pg/mL, TNF- $\alpha$  = 2.24 pg/mL, IFN-g = 50.78 pg/mL, IL-17 = 6.61 pg/mL, IL-4 = 0.57 pg/mL, IL-22 = 11.44 pg/mL, IL-10 = 20 pg/mL, com cutoff off). A proporção de participantes com níveis elevados de quimiocinas e citocinas foi calculada para cada grupo de estudo e os dados apresentados através do gráfico de barras circulares A e diagrama de cores B. A cultura controle está representada com imagens vazadas, enquanto a cultura estimulada por *M. leprae* por imagens preenchidas. Os biomarcadores selecionados em ambas as culturas foram destacados em negro e sublinhados.

Este gráfico avalia o "fold change" (mudança relativa) das quimiocinas e citocinas entre os grupos LID-1(+) e LID-1(-). Observa-se na cultura controle CCL5 para o grupo LID-1 (-) e na cultura estimulada pelo *M. leprae* CCL5 e CCL2 nos indivíduos LID-1 (-) e a citocina IFN- $\gamma$  nos indivíduos LID-1 (+). No Volcano plot utilizando o delta valor encontra-se na cultura controle somente o biomarcador CCL5 para o grupo de indivíduos LID-1 (-) e IL2 no grupo LID-1 (+). Na cultura estimulada pelo *M. leprae* a quimiocina CCL5 permanece identificado nos indivíduos LID-1 (-). (Figura 9).

Figura 9 - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura in vitro de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos LID-1 (-) e LID-1(+) – Volcano Plot.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 9:** Representa os dados em Volcano plot dos participantes LID-1(+) e LID-1 (-). A posição horizontal (eixo X) de cada ponto indica a magnitude da mudança nos níveis das citocinas e quimiocinas. A posição vertical (eixo Y) representa o  $-\log_{10}$  do valor de P ( $< 0,05$ ) que equivale a 1,33. Observa-se os resultados das diferenças relativa (*Fold Change*) dos biomarcadores na cultura controle CCL5 para o grupo LID-1 (-) e na cultura estimulada pelo *M. leprae* CCL5 e CCL2 nos indivíduos LID-1(-) e o IFN- $\gamma$  para o grupo LID-1 (+). No Volcano plot utilizando o delta valor encontra-se na cultura controle CCL5 para o grupo LID-1 (-) e IL-2 no grupo LID-1 (+). Na cultura estimulada pelo *M. leprae* CCL5 nos indivíduos LID-1 (-).

#### 6.4 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR PBMC DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS LID-1 (-) E LID-1 (+) APÓS CULTURA *IN VITRO*. COMPARAÇÃO DAS ASSINATURAS ENTRE GRUPOS - CURVA ROC

A análise da curva ROC foi realizada para estimar o desempenho de cada citocina e quimiocina para categorizar indivíduos dos grupos LID-1 (-) e LID-1 (+), e os índices de desempenho são determinados na Figura 10. A avaliação dos dados foi aplicada para identificar os atributos com maior desempenho com base na análise combinada da área sob a curva ROC ( $AUC \geq 0,70$ ), com excelente sensibilidade e especificidade, bem como uma valiosa razão de verossimilhança. Com base nesses critérios, os biomarcadores CCL2, CCL5, TNF e IFN- $\gamma$  das culturas de *M. leprae* e CC foram selecionados como os principais parâmetros para segregar LID-1 (-) de LID-1 (+) (Figura 10). Os resultados indicaram que os níveis de CCL2 apresentaram CUT-OFF=0,73, p-valor=0,02, AUC=0.61, sensibilidade=34.18%, especificidade=34.18%, LR =2.93, CCL5 apresentaram CUT-OFF=1,38, p-valor=0,05, AUC=0.59, sensibilidade=43.59%, especificidade=84.42%, LR=2.79, TNF apresentaram CUT-OFF=1.38, p-valor=0.02, AUC=0.62, sensibilidade=86.08%, especificidade=48.05%, LR=1.65, IFN- $\gamma$  apresentaram CUT-OFF=1.86, p-valor=0.01, AUC=0.73, sensibilidade=71.79%, especificidade=86.30%, LR=5.24.

As Curvas ROC foram construídas para demonstrar ainda mais o desempenho das quimiocinas e citocinas selecionadas para agrupar os indivíduos (LID-1 (+) e LID-1 (-)). O IFN- $\gamma$  com altos parâmetros de desempenho (AUC=0.73, p=0.01, sensibilidade=86.30%, especificidade=86.30%). Vale ressaltar a importância do IFN- $\gamma$  como biomarcador de possível infecção subclínica. Interessantemente, o IFN- $\gamma$  já é utilizado no Kit QuantiFeron para auxiliar no diagnóstico da tuberculose latente.

As quimiocinas mostraram um padrão contrário ao das citocinas. Nesse sentido, apresentou-se como melhor biomarcador a quimiocina CCL2 para os indivíduos do grupo LID-1(-) (AUC=0.61,  $p=0.02$ , sensibilidade=34,18%, especificidade=88,31%).

Figura 10 - Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+)

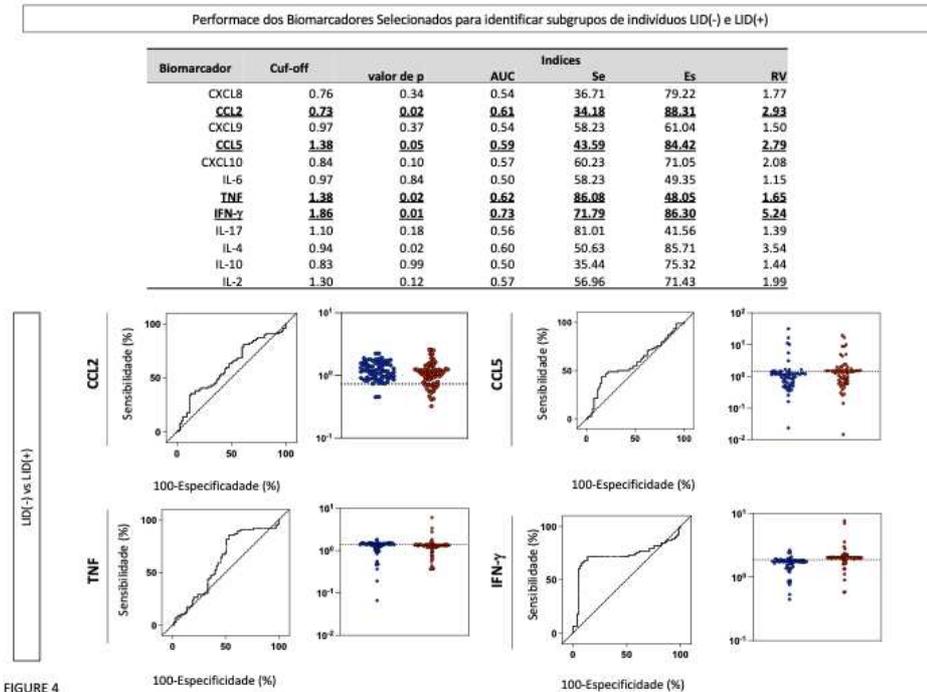


FIGURE 4

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 10.** Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar indivíduos dos grupos de LID-1 (-) e LID-1 (+). O desempenho das citocinas TNF, IFN-g e quimiocinas CCL5 e CCL2 secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura *in vitro* para classificar LID-1 (-) e LID-1 (+) foi calculado pela análise da curva de característica de operação do receptor (ROC). A área sob a curva (AUC) indica a precisão global de cada biomarcador usando limites específicos. Os índices de desempenho, incluíram sensibilidade (Se), especificidade (Es), razão de verossimilhança (LR). Os gráficos de dispersão ilustram em detalhes o desempenho dos 4 principais biomarcadores para classificar os grupos, incluindo CCL2 e CCL5 para identificar as diferenças entre LID-1 (-) vs LID-1 (+), e TNF e IFN-

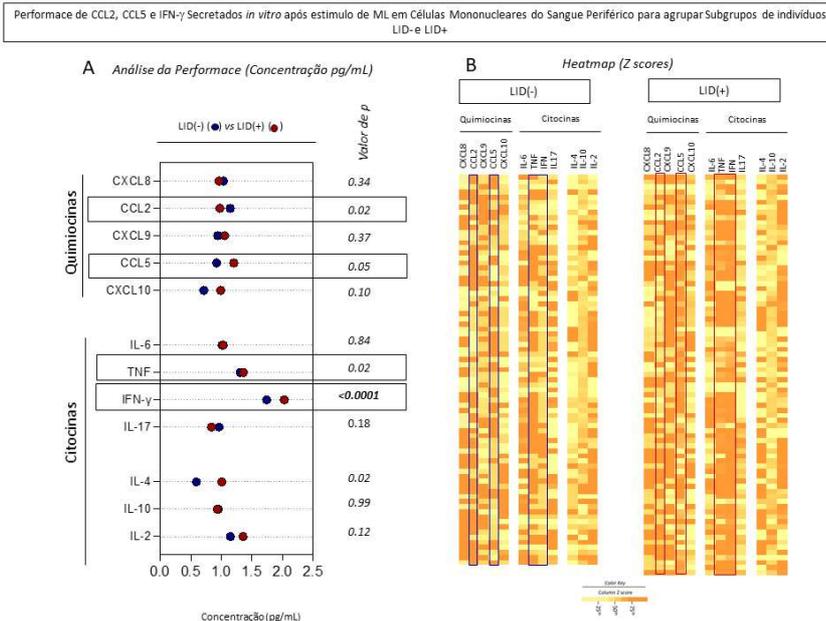
g para identificar as diferenças entre LID-1 (+) vs LID-1 (-). Indicando alta precisão para o biomarcador IFN- $\gamma$  (AUC = 0,73). As frequências de indivíduos classificados em cada grupo são fornecidas na figura. A linha pontilhada representa os pontos de corte selecionados pela análise da curva ROC. CC indica cultura controle; *M. leprae* indica cultura estimulada.

Com o objetivo de transpor os achados laboratoriais para biomarcadores de aplicação clínica, foi realizada análise translacional para determinar o desempenho de quimiocinas e citocinas medidas no sobrenadante de PBMC estimuladas *in vitro* por *M. leprae* de indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+). Para isso, foram construídas curvas características de operação do receptor (ROC) e a área sob a curva (AUC) foi usada como um indicador de precisão global. A análise dos dados demonstrou que a quimiocina CCL2 apresentou bom desempenho para classificar o grupo LID-1 (-) com precisão global (AUC=0.61). Em contrapartida, a citocina IFN- $\gamma$  demonstrou ser o melhor biomarcador seletivo para o grupo LID (+) com AUC=0.73. Nossos dados destacam a quimiocina CCL2 para o grupo LID-1 (-) com p valor 0.02, e em contrapartida a citocina IFN- $\gamma$  associada ao grupo LID-1 (+) com p valor de < 0.0001. (Figura 11A)

A construção do *heatmap* utilizando o Z-score (Figura 11B) confirmou o melhor desempenho dos biomarcadores CCL2 para o grupo LID-1 (-) e a citocina IFN- $\gamma$  para o grupo LID-1 (+).

A associação das citocinas TNF e IFN- $\gamma$  ficaram evidentes por meio da construção do *heatmap*. Nesse sentido, a literatura confirma a produção de TNF e IFN- $\gamma$  simultaneamente em várias patologias, com destaque para a esquistossomose que vem sendo estudada pelo nosso grupo.

Figura 11 - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+) por meio de avaliação quantitativa e qualitativa.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 11.** Desempenho de quimiocinas e citocinas secretadas *in vitro* por células mononucleares do sangue periférico estimuladas por *M. leprae* para agrupar indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+). Os níveis de quimiocinas (CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10) e citocinas (IL-6, TNF, IFN-g, IL-17, IL-4, IL-10 e IL-2) foram medidos no sobrenadante coletado após cultura de PBMC *in vitro* estimulada por *M. leprae*. (11A) A análise quantitativa foi realizada por *Cytometric Beads Array* (CBA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados são expressos em pg/mL indicando os valores médios. Diferenças significativas com  $p < 0,05$  para cada biomarcador são destacadas por retângulos contínuos. Em negrito destaca-se o valor de  $p < 0.0001$  para a citocina IFN-g. (11B). As construções do *Heatmap* foram realizadas usando formatação condicional no Microsoft Excel Office versão 2019. Uma chave de cores foi empregada para identificar grupos de indivíduos com níveis distintos (baixos ou altos) de quimiocinas e citocinas em cada grupos de indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+). Os biomarcadores capazes de agrupar os indivíduos LID-1 (-) e os indivíduos LID-1 (+) são destacados por retângulos contínuos, respectivamente.

#### 6.4.1 Resultados das redes.

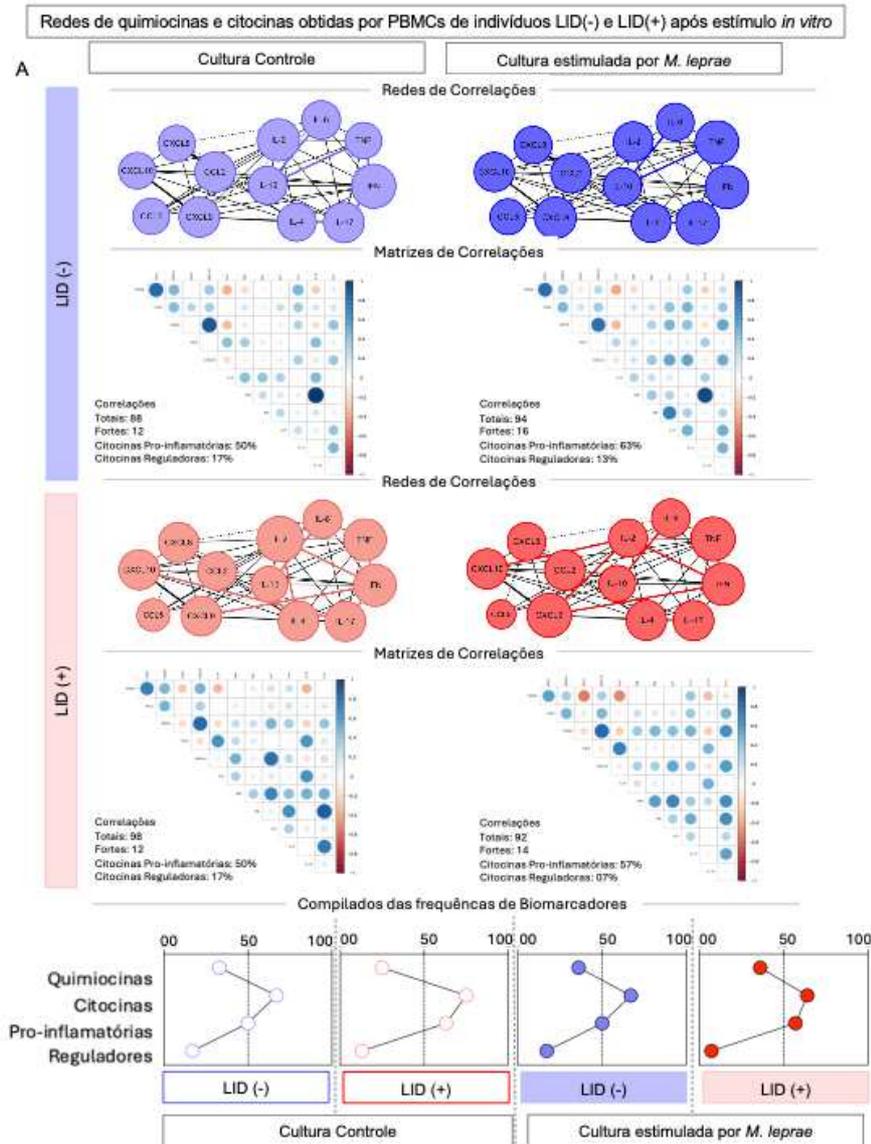
Os resultados apresentados na Figura 12 evidenciam redes de correlações entre os grupos estudados, baseadas na análise dos coeficientes de Spearman, e

revelam a interação entre os biomarcadores analisados. No grupo LID-1(+), o número total de correlações observadas foi de 94, destacando uma correlação positiva entre as citocinas IFN- $\gamma$  e CXCL9, IL-2, IL-17 e TNF na cultura controle. Na cultura estimulada por *M. leprae*, foram identificadas 92 correlações, com correlações positivas evidentes entre IFN- $\gamma$  e CXCL9, IL-2 e TNF, além de uma associação positiva entre IL-2, CXCL10 e CXCL9.

Em contraste, nos indivíduos do grupo LID-1(-), foram observadas 88 correlações na cultura controle e 98 na cultura estimulada. Tanto na cultura controle quanto na estimulada, identificou-se uma correlação positiva consistente entre as citocinas IL-10, IL-6 e TNF. Notavelmente, ao analisar o número de correlações fortes ( $R > 0,8$ ) entre os grupos, observou-se que o grupo LID-1(+) apresentou 16 correlações na cultura controle, das quais 63% ocorreram entre citocinas pró-inflamatórias e 13% entre citocinas reguladoras. Na cultura estimulada, foram identificadas 14 correlações fortes, com 57% entre citocinas pró-inflamatórias e 7% entre reguladoras.

Por outro lado, o grupo LID-1(-) apresentou 12 correlações fortes em ambas as culturas, sendo 50% entre citocinas pró-inflamatórias e 17% entre reguladoras. Esses achados sugerem um perfil pró-inflamatório no grupo LID-1(+), caracterizado pela predominância de correlações entre citocinas e quimiocinas. A análise da frequência dos biomarcadores indica uma participação mais expressiva de citocinas pró-inflamatórias no grupo LID-1(+) em comparação com o grupo LID-1(-).

Figura 12 - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+) por meio de análises de Redes.



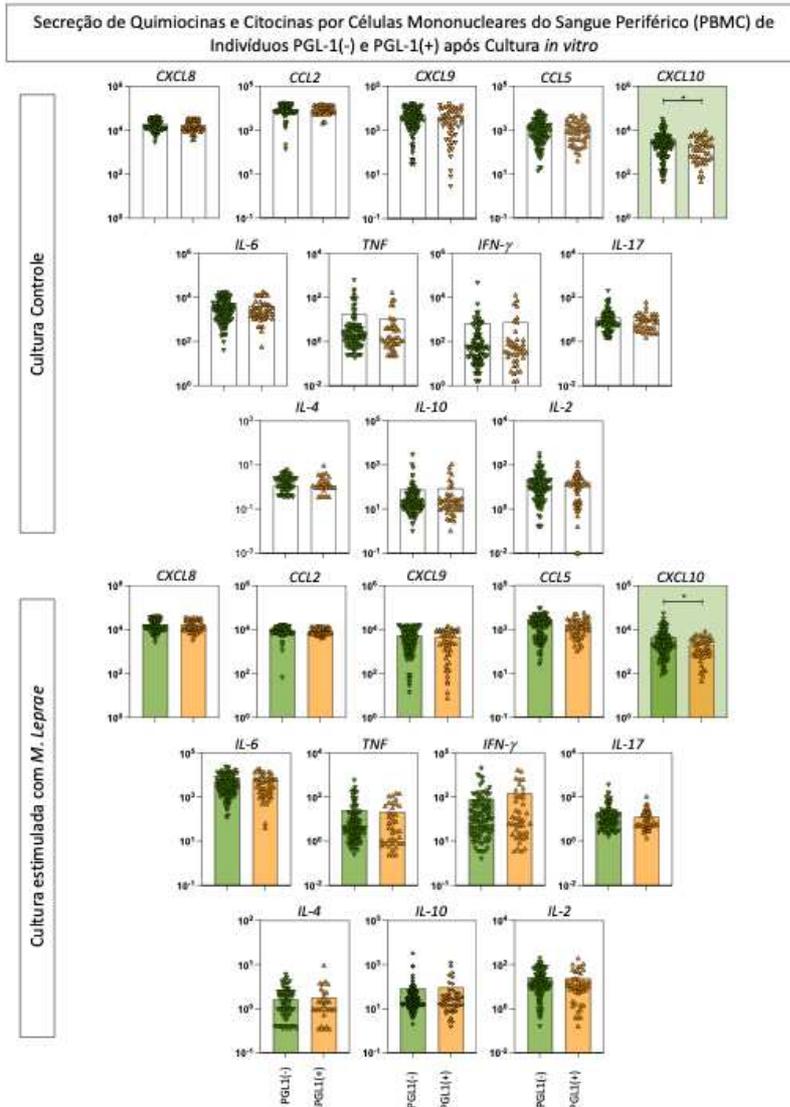
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 12.** Redes de correlações, matrizes de correlações e frequência compilada de biomarcadores de quimiocinas e citocinas obtidos a partir de PBMCs de indivíduos LID-1 (-) e LID-1 (+) após estímulo *in vitro* com *M. leprae*. A análise foi realizada em duas condições: cultura controle (sem estímulo) e cultura estimulada por *M. leprae*. As redes foram construídas com um layout circular baseado na excentricidade, considerando todas as correlações significativas. As redes em azul representam as correlações para os indivíduos LID-1 (-) e as redes em vermelho para os indivíduos LID-1 (+). As cores das linhas (azul e vermelho) indicam correlações positivas entre os biomarcadores inflamatórios. O tamanho dos nodos reflete o número de conexões; nodos com mais conexões são representados em tamanho maior.

#### 6.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS PGL (-) E PGL (+) APÓS CULTURA *IN VITRO*.

Os resultados revelaram que os indivíduos do grupo PGL-1 (-) exibiram uma resposta notável, com um aumento significativo na produção da quimiocina CXCL10, tanto na condição de cultura controle quanto na cultura estimulada. Esse comportamento sugere uma ativação robusta e persistente de CXCL10 nesses indivíduos, independentemente da presença de estímulo, destacando o papel potencial dessa quimiocina como um marcador de resposta diferencial no grupo PGL-1 (-) (Figura 13).

Figura 13 - Secreção de quimiocinas e citocinas por Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) dos indivíduos dos grupos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) após cultura *in vitro*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 13.** 1º resultados PGL-1. Visão panorâmica de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura *in vitro*. Análise de CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10, IL-6, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-2, IL-10 foi realizada após cultura *in vitro* de PBMC de indivíduos PGL (-) (■, n=104) e PGL (+) (■, n=47) na ausência de estímulo antigênico (cultura não estimulada) e na presença do antígeno do *M. leprae* (cultura estimulada). Os resultados são apresentados no formato boxplot, indicando os valores medianos (min-máx) das concentrações de quimiocinas e citocinas (pg/mL). A análise comparativa entre os grupos foi realizada pelo Teste de *Mann-Whitney*. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas por linhas de conexão com (\*).

#### 6.6 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR PBMC DOS INDIVÍDUOS DOS GRUPOS PGL-1 (-) E PGL-1 (+) APÓS CULTURA *IN VITRO*.

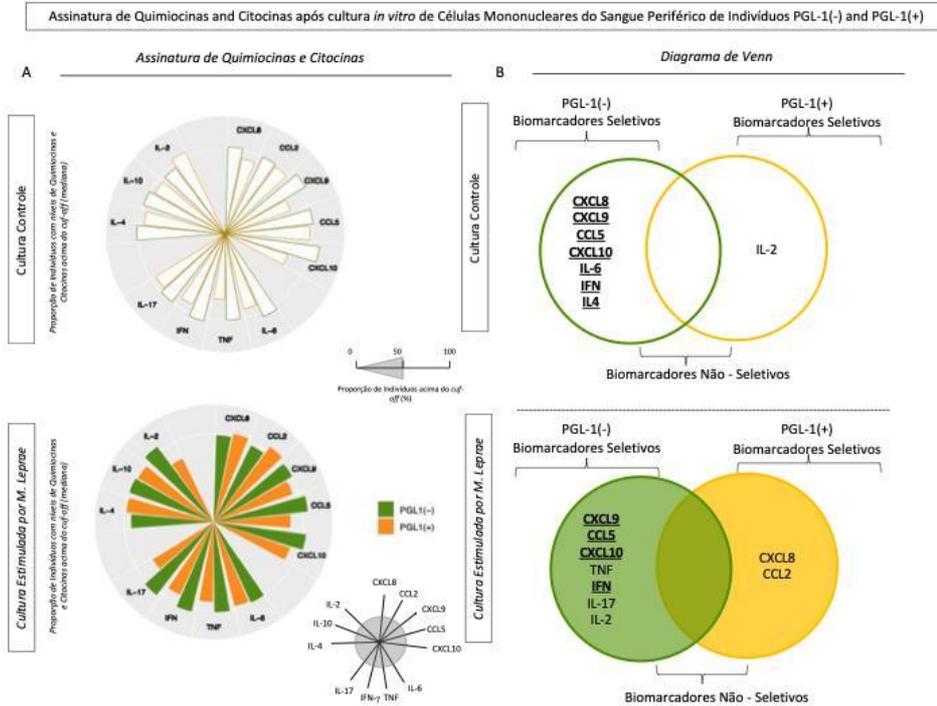
A análise complementar desses resultados, realizada por meio da conversão das assinaturas de quimiocinas e citocinas em dados categóricos, revelou nuances adicionais entre os indivíduos dos grupos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) que não foram detectadas na análise convencional das variáveis contínuas.

Foi construído um gráfico de barras circulares para destacar os altos produtores — indivíduos cujos níveis estavam acima da mediana ou do ponto de corte definido. No grupo de indivíduos PGL-1 (-), observou-se, na cultura não estimulada, uma proporção elevada de altos respondedores (acima de 50%) para as quimiocinas CXCL8, CXCL9, CCL5, CXCL10 e para as citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-4. Já na cultura estimulada com *M. leprae*, houve um aumento significativo na proporção de altos respondedores, especialmente para as quimiocinas CXCL9, CCL5, CXCL10 e para as citocinas TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-2.

Em contraste, os indivíduos do grupo PGL-1 (+) apresentaram, na cultura não estimulada, uma maior proporção de altos respondedores apenas para a citocina IL-2. Contudo, na cultura estimulada com *M. leprae*, destacou-se uma proporção elevada de altos respondedores para as quimiocinas CXCL8 e CCL2 (Figura 13).

Com base nessa análise, foi elaborado um Diagrama de Venn para comparar o perfil de resposta imune dos grupos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) nas condições de cultura controle e estimulada. Os resultados identificaram os principais marcadores que diferenciam os grupos: CXCL9, CCL5, CXCL10 e a citocina IFN- $\gamma$  no grupo PGL-1 (-), reforçando sua importância como potenciais indicadores de distinção entre os grupos.

Figura 14- Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos PGL-1 (-) e PGL-1(+) – Gráfico de Barras Circulares / Diagrama de Venn.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 14.** Assinatura de quimiocinas e citocinas em indivíduos dos grupos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) após cultura de PBMC *in vitro*. A análise da assinatura de quimiocinas e citocinas foi realizada conforme descrito em materiais e métodos. Variáveis contínuas expressas em pg/mL foram convertidas em dados categóricos utilizando os valores da mediana intrínseca para a cultura não estimulada do grupo PGL-1 (CXCL8=706.7 pg/mL, CCL2=11.605 pg/mL, CXCL9=0.9917 pg/mL, CCL5=80.495 pg/mL, CXCL10=21.570 pg/mL, IL-6=18444.9 pg/mL, TNF=9008.2 pg/mL, IFN-g=4664.1 pg/mL, IL-17=1424.5 pg/mL, IL-4=3374.9 pg/mL, IL-2=15.746 pg/mL, IL-10=4241.1 pg/mL) e cultura estimulada com *M. leprae* (CXCL8=10.205 pg/mL, CCL2=17.513 pg/mL, CXCL9=1.110 pg/mL, CCL5=87.181 pg/mL, CXCL10=25.514 pg/mL, IL-6=17516.0 pg/mL, TNF=8962.4 pg/mL, IFN-g =5111.1 pg/mL, IL-17=1892.9 pg/mL, IL-4=3860.5 pg/mL, IL-2=24.346 pg/mL, IL-10=5417.3 pg/mL) como *cut-off*. A proporção de participantes com níveis elevados de quimiocinas e citocinas foi calculada

para cada grupo de estudo e os dados apresentados através do gráfico de barras circulares A e diagrama de cores B. A cultura controle está representada com imagens vazadas, enquanto a cultura estimulada por *M.leprae* por imagens preenchidas. Os biomarcadores selecionados em ambas as culturas foram destacados em negrito e sublinhados

O gráfico abaixo apresenta a avaliação do "*fold change*" (mudança relativa) das quimiocinas e citocinas entre os grupos PGL-1 (+) e PGL-1 (-), destacando as diferenças na expressão desses biomarcadores. Notavelmente, a quimiocina CXCL10 mostrou-se presente tanto na cultura controle quanto na cultura estimulada para o grupo PGL-1 (-), sugerindo uma expressão consistente independentemente do estímulo.

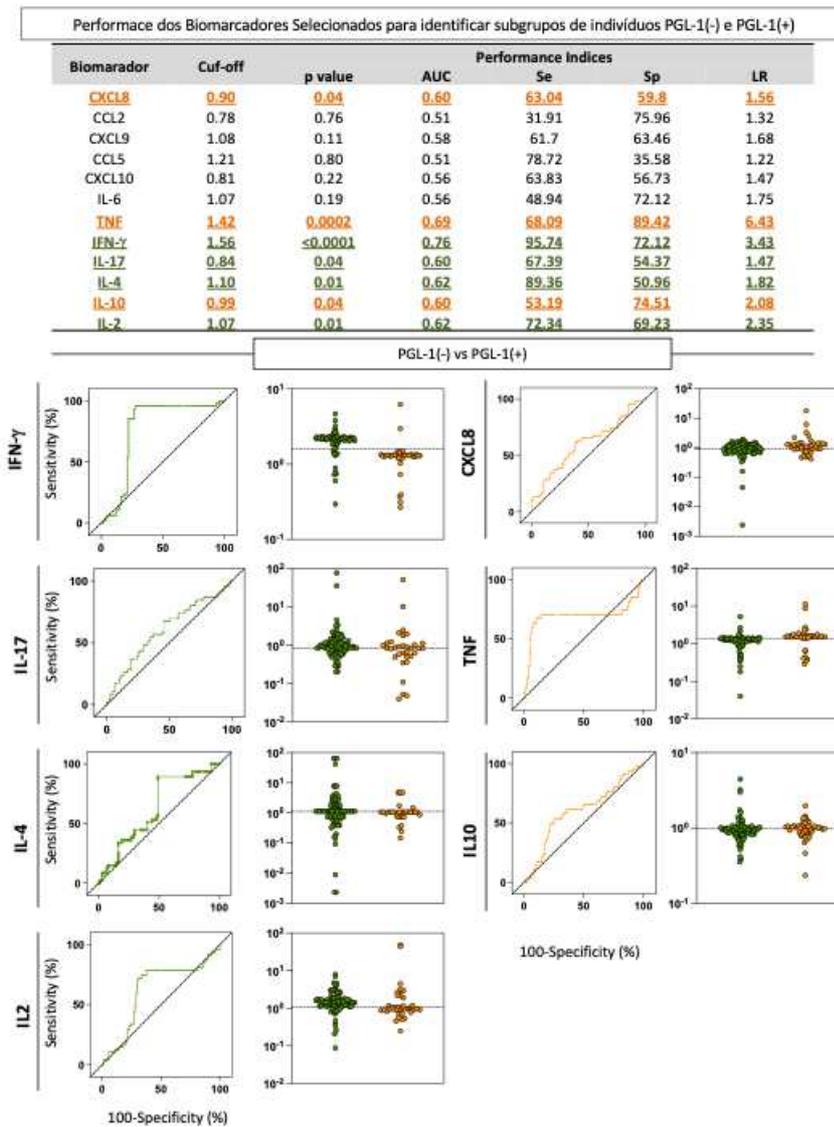
No Volcano plot, que utiliza o valor delta, identificou-se na cultura controle uma expressão destacada das quimiocinas CXCL10 e CXCL9 nos indivíduos do grupo PGL-1 (-), indicando uma resposta diferencial que pode ter implicações importantes na caracterização desse grupo. Esses achados reforçam o papel potencial dessas quimiocinas como indicadores relevantes na distinção entre os grupos PGL-1 (+) e PGL-1 (-) (Figura 15).



IL-2 (CUT-OFF=1.07, p-valor=0.01, AUC=0.62, sensibilidade=72.34%, especificidade=69.23%, LR=2.35). Diferentemente, os biomarcadores que apresentaram resultado significativo para o grupo do PGL-1 (+) foram: CXCL8 (CUT-OFF=0.90, p-valor=0.04, AUC=0.60, sensibilidade=63.04%, especificidade=59.8%, LR=1.56) TNF (CUT-OFF=1.42, p-valor=0.0002, AUC=0.69, sensibilidade=68.09%, especificidade=89.42%, LR=6.43) e IL-10 (CUT-OFF=1.07, p-valor=0.01, AUC=0.62, sensibilidade=72.34%, especificidade=69.23%, LR=2.35).

Com o objetivo de transformar os achados laboratoriais em biomarcadores aplicáveis clinicamente, foi realizada análise translacional para determinar o desempenho de quimiocinas e citocinas medidas no sobrenadante de PBMC estimuladas *in vitro* por *M. leprae* de indivíduos PGL-1 (-) e PGL-1 (+). Para isso, foram construídas curvas características de operação do receptor (ROC) e a área sob a curva (AUC) foi usada como um indicador de precisão global. A análise dos dados demonstrou que a citocina TNF e quimiocina CXCL8 apresentaram bom desempenho para classificar o grupo PGL-1 (+) com precisão global (AUC=0.69, AUC=0.60, respectivamente). Em contrapartida, a citocina IFN- $\gamma$  demonstrou ser o melhor biomarcador seletivo para o grupo PGL-1 (-) com AUC=0.76 (Figura 16).

Figura 16 - Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos PGL-1 (-) e PGL-1 (+).

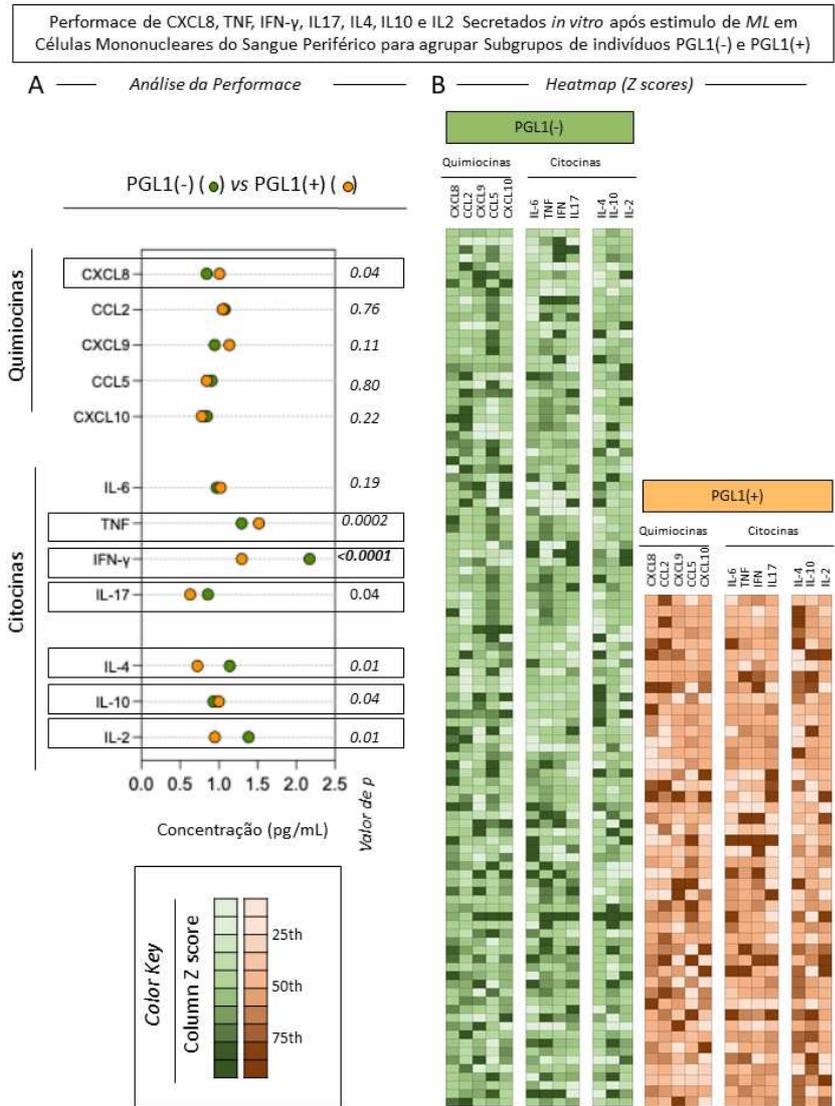


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 16.** Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar indivíduos dos grupos de PGL-1 (-) e PGL-1 (+). O desempenho das citocinas TNF, IFN- $\gamma$ , IL17, IL4, IL10 e IL2 e quimiocina CXCL8 secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura *in vitro* para classificar PGL-1 (-) e PGL-1 (+) foi calculado pela análise da curva de característica de operação do receptor (ROC). A área sob a curva (AUC) indica a precisão global de cada biomarcador usando limites específicos. Os índices de desempenho, incluíram sensibilidade (Se), especificidade (Sp), razão de verossimilhança (LR). Os gráficos de dispersão ilustram em detalhes o desempenho dos 7 principais biomarcadores para classificar os grupos, incluindo IFN- $\gamma$ , IL17, IL4 e IL2 para identificar as diferenças entre PGL-1 (-) vs PGL-1 (+), e CXCL8, TNF e IL10 para identificar as diferenças entre PGL-1 (+) vs PGL-1 (-).

A construção do *heatmap* utilizando o Z-score (Figura 17) confirmou o melhor desempenho dos biomarcadores IFN- $\gamma$  para o grupo PGL-1 (-) e a citocina TNF e a quimiocina CXCL8 para o grupo PGL-1 (+).

Figura 17 - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) por meio de avaliação quantitativa e qualitativa.



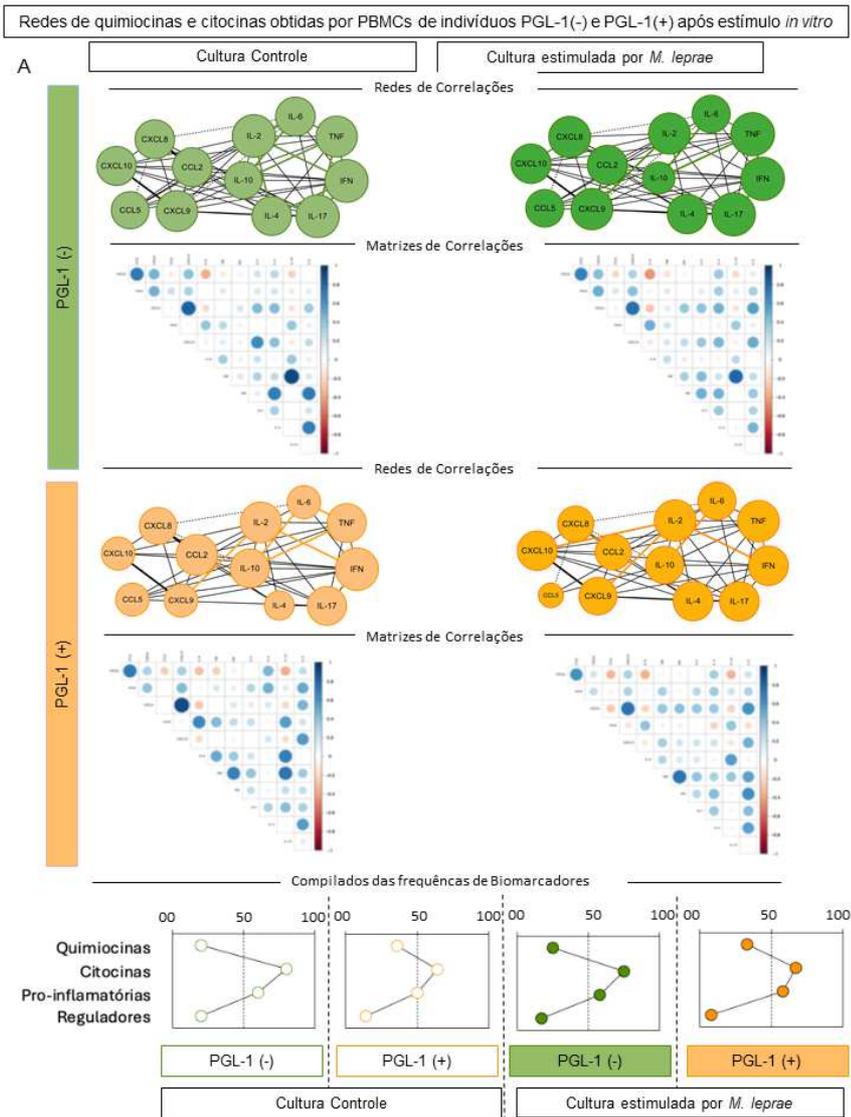
Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 17.** Desempenho de quimiocinas e citocinas secretadas *in vitro* por células mononucleares do sangue periférico estimuladas por *M. leprae* para agrupar indivíduos PGL (-) e PGL (+). Os níveis de quimiocinas (CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10) e citocinas (IL-6, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-10 e IL-2) foram medidos no sobrenadante coletado após cultura de PBMC *in vitro* estimulada por *M. leprae*. (16A) A análise quantitativa foi realizada por *Cytometric Beads Array* (CBA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados são expressos em pg/mL indicando os valores médios. Diferenças significativas com  $p < 0,05$  para cada biomarcador são destacadas por retângulos contínuos. Em negrito destaca-se o valor de  $p < 0.0001$  para a citocina IFN- $\gamma$ . (16B). As construções do *Heatmap* foram realizadas usando formatação condicional no Microsoft Excel Office versão 2019. Uma chave de cores foi empregada para identificar grupos de indivíduos com níveis distintos (baixos ou altos) de quimiocinas e citocinas em cada grupo de indivíduos PGL-1 (-) e PGL-1 (+). Os biomarcadores capazes de agrupar os indivíduos PGL-1 (-) e os indivíduos PGL-1 (+) são destacados por retângulos contínuos, respectivamente.

Os resultados apresentados na Figura 18 destacam as redes de correlações observadas entre os grupos estudados. Nos indivíduos PGL-1(-), tanto na cultura controle quanto na cultura estimulada, identificou-se uma correlação consistente entre as citocinas TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17, caracterizando um perfil inflamatório robusto. Esse achado aponta para a presença de uma tríade pró-inflamatória específica neste grupo, a qual pode ter implicações significativas na modulação da resposta imune. O número total de correlações neste grupo foi de 102 na cultura controle, das quais 20 foram fortes ( $R > 0,8$ ), com 60% entre citocinas pró-inflamatórias e 20% entre citocinas reguladoras. Na cultura estimulada, foram observadas 100 correlações totais, sendo 12 fortes, com 58% entre citocinas pró-inflamatórias e 17% entre reguladoras.

Interessantemente, essa mesma tríade inflamatória (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17) não foi observada entre os indivíduos do grupo PGL-1(+), indicando uma diferenciação clara no perfil de resposta inflamatória entre os grupos. Adicionalmente, no grupo PGL-1(+), verificou-se uma correlação exclusiva entre IL-2 e a quimiocina CXCL10, sugerindo um possível mecanismo de regulação distinto e potencialmente menos inflamatório. Esse grupo apresentou 76 correlações totais na cultura controle, sendo 14 fortes, com 50% entre citocinas pró-inflamatórias e 14% entre reguladoras. Após o estímulo com *M. leprae*, o número total de correlações observado foi de 86, das quais 12 foram fortes, com 58% entre citocinas pró-inflamatórias e 8% entre reguladoras.

Figura 18 - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) por meio de análises de Redes.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 18:** Redes de correlações, matrizes de correlações e compilados das frequências de biomarcadores de quimiocinas e citocinas obtidos a partir de PBMCs de indivíduos PGL-1 (-) e PGL-1 (+) após estímulo *in vitro* com *M. leprae*. A análise foi realizada em duas condições: cultura controle (sem estímulo) e cultura estimulada por *M. leprae*. As redes foram construídas usando um layout circular baseado na excentricidade, considerando todas as correlações significativas. As redes em verde, representam correlações para os indivíduos PGL-1 (-) ● e as redes laranja para os indivíduos PGL-1 (+) ●. As cores das linhas (verde e laranja) representam a correlação positiva entre os biomarcadores. O tamanho do nó indica o número de conexões; quanto mais conexões, maior o nó.

#### 6.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS GRUPOS INDIVÍDUOS LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+PGL1(-) E LID1(+PGL1(+ APÓS CULTURA *IN VITRO*.

Os resultados indicaram que os indivíduos do grupo LID1(+)/PGL(-) apresentaram níveis significativamente elevados da quimiocina CXCL10 em comparação com os grupos LID1(-)/PGL(-) e LID(+)/PGL(+), destacando uma resposta diferencial importante. Em relação à citocina IFN- $\gamma$ , observou-se um aumento significativo nos seguintes grupos: LID1(+)/PGL(-) vs LID1(-)/PGL(-), LID1(+)/PGL(+ vs LID1(-)/PGL(-) e LID1(-)/PGL(+ vs LID1(-)/PGL(-) na cultura controle, sugerindo variações importantes entre os perfis de resposta inflamatória.

Na cultura estimulada, observou-se uma diferença significativa na produção de CCL5 entre os grupos LID1(-)/PGL(-) vs LID(+)/PGL(+), LID1(-)/PGL(+ vs LID1(+)/PGL(+ e LID1(-)/PGL(+ vs LID(+)/PGL(-), indicando uma resposta mais complexa à estimulação antigênica. Adicionalmente, a quimiocina CXCL10 apresentou níveis significativamente mais altos no grupo LID1(+)/PGL(-) em comparação ao grupo LID1(+)/PGL(+).

Por fim, em relação à citocina IFN- $\gamma$ , houve uma diferença significativa entre os grupos LID1(-)/PGL(-) e LID1(+)/PGL(+). Observou-se também uma diferença na produção de IL-2 entre os grupos LID1(+)/PGL(-) e LID1(-)/PGL(-), indicando respostas imunes distintas (Figura 19).



**Figura 19.** Visão panorâmica de quimiocinas e citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura *in vitro*. Análise de CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10, IL-6, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4, IL-2, IL-10 foi realizada após cultura *in vitro* de PBMC dos grupos de indivíduos LID1(-)PGL1(-) (n=57), LID1(-)PGL1(+) (n=17), LID1(+)PGL1(-) (n=47) e LID1(+)PGL1(+) (n=30) na ausência de estímulo antigênico (cultura não estimulada) e na presença do antígeno do *M. leprae* (cultura estimulada). Os resultados são apresentados no formato boxplot, indicando os valores medianos (min-max) das concentrações de quimiocinas e citocinas (pg/mL). A análise comparativa entre os grupos foi realizada pelo Teste de *Mann-Whitney*. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas por linhas de conexão regular (—) (Entre o 1° e 2° grupo / entre o 3° e 4° últimos grupo), linha de conexão tracejada (---) (Entre o 1° e 3° / e entre o 2° e 4° grupo).

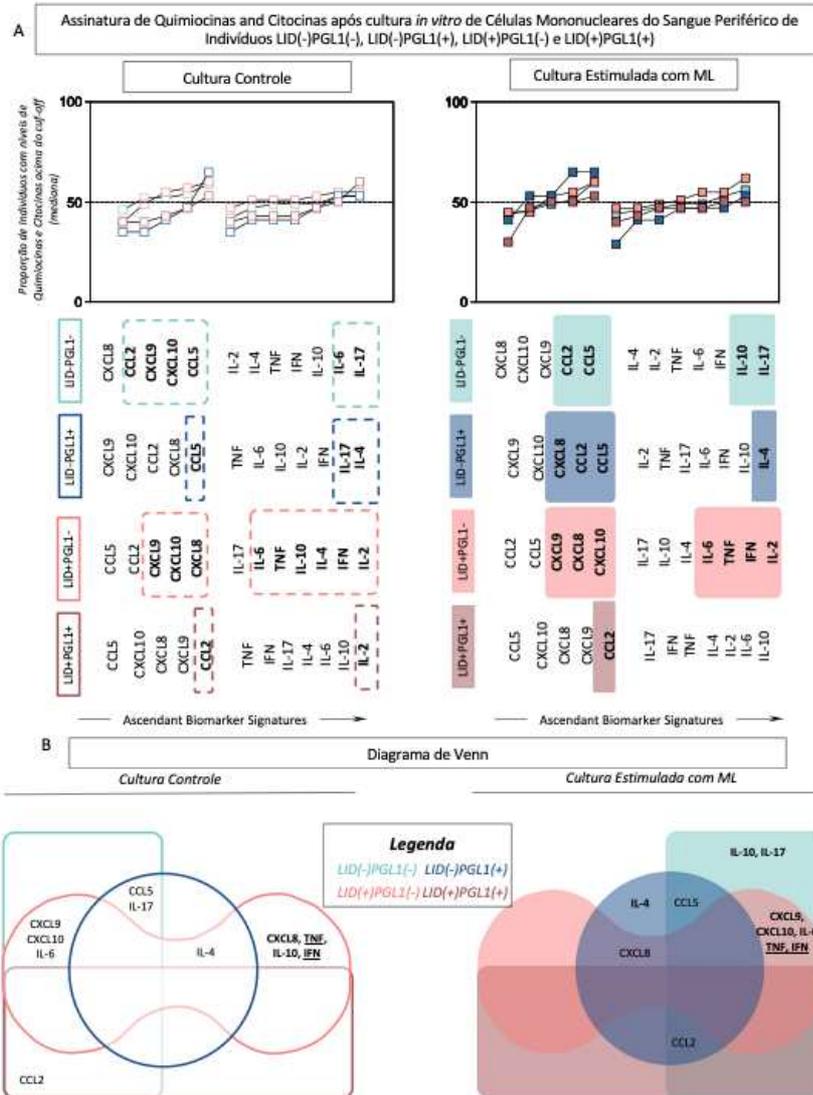
#### 6.8 ANÁLISE DE ASSINATURAS DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS SECRETADAS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC) DOS GRUPOS INDIVÍDUOS LID-1(-)PGL-1(-), LID-1(-)PGL-1(+), LID-1(+PGL-1(-) E LID-1(+PGL-1(+ APÓS CULTURA *IN VITRO*.

A fim de acessar os biomarcadores com níveis acima da mediana ou ponto de corte, construiu-se uma curva ascendente de quimiocinas e citocinas, indicando a proporção de indivíduos que apresentam esses valores elevados. Na cultura controle, foram obtidos os seguintes resultados para cada grupo: no grupo LID1(-)PGL1(-), observou-se a presença de CCL2, CXCL9, CXCL10, CCL5, IL-6 e IL-17; no grupo LID1(-)PGL1(+), foram detectados CCL5, IL-17 e IL-4; para o grupo LID1(+)PGL1(-), foram identificados CXCL9, CXCL10, CXCL8, IL-6, TNF, IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-2; e, por fim, no grupo LID1(+)PGL1(+), destacaram-se CCL2 e IL-2. Na cultura estimulada, os biomarcadores observados foram os seguintes: no grupo LID(-)PGL1(-), CCL2, CXCL5, IL-10 e IL-17; para o grupo LID1(-)PGL1(+), CXCL8, CCL2, CCL5 e IL-4; no grupo LID1(+)PGL1(-), CXCL9, CXCL8, CXCL10, IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-2; e no grupo LID1(+)PGL1(+), CCL2. (Figura 20A)

A Figura 20B representa o Diagrama de Venn, que compara o perfil de resposta imune entre os grupos. Na cultura controle, os biomarcadores comuns identificados foram CXCL9, CXCL10 e IL-6 para os grupos LID1(-)PGL1(-) e LID1(+)PGL1(-); CCL5 e IL-17 para os grupos LID1(-)PGL1(-) e LID1(-)PGL1(+); CXCL8, TNF, IL-10 e IFN- $\gamma$  para o grupo LID1(+)PGL1(-); IL-4 para os grupos LID1(-)PGL1(+) e LID1(+)PGL1(-); e CCL2 para os grupos LID1(+)PGL1(+) e LID1(-)PGL1(-). Na cultura estimulada, os biomarcadores comuns aos respectivos grupos foram IL-10 e IL-17 para o grupo LID(-)PGL1(-); CXCL9, CXCL10, IL-6, TNF e IFN- $\gamma$  para os grupos LID(-)PGL1(-) e

LID(+)PGL1(-); CCL5 para o grupo LID1(-)PGL1(-) e LID1(-)PGL1(+); IL-4 para o grupo LID1(-)PGL1(+); CXCL8 para os grupos LID1(-)PGL1(+) e LID1(+PGL1(-); e CCL2 para os grupos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+) e LID1(+PGL1(+). Ressalta-se que os biomarcadores TNF e IFN- $\gamma$  foram comuns em ambas as condições de cultura para o grupo LID1(+PGL1(-), reforçando o caráter pró-inflamatório desse grupo.

Figura 20 - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos grupos de indivíduos para LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+PGL1(-) e LID1(+PGL1(+)) – Curva Ascendente / Diagrama de Venn.

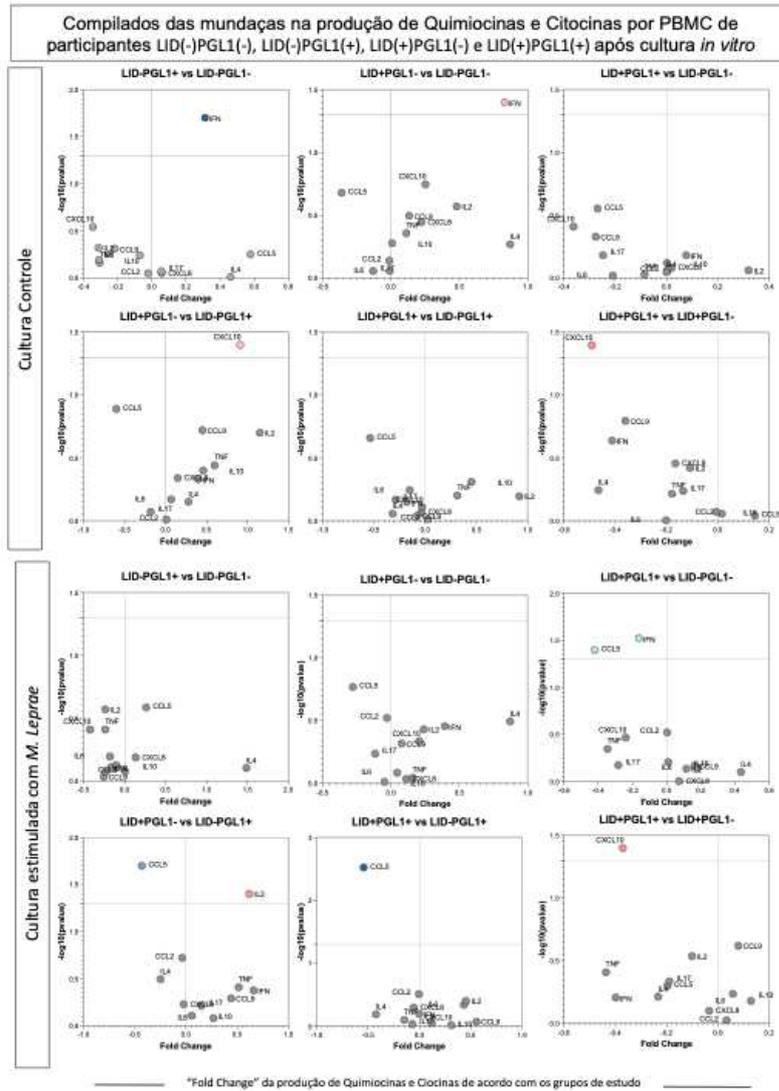


Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 20A.** Assinatura de quimiocinas e citocinas em indivíduos dos grupos de indivíduos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+)PGL1(-) e LID1(+)PGL1(+) após cultura de PBMC *in vitro*. A análise da assinatura de quimiocinas e citocinas foi realizada conforme descrito em materiais e métodos. Variáveis contínuas expressas em pg/mL foram convertidas em dados categóricos utilizando os valores da mediana intrínseca para a cultura não estimulada dos quatro grupos cultura controle (CXCL8=36.42 pg/mL, CCL2=6.07 pg/mL, CXCL9=0.39 pg/mL, CCL5=18.16 pg/mL, CXCL10=10.26 pg/mL, IL-6=13333.1 pg/mL, TNF=7278.3 pg/mL, IFN- $\gamma$  = 3350.7 pg/mL, IL-17=891.4 pg/mL, IL-4=1901.5 pg/mL, IL-2=1.51 pg/mL, IL-10=2540.2pg/mL) e cultura estimulada com *M. leprae* (CXCL8=75.29 pg/mL, CCL2= 7.37 pg/mL, CXCL9=0.73 pg/mL, CCL5=23.31 pg/mL, CXCL10=12.13 pg/mL, IL-6=13015.3 pg/mL, TNF- $\alpha$ =7200.4 pg/mL, IFN- $\gamma$ =3692.8 pg/mL, IL-17=15558 pg/mL, IL-4=1872.7 pg/mL, IL-2=3.25 pg/mL, IL-10=3679.8 pg/mL) como *cut-off*. A proporção de participantes com níveis elevados de quimiocinas e citocinas foi calculada para cada grupo de estudo e os dados apresentados por meio da curva ascendente. Foram utilizados para construção da curva ascendente os quadrados vazados com linha tracejada para a cultura controle e para a cultura estimula os quadrados coloridos com linha contínua mantendo o padrão de cores. A **Figura 20B** indica o diagrama de Venn que foi empregado para identificar o conjunto de quimiocinas e citocinas seletivamente aumentadas nos grupos: LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+)PGL1(-), LID1(+)PGL1(+) sendo para cultura controle formas vazadas, cultura estimula formas preenchidas. Os biomarcadores em ambas as culturas foram destacados em negrito e sublinhados.

A Figura 21 demonstra o gráfico do volcano plot utilizando o "*fold change*" (mudança relativa) na produção das quimiocinas e citocinas entre os grupos. Observa-se a presença da citocina IFN- $\gamma$  aumentada no grupo LID1(-)PGL1(+) quando comparado com o grupo LID1(-)PGL1(-), e permanece aumentada no grupo LID1(+)PGL1(-) vs LID1(-)PGL1(-). Interessante notar que a quimiocina CXCL10 encontra-se diminuída no grupo LID1(+)PGL1(+) em relação ao grupo LID1(+)PGL1(-) na cultura controle. Na cultura estimulada a quimiocina CCL5 encontra-se diminuída nos seguintes grupos, respectivamente: LID1(+)PGL1(+) vs LID1(-)PGL1(-); LID1(+)PGL1(-) vs LID1(-)PGL1(+); LID1(+)PGL1(+) vs LID1(-)PGL1(+). Ressalta-se que a citocina IFN- $\gamma$  encontra-se diminuída no grupo LID1(+)PGL1(+) vs o LID1(-)PGL1(-). Nota-se que a citocina IL-2 apresenta-se aumentada no grupo LID1(+)PGL1(-) vs LID1(-)PGL1(+), e a citocina CXCL10 diminuída no grupo LID1(+)PGL1(+) versus LID1(+)PGL1(-).

Figura 21 - Assinaturas de quimiocinas e citocinas após cultura *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos dos grupos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+PGL1(-), LID1(+PGL1(+)) – Volcano Plot/ *Fold change*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 21.** Representa os dados em *Volcano plot dos participantes* dos grupos de indivíduos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+PGL1(-) e LID1(+PGL1(+). A posição horizontal (eixo X) de cada ponto indica a magnitude da mudança nos níveis das citocinas e quimiocinas. A posição vertical (eixo Y) representa o  $-\log_{10}$  do valor de P ( $< 0,05$ ) que equivale a 1,33. Os biomarcadores acima desse valor são considerados significativos. Observa-se os resultados das diferenças relativa (*Fold Change*) dos biomarcadores na cultura controle IFN-g aumentado LID1(-)PGL1(+ vs LID1(-)PGL1(-) e LID1(+PGL1(-) vs LID1(-)PGL1(-); CXCL10 aumentada LID1(+PGL1(-) vs LID1(-)PGL1(+); CXCL10 diminuída LID(+PGL1(+ vs LID1(-)PGL1(-). Na cultura estimulada a quimiocina CCL5 e a citocina IFN-g diminuídas no grupo LID(+PGL1(-) vs LID(-)PGL1(+); IL-2 aumentada e CCL5 diminuída no grupo LID1(+PGL1(-) vs LID1(-)PGL1(+); CCL5 diminuída no grupo LID1(+PGL1(+ vs LID1(-)PGL1(+); CXCL10 diminuída no grupo LID(+PGL1(+ vs LID1(+PGL1(-).

A Figura 22 apresenta o Volcano plot utilizando o delta valor para identificar as diferenças na expressão de quimiocinas e citocinas entre os grupos estudados. Na cultura controle, observou-se que as quimiocinas CXCL10, CXCL9 e TNF estavam reduzidas no grupo LID1(-)PGL1(+ em comparação ao grupo LID1(-)PGL1(+). No grupo LID1(+PGL1(-), CCL5 apresentou redução, enquanto CXCL8 estava aumentada em relação ao grupo LID1(-)PGL1(+). Comparando LID1(+PGL1(+ com LID1(-)PGL1(-), houve uma diminuição de CCL5 e CXCL10, enquanto IL-2 estava aumentada. Também foi observado que CCL5 estava reduzida e CXCL10 e IL-2 aumentadas no grupo LID1(+PGL1(-) em relação ao grupo LID1(-)PGL1(+). No grupo LID1(+PGL1(+ em comparação com LID(-)PGL1(+), CCL5 apresentou diminuição, enquanto IL-2 aumentou. Por fim, tanto CXCL8 quanto CXCL10 estavam diminuídas no grupo LID1(+PGL1(+ em comparação com LID1(+PGL1(-).

É importante destacar que os mediadores CXCL10 e IL-2 estavam aumentados no grupo LID1(+PGL1(-), caracterizado por um perfil pró-inflamatório, o que reforça os resultados observados em análises anteriores. Curiosamente, notou-se uma redução de CXCL10 no grupo duplo positivo (LID1(+PGL1(+)), onde era esperado um perfil mais inflamatório, o que sugere uma resposta imune diferenciada nesse grupo específico.

Na cultura estimulada, observou-se um aumento de CXCL10 e IL-2 no grupo LID1(+PGL1(-) em comparação com os grupos LID1(-)PGL1(-) e LID1(-)PGL1(+), o que reforça ainda mais o caráter pró-inflamatório desse grupo.



**Figura 22.** No Volcano plot utilizando o delta valor encontra-se na cultura controle as quimiocinas CXCL10, CXCL9 e TNF diminuídas no grupo LID1(-)PGL1(+) vs LID(-)PGL1(+); CCL5 diminuída e CXCL8 aumentada no grupo LID1(+)PGL1(-) vs LID(-)PGL1(+); CCL5 e CXCL10 diminuídas e IL-2 aumentada no grupo LID(+)PGL1(+) vs LID1(-)PGL1(-); CCL5 diminuídas e CXCL10 e IL-2 aumentadas no grupo LID1(+)PGL1(-) vs LID1(-)PGL1(+); CCL5 diminuída e IL-2 aumentada no grupo LID1(+)PGL1(+) vs LID1(-)PGL1(+); CXCL8 e CCL10 diminuídas no grupo LID1(+)PGL1(+) vs LID(+PGL1(-). Na cultura estimulada IL-2 e IL-17 diminuídas no grupo LID(-)PGL1(+) vs LID(-)PGL1(-); CCL5 diminuída e IL-2 e CXCL10 aumentada no grupo LID1(+)PGL1(-) vs LID1(-)PGL1(-); CCL5 e IL-17 diminuídas no grupo LID1(+)PGL1(+) vs LID1(-)PGL1(-); CCL5 diminuída e IL-2 e CXCL10 aumentadas no grupo LID1(+)PGL1(-) vs LID1(-)PGL1(+); CCL5 diminuída e IL-2 aumentada no grupo LID1(+)PGL1(+) vs LID1(-)PGL1(+); CCL5 e IL-2 diminuídas no grupo LID1(+)PGL1(+) vs LID1(+PGL1(-).

As Curvas ROC também foram construídas para demonstrar o desempenho das quimiocinas e citocinas selecionadas para agrupar os indivíduos (LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+)PGL1(-) e LID1(+)PGL1(+). Os biomarcadores que apresentaram melhor desempenho para o grupo LID1(-)PGL1(-) vs LID1 (-)PGL1 (+), foram CXCL8 (CUT-OFF=1.20,  $p=0,04$ , AUC=0.66, sensibilidade=52.94%, especificidade=82.14%, LR=2.95), IFN- $\gamma$  (CUT-OFF=1.10,  $p=0.0001$ , AUC=0.80, sensibilidade=76.47%, especificidade=94.74%, LR=14.53), para o grupo grupo LID1(-)PGL1(-) vs LID1 (+)PGL1 (-), foram IL-10 (CUT-OFF=1.28,  $p=0,03$ , AUC=0.66, sensibilidade=58.82%, especificidade=87.72%, LR=4.79), CXCL10 (CUT-OFF=0.84,  $p=0,04$ , AUC=0.61, sensibilidade=69.57%, especificidade=64.91%, LR=1.98), TNF (CUT-OFF=1.25,  $p=0.001$ , AUC=0.68, sensibilidade=82.98%, especificidade=92.98%, LR=11.82), IFN- $\gamma$  (CUT-OFF=0.98,  $p=<0.0001$ , AUC=0.82, sensibilidade=82.98%, especificidade=92.98%, LR=11.82), IL-4 (CUT-OFF=0.88,  $p=0.03$ , AUC=0.62, sensibilidade=55.32%, especificidade=78.57%, LR=2.58), para o grupo LID1(-)PGL1(-) vs LID1 (+)PGL1 (+), IFN- $\gamma$  (CUT-OFF=1.13,  $p=<0.0001$ , AUC=0.75, sensibilidade=70.00%, especificidade=94.74%, LR=13.3), IL-17 (CUT-OFF=1.04,  $p=0.006$ , AUC=0.68, sensibilidade=86.67%, especificidade=50.88%, LR=1.76), para o grupo LID1(-)PGL1(+) vs LID1 (-)PGL1 (+), foram CXCL8 (CUT-OFF=1.20,  $p=0.04$ , AUC=0.66, sensibilidade=52.94%, especificidade=82.14%, LR=2.95), IFN- $\gamma$  (CUT-OFF=1.10,  $p=0.0001$ , AUC=0.80, sensibilidade=76.47%, especificidade=94.74%, LR=15.53), IL-17 (CUT-OFF=0.90,  $p=0.01$ , AUC=0.68, sensibilidade=82.35%, especificidade=54.39%, LR=1.80), IL-10 (CUT-OFF=1.28,  $p=0.03$ , AUC=0.66, sensibilidade=58.82%, especificidade=87.72%, LR=4.79), para o grupo LID1(-)PGL1(-) vs LID1 (+)PGL1 (-), foram CXCL10 (CUT-OFF=0.84,  $p=0.04$ , AUC=0.61, sensibilidade=69.57%, especificidade=64.91%, LR=1.98), TNF (CUT-

OFF=1.25,  $p=0.001$ , AUC=0.68, sensibilidade=89.36%, especificidade=64.91%, LR=2.54), IFN- $\gamma$  (CUT-OFF=0.98,  $p<0.0001$ , AUC=0.82, sensibilidade=82.98%, especificidade=92.98%, LR=11.82), IL-4 (CUT-OFF=0.88,  $p=0.03$ , AUC=0.62, sensibilidade=55.32%, especificidade=78.57%, LR=2.58) e para o grupo LID1(-)PGL1(-) vs LID1 (+)PGL1 (+), IFN- $\gamma$  (CUT-OFF=1.13,  $p<0.0001$ , AUC=0.75, sensibilidade=70.00%, especificidade=94.74%, LR=13.3), IL-17 (CUT-OFF=1.04,  $p=0.006$ , AUC=0.68, sensibilidade=86.67%, especificidade=50.88%, LR=1.76). (Figura 23 A e B)

Figura 23 A - Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID1 vs PGL1.

Performance dos Biomarcadores Selecionados para identificar os grupos de indivíduos ( LID1 vs PGL1)							
	Biomarcador	Cuf-off	p value	Performance Indices			
				AUC	Se	Sp	LR
Grupo LID (-) PGL (-) x LID (-) PGL (+)	CXCL8	1.20	0.04	0.66	52.94	82.14	2.95
	CCL2	1.34	0.49	0.55	47.06	75.44	1.91
	CXCL9	1.08	0.25	0.59	61.7	63.46	1.68
	CCL5	0.19	0.35	0.57	41.18	80.70	2.13
	CXCL10	0.65	0.32	0.57	76.47	56.95	1.89
	IL-6	1.20	0.41	0.56	41.18	82.46	2.34
	TNF	1.47	0.10	0.63	47.06	91.23	5.36
	IFN- $\gamma$	1.10	0.0001	0.80	76.47	94.74	14.53
	IL-17	0.90	0.01	0.68	82.35	54.39	1.80
	IL-4	0.99	0.19	0.60	52.94	78.95	2.51
	IL-10	1.28	0.03	0.66	58.82	87.72	4.79
	IL-2	1.04	0.70	0.53	70.59	59.65	1.74
	Grupo LID (-) PGL (-) x LID (+) PGL (-)	CXCL8	0.71	0.54	0.53	44.68	75
CCL2		1.20	0.05	0.61	78.72	73.86	1.40
CXCL9		0.93	0.40	0.54	61.70	56.14	1.40
CCL5		1.31	0.16	0.57	44.68	85.96	3.18
CXCL10		0.84	0.04	0.61	69.57	64.91	1.98
IL-6		0.94	0.64	0.52	57.45	52.63	1.21
TNF		1.25	0.001	0.68	89.36	64.91	2.54
IFN- $\gamma$		0.98	<0.0001	0.82	82.98	92.98	11.82
IL-17		1.16	0.62	0.52	76.60	40.35	1.28
IL-4		0.88	0.03	0.62	55.32	78.57	2.58
IL-10		0.99	0.83	0.51	36.17	80.70	1.87
IL-2		1.47	0.004	0.66	61.70	78.95	2.93
Grupo LID (-) PGL (-) x LID (+) PGL (+)		CXCL8	0.70	0.72	0.52	43.33	75
	CCL2	0.97	0.03	0.63	63.33	64.91	1.80
	CXCL9	1.14	0.16	0.59	63.33	71.93	2.25
	CCL5	0.40	0.53	0.54	43.33	71.93	1.54
	CXCL10	1.09	0.74	0.52	50.00	73.68	1.90
	IL-6	1.12	0.25	0.57	46.67	78.95	2.21
	TNF	1.32	0.23	0.57	73.33	49.12	1.44
	IFN- $\gamma$	1.13	<0.0001	0.75	70.00	94.74	13.3
	IL-17	1.04	0.006	0.68	86.67	50.88	1.76
	IL-4	-0.09	0.77	0.51	40.00	78.95	1.90
	IL-10	0.73	0.38	0.55	96.67	19.3	1.19
	IL-2	0.97	0.13	0.59	66.67	64.91	1.90

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Figura 23 B - Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID1 vs PGL1

Performance dos Biomarcadores Selecionados para identificar os grupos de indivíduos ( LID vs PGL)							
	Biomarcador	Cuf-off	p value	Performance Indices			
				AUC	Se	Sp	LR
Grupo LID (-) PGL (+) x LID (+) PGL (-)	CXCL8	0.77	0.04	0.66	52.17	82.35	2.95
	CCL2	1.30	0.09	0.63	82.98	47.06	1.56
	CXCL9	1.25	0.46	0.56	74.47	41.18	1.26
	CCL5	1.16	0.23	0.59	53.19	82.35	3.01
	CXCL10	0.77	0.04	0.66	70.21	82.35	3.97
	IL-6	1.22	0.64	0.53	78.72	41.18	1.33
	TNF	1.30	0.007	0.72	93.62	70.59	3.18
	IFN- $\gamma$	1.57	0.0011	0.76	70.21	100	
	IL-17	0.86	0.01	0.70	61.70	82.35	3.49
	IL-4	1.02	0.65	0.53	51.06	76.47	2.17
	IL-10	1.02	0.16	0.61	72.34	58.82	1.75
	IL-2	1.25	0.11	0.62	65.96	76.47	2.80
Grupo LID (-) PGL (+) x LID (+) PGL (+)	CXCL8	0.77	0.04	0.68	46.67	87.50	3.73
	CCL2	1.34	0.05	0.66	90.00	47.06	1.7
	CXCL9	1.61	0.98	0.50	86.67	29.41	1.22
	CCL5	1.16	0.64	0.54	36.67	82.35	2.07
	CXCL10	0.77	0.41	0.57	56.67	82.35	3.21
	IL-6	0.15	>0.99	0.50	83.33	29.41	1.18
	TNF	1.34	0.03	0.68	75.86	64.71	2.14
	IFN- $\gamma$	1.35	0.03	0.69	90	68.75	2.88
	IL-17	-1.32	0.53	0.55	86.67	35.29	1.33
	IL-4	-0.55	0.35	0.58	33.33	94.12	5.66
	IL-10	1.02	0.11	0.64	83.33	58.82	2.02
	IL-2	0.96	0.29	0.59	66.67	58.82	1.61
Grupo LID (+) PGL (-) x LID (+) PGL (+)	CXCL8	1.70	0.98	0.50	46.67	8.51	1.09
	CCL2	0.06	0.66	0.52	20	91.49	2.35
	CXCL9	1.17	0.33	0.56	60	68.09	1.88
	CCL5	1.29	0.12	0.60	90	44.68	1.62
	CXCL10	0.87	0.45	0.55	50	68.09	1.56
	IL-6	1.11	0.60	0.53	46.67	72.34	1.68
	TNF	1.22	0.03	0.64	63.33	89.13	5.82
	IFN- $\gamma$	1.60	<0.0001	0.80	100	70.21	3.35
	IL-17	0.69	0.007	0.68	60	72.34	2.16
	IL-4	1.17	0.02	0.64	90	48.94	1.76
	IL-10	0.71	0.67	0.52	96.67	27.66	1.33
	IL-2	1.18	0.003	0.69	62.69	68.09	2.50

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

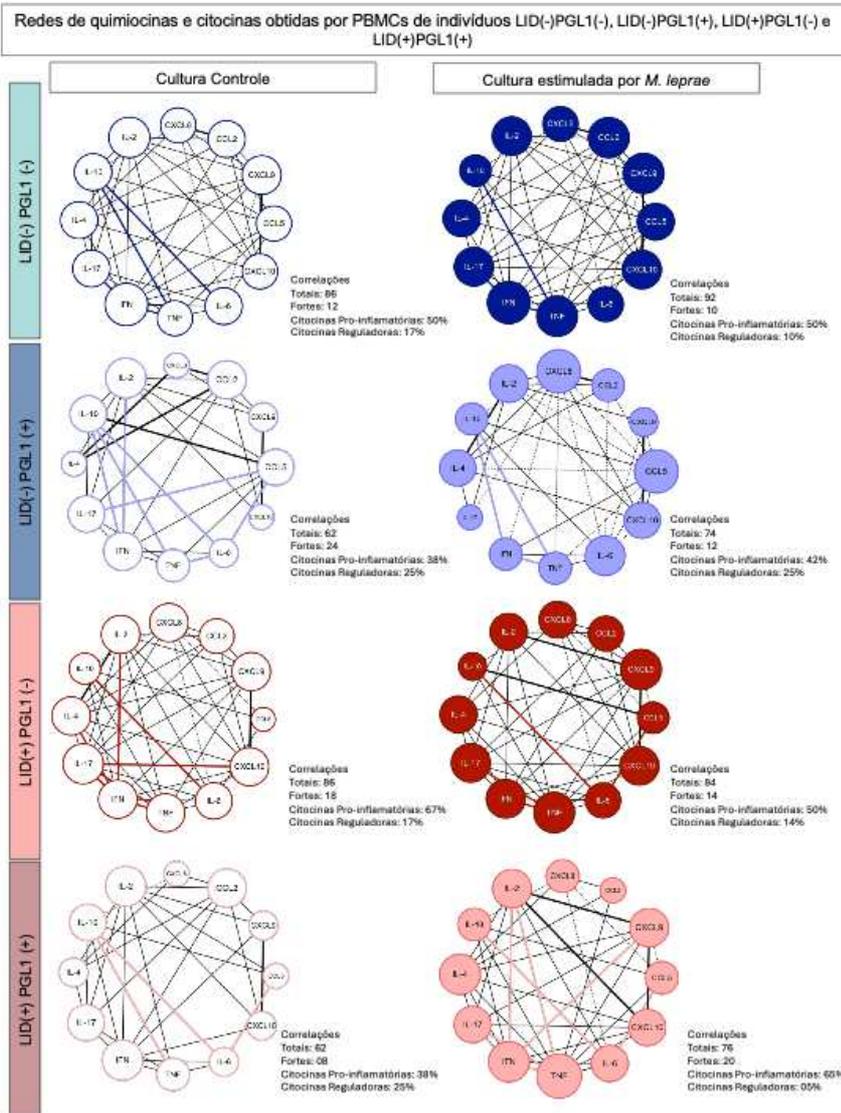
**Figura 23 A e 23 B** Desempenho de biomarcadores selecionados para identificar indivíduos dos grupos de LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+)PGL1(-) e LID1(+)PGL1(+). O desempenho das citocinas e quimiocina secretadas por células mononucleares do sangue periférico após cultura *in vitro* para classificar foram calculados pela análise da curva de característica de operação do receptor (ROC). A área sob a curva (AUC) indica a precisão global de cada biomarcador usando limites específicos. Os índices de desempenho, incluíram sensibilidade (Se), especificidade (Sp), razão de verossimilhança (LR). A tabela demonstra em detalhes o desempenho dos biomarcadores dos diferentes grupos.

Os resultados apresentados na Figura 24 demonstram diferenças significativas nas redes de correlações entre os quatro grupos estudados, considerando as respostas ao LID-1 e ao PGL-1. No grupo LID1(-)PGL1(-), observou-se um total de 86 correlações na cultura controle, das quais 12 foram fortes (50% entre citocinas pró-inflamatórias e 17% entre citocinas reguladoras), e 92 correlações na cultura estimulada, com 10 fortes (50% pró-inflamatórias e 10% reguladoras). Em contraste, o grupo LID1(-)PGL1(+) apresentou 62 correlações na cultura controle, das quais 24 foram fortes (38% pró-inflamatórias e 25% reguladoras), e 74 correlações na cultura estimulada, com 12 fortes (42% pró-inflamatórias e 25% reguladoras).

Para o grupo LID1(+)PGL1(-), foram observadas 86 correlações na cultura controle, com 18 fortes (67% pró-inflamatórias e 17% reguladoras), enquanto na cultura estimulada registrou-se um total de 84 correlações, das quais 14 foram fortes (50% pró-inflamatórias e 14% reguladoras). O grupo LID1(+)PGL1(+) apresentou, na cultura controle, 62 correlações, sendo 8 fortes (38% pró-inflamatórias e 25% reguladoras), e, na cultura estimulada, 76 correlações, das quais 20 foram fortes (65% pró-inflamatórias e 5% reguladoras).

Destaca-se que o grupo de indivíduos LID1(+)PGL1(-), tanto na cultura controle quanto na estimulada, exibe um perfil pró-inflamatório robusto, reforçando, através da rede de correlações, a conexão entre os mediadores IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF. Adicionalmente, observou-se uma conexão entre IL-10 e IL-6, o que pode indicar uma tentativa de imunorregulação nesse grupo. É notável também a conexão persistente entre CXCL10 e IL-17 nos grupos LID1(+) e ausente no grupo LID1(-), sugerindo uma diferença no perfil de resposta imune associada ao status do LID-1.

Figura 24 - Análise de desempenho de biomarcadores selecionados para identificar os grupos de indivíduos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+)PGL1(-) e LID1(+)PGL1(+) por meio de análises de Redes.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 24.** Redes de correlações de biomarcadores de quimiocinas e citocinas obtidos a partir de PBMCs dos grupos de indivíduos LID1(-)PGL1(-), LID1(-)PGL1(+), LID1(+)PGL1(-) e LID1(+)PGL1(+) após estímulo *in vitro* com *M. leprae*. A análise foi realizada em duas condições: cultura controle (sem estímulo) e cultura estimulada por *M. leprae*. As redes foram construídas usando um layout circular baseado na excentricidade, considerando todas as correlações significativas. As redes em azul claro, representam correlações para os indivíduos LID1(-)PGL1(-), azul escuro LID1(-)PGL1(+) e as redes vermelha para os indivíduos LID1(+)PGL1(-) e vermelho claro LID1(+)PGL1(+). As linhas contínuas representam a correlação positiva entre os biomarcadores, e a linha tracejada uma correlação negativa. As linhas coloridas (azul e vermelho) conectam de um modo geral biomarcadores com caráter pró-inflamatório.

## 7 DISCUSSÃO

A introdução de abordagens inovadoras para a identificação de biomarcadores neste estudo revelou um conjunto de quimiocinas e citocinas fortemente associadas ao perfil pró-inflamatório, com destaque para o IFN- $\gamma$  no grupo LID-1 (+). Esse achado sugere que o IFN- $\gamma$  possui um potencial significativo para o diagnóstico de indivíduos com infecção subclínica por *M. leprae*. A relevância deste biomarcador é sustentada pelo sucesso do teste Quantiferon, utilizado amplamente para o diagnóstico de tuberculose latente, que se baseia na detecção de mediadores solúveis em estágios iniciais de doenças causadas por micobactérias. (Rothe; Andersen, 2014)

Vale reforçar a importância dessa proteína recombinante (LID-1) no ensaio multiplex que possibilitou a identificação de indivíduos com anticorpos anti - LID (LID+) que posteriormente foram avaliados pelo CREDEN-PES confirmando o diagnóstico de hanseníase, para muitos dos participantes.

Estudos prévios têm apontado para a necessidade de selecionar biomarcadores sorológicos e celulares capazes de identificar infecções subclínicas com precisão, antes mesmo da manifestação clínica da doença. O diagnóstico precoce é essencial para prevenir o surgimento de sequelas, deformidades físicas e para interromper a cadeia de transmissão. Ferramentas como o perfil de quimiocinas e citocinas utilizadas neste estudo representam estratégias promissoras, embora ainda seja necessário padronizar as respostas para viabilizar seu uso regular no monitoramento clínico da hanseníase (Geluk *et al.*, 2012; Hasan *et al.*, 2004; Nath; Saini; Valluri, 2015; Queiroz, *et al.*, 2019).

Os achados obtidos confirmam o que tem sido descrito na literatura sobre o uso de quimiocinas e citocinas como biomarcadores para detecção de infecção subclínica (Martins *et al.*, 2012; Saini *et al.*, 2013). Em particular, os níveis elevados de IFN- $\gamma$  no grupo LID-1 (+) reforçam as observações de Hungria *et al.* (2017), que identificaram maior produção de IFN- $\gamma$  em pacientes com a forma clínica PB (71-84%) e em contatos (55%). Esse padrão indica que o IFN- $\gamma$  é um biomarcador promissor para identificar respostas imunológicas associadas a estágios iniciais da infecção por *M. leprae*, oferecendo uma ferramenta valiosa para o diagnóstico precoce e para o controle da hanseníase em áreas endêmicas.

A resposta de anticorpos ao glicolípido fenólico-I (PGL-I), um componente específico da parede celular de *M. leprae*, tem sido amplamente estudada como biomarcador na hanseníase. No trabalho de Grossi et al (2008), os autores verificaram que O ML *Flow* mostrou grande correlação com a carga bacilar, tendo sido positivo na totalidade dos pacientes com Índice Baciloscópico (IB)  $\geq 2$  e em quase todos os pacientes com IB positivo menor que dois; foi capaz, ainda, de detectar anticorpos específicos do *M. leprae* em mais de um terço dos indivíduos com baciloscopia negativa.

No entanto, a detecção de anticorpos anti-PGL-I isoladamente se mostra insuficiente para identificar todos os casos da doença. Embora o teste apresente alta sensibilidade para pacientes multibacilares, pacientes paucibacilares geralmente não apresentam uma resposta detectável de anticorpos, limitando a eficácia de PGL-1 na identificação de todos os casos de hanseníase (Gurung *et al.*, 2019; Van Hooij *et al.*, 2019). Outros antígenos específicos de *M. leprae*, como a lipoarabinomanana (LAM) (Spencer *et al.*, 2011), a proteína de fusão recombinante LID-1 (DUTHIE *et al.*, 2016; MARÇAL *et al.*, 2018), a proteína de membrana principal-II (MMP-II) (Wang *et al.*, 2015) e outras proteínas recombinantes de *M. leprae* (Spencer *et al.*, 2011; 2012) também têm sido investigados como potenciais biomarcadores.

Os dados obtidos neste estudo reforçam as limitações do teste anti-PGL-I, pois apenas 47 participantes assintomáticos residentes em área endêmica apresentaram teste positivo para PGL-1, enquanto 79 apresentaram anticorpos para LID-1 (+). Esse achado sugere que o anticorpo anti-LID-1, da classe IgG, pode ser um marcador mais sensível para detecção precoce, em comparação com o anticorpo anti-PGL-I, que pertence à classe IgM e apresenta menor sensibilidade para antígenos proteicos. Assim, a busca por novos biomarcadores, incluindo proteínas de natureza proteica como a LID-1, é essencial para aprimorar o diagnóstico precoce da hanseníase e possibilitar uma resposta mais eficaz no controle da doença.

Aráoz e colaboradores (2006) testaram 17 antígenos proteicos e observaram a antigenicidade das células T para esses antígenos, confirmada pela produção de IFN- $\gamma$  em ensaios de sangue total. As respostas mais altas foram observadas em pacientes com hanseníase paucibacilar e em contatos assintomáticos. O sucesso de ensaios específicos de antígeno, baseados na produção de IFN- $\gamma$  para o diagnóstico de tuberculose humana, como dito anteriormente (Rothel; Andersen, 2014), oferece um paradigma promissor para a busca de antígenos recombinantes no diagnóstico da

hanseníase. Os dados de produção de IFN- $\gamma$  obtidos neste estudo podem contribuir para consolidar um método de diagnóstico precoce, utilizando anticorpos e outros biomarcadores, como citocinas e quimiocinas, para a detecção de infecção subclínica.

A resposta imune do hospedeiro ao bacilo de *M. leprae* influencia a evolução clínica da hanseníase, variando de uma resposta pró-inflamatória (Th1/Th17) que facilita o controle bacteriano em indivíduos paucibacilares (PB) até uma resposta imunoreguladora (Th2), caracterizada por altos níveis de anticorpos, mas incapaz de controlar a infecção, observada em pacientes multibacilares (MB) (Nath; Saini; Valluri, 2015; Saini *et al.*, 2013). De acordo com Queiroz *et al.* (2021), níveis elevados de CCL2 estão presentes em contatos domiciliares (HHC), enquanto IFN- $\gamma$  é detectado em níveis elevados em pacientes PB e MB, corroborando os dados deste estudo. Os resultados confirmam que CCL2 é um possível biomarcador no grupo LID-1 (-), enquanto IFN- $\gamma$  é um indicador de infecção subclínica no grupo LID-1 (+).

Interessantemente, os dados obtidos indicaram níveis mais altos de CCL2 e CCL5 no grupo LID-1 (-), composto por indivíduos saudáveis sem anticorpos anti-LID, enquanto estudos prévios mostram níveis reduzidos dessas quimiocinas em pacientes com hanseníase lepromatosa, sugerindo um papel no crescimento e disseminação bacteriana irrestrita (Hasan *et al.*, 2006). Além disso, indivíduos com perfil PGL-1 (+) apresentaram uma tendência de níveis elevados de CCL2 e CXCL8, enquanto níveis aumentados de CXCL8 e TNF foram observados no grupo LID-1 (-) PGL-1 (+), sugerindo uma resposta imunológica diferenciada do grupo LID-1 (+) PGL-1 (-) que apresentaram um perfil pró-inflamatório.

Geluk *et al.* (2012) sugerem que as quimiocinas MCP-1 (CCL2) e MIP-1 $\beta$  podem distinguir respostas imunes ao patógeno de respostas resultantes de exposição assintomática ao *M. leprae*. Neste estudo, o papel de IP-10 (CXCL10) também se destacou, sendo associado ao risco de infecção e subsequente transmissão. Esses dados são consistentes com os achados de Van Hooij *et al.* (2016; 2018), que identificaram CXCL10 como um marcador celular relevante para identificar pacientes com hanseníase em diferentes formas clínicas. CXCL10, uma quimiocina secretada em resposta ao IFN- $\gamma$ , desempenha um papel importante na patogênese da hanseníase. Em nosso estudo, CXCL10 foi um biomarcador seletivo no grupo LID-1 (+), em conjunto com CXCL8, IFN- $\gamma$  e IL-2, e se destacou no grupo LID-1 (+) PGL-1 (-), reforçando o perfil pró-inflamatório desse grupo.

Algumas limitações foram identificadas no estudo. Embora o número de participantes seja representativo, é essencial ampliar a amostra para validar os biomarcadores identificados. O acompanhamento temporal dos participantes também é fundamental, pois após dois anos do início do estudo, aproximadamente 25 pacientes LID-1 (+) evoluíram para hanseníase e iniciaram tratamento. Considerando a natureza crônica da hanseníase, é importante monitorar tanto os indivíduos LID-1 (+) sem manifestações clínicas quanto os indivíduos LID-1 (-) que residem em áreas endêmicas. Identificar um biomarcador imunológico específico com valor prognóstico pode ser crucial para prever desfechos clínicos distintos. O acompanhamento longitudinal dos participantes permitirá identificar aqueles que desenvolveram a doença, facilitando a seleção de biomarcadores com alto potencial para o diagnóstico precoce da hanseníase.

## 8 CONCLUSÃO

Este estudo utilizou abordagens inovadoras para avaliar as respostas imunológicas de indivíduos expostos ao *M. leprae* em uma área hiperendêmica para hanseníase. A análise detalhada dos perfis imunológicos dos grupos LID-1 (+) e LID-1 (-), PGL-1 (+) e PGL-1 (-), e dos quatro grupos combinados, revelou perfis inflamatórios distintos com potencial de aplicação no diagnóstico e monitoramento de infecções subclínicas (Figura 25).

No grupo LID-1 (+), a presença de níveis elevados de IFN- $\gamma$  e CXCL10 indicou uma resposta inflamatória acentuada, potencialmente associada à infecção subclínica. Este perfil pró-inflamatório reforça a utilidade de IFN- $\gamma$  como um marcador imunológico para diagnóstico precoce, particularmente relevante em estágios iniciais da infecção. Em contraste, o grupo LID-1 (-) apresentou uma resposta imunológica mais baixa, sugerindo menor exposição ao patógeno ou um possível perfil de resistência ao bacilo.

Em relação aos grupos PGL-1 (+) e PGL-1 (-), o principal biomarcador identificado foi a quimiocina CXCL10, que apresentou níveis elevados no grupo PGL-1 (-), refletindo uma resposta inflamatória associada à exposição ao bacilo sem progressão para infecção ativa. Em PGL-1 (+), observou-se uma resposta mais atenuada e menos inflamatória, o que sugere uma modulação da resposta imune.

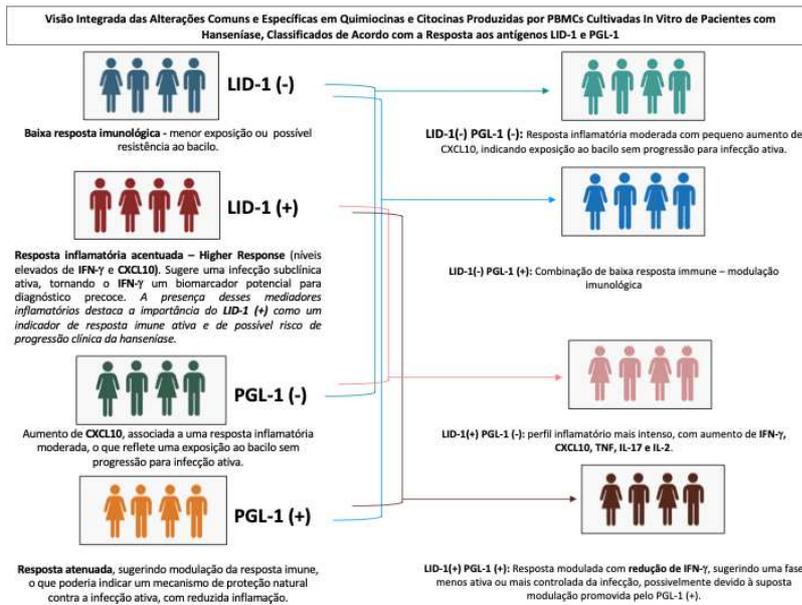
Ao analisar os quatro grupos combinados — LID-1 (-) PGL-1 (-), LID-1 (-) PGL-1 (+), LID-1 (+) PGL-1 (-) e LID-1 (+) PGL-1 (+) — foi possível identificar padrões imunológicos específicos. O grupo LID-1 (+) PGL-1 (-) destacou-se com um perfil inflamatório mais intenso, caracterizado por níveis elevados de CXCL10 e das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF, IL-17 e IL-2. A inclusão dos dados do grupo PGL-1 (+) revelou uma redução na produção de IFN- $\gamma$ , sugerindo que a presença do anticorpo anti-PGL-1 pode estar associada a uma modulação da resposta inflamatória.

Estudos adicionais sobre a resposta do hospedeiro ao *M. leprae*, especialmente em indivíduos residentes em áreas de alta endemicidade, são essenciais para validar o uso desses biomarcadores no diagnóstico precoce da hanseníase. Nosso grupo de pesquisa está atualmente realizando uma análise detalhada dos perfis proteômico e transcriptômico de indivíduos LID-1 (+) que evoluíram para hanseníase, visando compreender os mecanismos envolvidos na

progressão da infecção. A identificação de biomarcadores associados a esses mecanismos será crucial para aprimorar o diagnóstico precoce da hanseníase, particularmente em estágios iniciais ou em casos de infecção subclínica, quando os sintomas ainda são pouco evidentes.

Esses achados enfatizam o papel de mediadores imunológicos como CXCL10, IFN- $\gamma$  e TNF, e destacam a relevância de ensaios multiplex na detecção de perfis imunológicos específicos. O estudo contribui para o desenvolvimento de métodos diagnósticos aprimorados que, ao serem validados, podem fortalecer a vigilância epidemiológica e o manejo clínico da hanseníase em regiões de alta endemicidade.

Figura 25 - Visão Integrada



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

**Figura 24.** Visão integrada das alterações comuns e específicas dos biomarcadores por PBMC cultivadas *in vitro* de pacientes com Hanseníase.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, F. M. *et al.* Identifying leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-NDO. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. e0004934, 2016.
- ARÁOZ, R. *et al.* Towards an immunodiagnostic test for leprosy. **Microbes and infection**, v. 8, n. 8, p. 2270-2276, 2006.
- ARAÚJO, S. *et al.* Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1412-1420, 2016.
- 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.
- BAILEY, A. **Transforming and visualising proteomics data**. In: *Data Science Workshop*. 2019. Disponível em: [https://ab604.github.io/docs/bspr\\_workshop\\_2018/transform.html](https://ab604.github.io/docs/bspr_workshop_2018/transform.html). Acesso em: 20 out. 2024.
- BARRETO, J. G. *et al.* High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 60-67, 2012.
- BARRETO, J. G. *et al.* Spatial analysis spotlighting early childhood leprosy transmission in a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon region. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2665, 2014.
- 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, 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, abr. 2007.
- BIOCLIN. **Fast ML Flow Hanseníase**. Bula do produto. Belo Horizonte: Quibasa Química Básica, 2023. Disponível em: [https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/BIOCLIN\\_FAST\\_ML\\_FLOW\\_TRILINGUE\\_MAI\\_2023.pdf](https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/BIOCLIN_FAST_ML_FLOW_TRILINGUE_MAI_2023.pdf). Acesso em: 20 out. 2024.
- BLOK, D. J.; DE VLAS, S. J.; RICHARDUS, J. H. Finding undiagnosed leprosy cases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 10, p. 1113, 2016.
- BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S460-S475, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância das Doenças em Eliminação. **Nota Técnica nº 27/2023-CGDE/DEDT/SVSA/MS:** orientações sobre o fornecimento e uso do na Atenção Primária à Saúde - Código SIGTAP 02.14.01.017-1, conforme preconizado pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Departamento de Vigilância das Doenças. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública:** manual técnico-operacional. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico:** Hanseníase 2023. Brasília: MS/CGDI, 2022. 56 p. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim\\_hanseniaese-2023\\_internet\\_completo.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim_hanseniaese-2023_internet_completo.pdf). Acesso em: 10 fev. 2023.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico:** Hanseníase 2024. Brasília: MS/CGDI, 2024. 71 p. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2024/be\\_hansen-2024\\_19jan\\_final.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2024/be_hansen-2024_19jan_final.pdf). Acesso em: 10 dez. 2024.

BUHRER-SEKULA, S. *et al.* Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, 2003.

CABRAL-MIRANDA, W.; CHIARAVALLOTI 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.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 6, p. 610-621, 2006.

COOLEY, G. M. *et al.* Evaluation of multiplex-based antibody testing for use in large-scale surveillance for yaws: a comparative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1321-1325, 2016.

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.

COSTA-SILVA, M. F. *et al.* Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. **Molecular immunology**, v. 57, n. 2, p. 74-85, 2014.

CUNHA, E. H. M. *et al.* Interplay among differential exposure to *Mycobacterium leprae* and TLR4 polymorphism impacts the immune response in household contacts of leprosy patients. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1130137, 2023.

CUNHA, F. M. B., *et al.* Pure neural leprosy: diagnostic value of the polymerase chain reaction. **Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine**, v. 33, n. 3, p. 409-414, 2006.

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.

DE SOUSA, D. B. *et al.* Hot spots of leprosy in the endemic area of São Luís, Maranhão State, Northeastern Brazil. **Journal of Infection and public health**, v. 13, n. 2, p. 228-234, 2020.

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.

DENNISON, C. L. *et al.* *Mycobacterium leprae*–helminth co-infections and vitamin D deficiency as potential risk factors for leprosy: a case–control study in south-eastern Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 105, p. 261-266, 2021.

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.

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.

DUVALL, A. S. *et al.* Development of a specimen-sparing multichannel bead assay to detect antiparasite IgG4 for the diagnosis of *Schistosoma* and *Wuchereria* infections on the coast of Kenya. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 4, p. 638, 2014.

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.

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, A. B. de L. *et al.* The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious diseases of poverty**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2017.

- FREITAS, L. R. S.; 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, 2014.
- FROES JR, L. A. R; TRINDADE, M. A. B; SOTTO, M. N. Immunology of leprosy. **International Reviews of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 72-83, 2022. DOI: 10.1080/08830185.2020.1851370.
- GAMA, R. S. *et al.* A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007400, 2019.
- GAMA, R. S. *et al.* High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. **BMC infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2018.
- GAMA, R. S. *et al.* Prospects for new leprosy diagnostic tools, a narrative review considering ELISA and PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1-7, 2020.
- GELUK, A. *et al.* New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 10, p. 4782-4791, 2012.
- 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.
- GOMES, Y. M. *et al.* Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.
- GONÇALVES, A. Realities of leprosy control: updating scenarios. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, p. 611-621, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2013000300006>
- 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, jul. 2008.
- GRAFFELMAN, J; VAN EEUWIJK, F. Calibration of multivariate scatter plots for exploratory analysis of relations within and between sets of variables in genomic research. **Biometrical Journal: Journal of Mathematical Methods in Biosciences**, v. 47, n. 6, p. 863-879, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/bimj.200510177>
- GROSSI, M. A. F. *et al.* Fatores de risco para a soropositividade do ML Flow em pacientes com hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 39-44, 2008.
- GUERREIRO, R. *et al.* As quimiocinas e os seus receptores: Características e funções fisiológicas. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. 4, p. 967–976, 2011.

GURUNG, P. *et al.* Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1315-1327, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.05.020>

HACKER, M. A. *et al.* Characteristics of leprosy diagnosed through the surveillance of contacts: a comparison with index cases in Rio de Janeiro, 1987-2010. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 49-54, 2012.

HARBOE, M. Overview of host-parasite relations. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy**. 2. ed. New York: Churchill Livingstone, 1994. Cap. 5, p. 87-112.

HASAN, Z. *et al.* Elevated serum CCL2 concomitant with a reduced mycobacterium-induced response leads to disease dissemination in leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 63, n. 3, p. 241-247, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01733.x>

HASAN, Z. *et al.* Leprosy Patients with Lepromatous 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.

HUNGRIA, E. M., *et al.* Can baseline ML Flow test results predict leprosy reactions? An investigation in a cohort of patients enrolled in the uniform multidrug therapy clinical trial for leprosy patients in Brazil. **Infectious diseases of poverty**, v. 5, n. 06, p. 32-41, 2016.

HUNGRIA, E. M., *et al.* Antigen-specific secretion of IFN $\gamma$  and CXCL10 in whole blood assay detects *Mycobacterium leprae* infection but does not discriminate asymptomatic infection from symptomatic leprosy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 4, p. 328-334, 2017.

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.

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.

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.

KOHIDAI, I. Structure of chemokine families. 2006. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1278111>. Acesso em: 10 de janeiro de 2023.

- KRUTZIK, S. R. *et al.* Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature medicine**, v. 9, n. 5, p. 525-532, 2003.
- KUMAR, Anil *et al.* Detection of previously undetected leprosy cases in Firozabad District (UP), India during 2006–2009: a short communication. **Leprosy Review**, v. 84, n. 2, p. 124-127, 2013a.
- 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, 2013b.
- LAM, F. *et al.* VennDiagramWeb: a web application for the generation of highly customizable Venn and Euler diagrams. **BMC bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2016.
- LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. **Diagn Tratamento**, v. 17, n. 4. p. 173-179, 2012.
- LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2. p. 205-218, 2014.
- LEITE, H. M. *et al.* Identificação de um paciente com hanseníase multibacilar por meio do teste sorológico (LID) em ações de busca ativa: um relato de caso. **Hansenologia Internationalis**. v. 48, p. 1-7, 2023. DOI: <https://doi.org/10.47878/hi.2023.v48.39317>
- LEME, D. E. C. *et al.* Network analysis: a multivariate statistical approach for health science research. **Geriatrics, Gerontology and Aging**, v. 14, n. 1, p. 43-51, 2020. DOI: 10.5327/Z2447-212320201900073
- 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.
- LI, W. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. **Journal of bioinformatics and computational biology**, v. 10, n. 06, p. 1231003, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1142/S0219720012310038>
- LUIZA-SILVA, M. *et al.* Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 873-883, 2011.
- MACKAY, C. R. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, p. 95-101, 2001.
- MANGAN, P. R. *et al.* Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH 17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231, 2006.

MARÇAL, P. H. F. *et al.* Functional biomarker signatures of circulating T-cells and its association with distinct clinical status of leprosy patients and their respective household contacts. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 06, p. 5-15, 2020.

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.e170467, 2018.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 10, p.1354. 2011.

MARTINS, A. C. 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, p. 579-587, 2010.

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, 2012.

MAZINI, P. S. *et al.* Gene association with leprosy: a review of published data. **Frontiers in Immunology**, p. 658, 2016.

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, 2007.

MI, Z; LIU, H; ZHANG, F. Advances in the immunology and genetics of leprosy. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 567, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00567

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.

MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 1, p. 48-54, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.12.001>

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.

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.

NATH, I; SAINI, C; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 90-98, 2015.

O'HEARN, A. E. *et al.* Serosurveillance of viral pathogens circulating in West Africa. **Virology Journal**, v. 13, p. 1-6, 2016.

OGUTTU, D. *et al.* Serosurveillance to monitor onchocerciasis elimination: the Ugandan experience. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 2, p. 339, 2014.

OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE). **Global leprosy (Hansen disease) update, 2021**: moving towards interruption of transmission. *Weekly Epidemiological Record*, n. 36, p. 429-450, 9 set. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9736-429-450>. Acesso em: 11 jan. 2023

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.

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, 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.

PINHEIRO, M.D.S. *et al.* Impacto do qPCR na avaliação diagnóstica de indivíduos com suspeita de hanseníase. *Research Society and development*. V.12, n° 3, p. 10-16, 2023.

PINHEIRO, R. O. *et al.* Innate immune responses in leprosy. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 518, 2018.

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.

QUEIROZ, E. A. *et al.* CCL2 and IFN- $\gamma$  serum levels as biomarkers for subclinical infection in household contacts of leprosy patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 104725, 2021.

QUEIROZ, E. A. *et al.* Immunological biomarkers of subclinical infection in household contacts of leprosy patients. **Immunobiology**, v. 224, n. 4, p. 518-525, 2019.

R CORE TEAM. **The R Project for Statistical Computing**. 2019. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 20 out. 2024

RAMBUKKANA, A. *et al.* Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- $\alpha$ 2 chain. **Cell**, v. 88, n. 6, p. 811-821, 1997.

- RAO, P. N; SUNEETHA, S. Current situation of leprosy in India and its future implications. **Indian dermatology online journal**, v. 9, n. 2, p. 83, 2018.
- 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, 2015.
- RICHARDUS, R. A. *et al.* Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006083, 2017.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. **Int j lepr other mycobact dis**, v. 34, n. 3, p. 255-273, 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, 2002.
- ROCHE, P. W. *et al.* Rapid method for diagnosis of leprosy by measurements of antibodies to the M. leprae 35-kDa protein: comparison with PGL-I antibodies detected by ELISA and "dipstick" methods. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases**, v. 67, p. 279-286, 1999.
- 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, 2017.
- ROSA, P. S. *et al.* Emergence and transmission of drug-/multidrug-resistant Mycobacterium leprae in a former leprosy colony in the Brazilian amazon. **Clinical infectious diseases**, v. 70, n. 10, p. 2054-2061, 2020.
- ROTHEL, J. S.; ANDERSEN, P. Diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: is the demise of the Mantoux test imminent?. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 3, n. 6, p. 981-993, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1586/14787210.3.6.981>
- SADHU, Soumi; MITRA, Dipendra Kumar. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 604, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00604.
- SAHINGUR, S. E.; YEUDALL, W. A. Chemokine function in periodontal disease and oral cavity cancer. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 214, 2015.
- SAINI, C.; *et al.* CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2338, 2013.

- 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.
- SALGADO, C. G. *et al.* Are leprosy case numbers reliable?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 135-137, 2018.
- SALGADO, C. G. *et al.* What do we actually know about leprosy worldwide?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 778, 2016.
- SAMPAIO, L. H. *et al.* Immunologically reactive M. leprae antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2011.
- SAPKOTA, B. R. *et al.* Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. **Human immunology**, v. 71, n. 10, p. 992-998, 2010.
- SCHREUDER, P. A. M.; NOTO, S.; RICHARDUS, J. H. Epidemiologic trends of leprosy for the 21st century. **Clinics in dermatology**, v. 34, n. 1, p. 24-31, 2016.
- SCOLLARD, D. M. *et al.* Increased CXC ligand 10 levels and gene expression in type 1 leprosy reactions. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 6, p. 947-953, 2011.
- SHEPARD, C. C. *et al.* The nasal excretion of Mycobacterium leprae in leprosy. **International journal of Leprosy**, v. 30, n. 1, p. 10-18, 1962.
- SILVA, L. M. *et al.* Immunohistochemical analysis of the expression of cellular transcription NF $\kappa$ B (p65), AP-1 (c-Fos and c-Jun), and JAK/STAT in leprosy. **Human Pathology**, v. 46, n. 5, p. 746-752, 2015. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.01.015
- SILVA, M. B. *et al.* Latent leprosy infection identified by dual RLEP and anti-PGL-I positivity: implications for new control strategies. **PLoS One**, v. 16, n. 5, p. e0251631, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251631>
- SILVEIRA-NUNES, G. *et al.* Hypertension is associated with intestinal microbiota Dysbiosis and inflammation in a Brazilian population. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 258, 2020.
- SMITH, W. C. *et al.* The missing millions: a threat to the elimination of leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003658, 2015.

SOUSA, D. B. *et al.* Hot spots of leprosy in the endemic area of São Luís, Maranhão State, Northeastern Brazil. **Journal of Infection and public health**, v. 13, n. 2, p. 228-234, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.08.006>

SOUZA, V. N. B. Imunologia da Hanseníase. In: ALVES, E. D.; FERREIRA, T, L; FERREIRA, I. N. (org.). **Hanseníase: avanços e desafios**. Brasília: Nesprom, 2014. p. 105-130. (PROEXT). Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2014/ses-30675/ses-30675-5605.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2023.

SPENCER, J. S. *et al.* Analysis of antibody responses to Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 2, p. 260-267, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00472-10>

SPENCER, J. S. *et al.* Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 79-89, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900014>

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. 1-8, 2009.

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.

SUZUKI, K. *et al.* Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. **The Journal of dermatology**, v. 39, n. 2, p. 121-129, 2012.

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.

TIWARI, V., *et al.* Evaluation of polymerase chain reaction in nerve biopsy specimens of patients with Hansen's disease; **Journal of the Neurological Sciences**; v.380, p. 187-190; 2017.

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.

TURANKAR, R. P. *et al.* Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of M. leprae DNA from clinical and environmental samples. **International journal of mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 54-59, 2015.

VAN HOOIJ, A. *et al.* Application of new host biomarker profiles in quantitative point-of-care tests facilitates leprosy diagnosis in the field. **EBioMedicine**, v. 47, p. 301-308, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.009>

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

VAN HOOIJ, A. *et al.* Quantitative lateral flow strip assays as user-friendly tools to detect biomarker profiles for leprosy. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

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.

WANG, H. *et al.* Detection of antibodies to both *M. leprae* PGL-I and MMP-II to recognize leprosy patients at an early stage of disease progression. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 3, p. 274-277, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.012>

MISCH, E. A., *et al.*; Leprosy and the Human Genome; **Microbiology and Molecular Biology**; v. 74, n. 4, p. 589-620; 2010.

WHITE, C; FRANCO-PAREDES, C. Leprosy in the 21st century. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 80-94, 2015.

WICKHAM, H. **Ggplot2**: elegant graphics for data analysis. 2. ed. New York: Springer Cham, 2016. 260 p.

WON, K. Y. *et al.* Multiplex serologic assessment of schistosomiasis in Western Kenya: antibody responses in preschool aged children as a measure of reduced transmission. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 1460, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Estratégia Global para a Hanseníase 2021-2030**: Rumo a zero hanseníase. Nova Deli: OMS, 2021b. Disponível em: <http://telessaude.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2022/04/1.-Hanseníase-2021-2030.pdf>. Acesso em: 09 jan. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control. **Weekly Epidemiological Record**, Genebra, n. 36, p. 421-444, 2021a. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/345051/WER9636-421-444-eng-fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 09 jan. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 92, n. 35, p. 501-520, set. 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1088331/retrieve>. Acesso em: 10 jan. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leprosy (Hansen disease)**. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/leprosy-hansens-disease>. Acesso em: 10 dez. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Soil-transmitted helminthiases:** eliminating soil-transmitted helminthiases as a public health problem in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. Geneva, 2012. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44804/9789241503129\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44804/9789241503129_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 09 jan. 2023.

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.

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, 2007.

ZHOU, L. *et al.* IL-6 Promotes 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.

## ANEXO A – Questionário sociodemográfico

HMM- \_\_\_\_\_



### PESQUISA DEMOGRÁFICA DOS PARTICIPANTES

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ Circunferência do Braço: \_\_\_\_\_

**ENTREVISTADOR:** Por favor, leia qualquer texto em itálico antes de cada questão, bem como a própria questão. Leia as respostas somente quando instruído. Nunca leia "não sei" ou "recusou-se a responder" como uma resposta. Por favor, leia a introdução em itálico abaixo para todos os participantes. Se houver uma seta seguida por um número de pergunta após uma resposta, pule para essa pergunta. Circule todas as respostas, a menos que haja um lugar para inserir um número ou uma resposta a uma pergunta aberta.

*Olá meu nome é \_\_\_\_\_ . Obrigado por participar neste estudo. Faça parte de uma equipe de cientistas da Universidade Federal de Juiz de Fora - GV e da Emory University que investiga os efeitos da hanseníase no corpo humano. Sua contribuição fornecerá conhecimentos valiosos que podem ajudar a reduzir a chance de as pessoas adquirirem hanseníase. Você assinou um formulário de consentimento e, para lembrá-lo, tudo o que você disser aqui será mantido em sigilo. Sua participação é totalmente voluntária e você pode mudar de ideia a qualquer momento. Seu nome não será mencionado em nenhuma apresentação / publicação relacionada a este estudo. A duração prevista desta pesquisa é de 20 minutos e envolverá perguntas básicas sobre você, sua casa, suas atividades e sua dieta. Você ainda concorda em participar? ( ) SIM ( ) NÃO*  
**Horário de início da entrevista** \_\_\_ : \_\_\_ am / pm

#### PARTE A. Informações demográficas e domiciliares

A1. Em que município você mora: _____
A2. Liste todos os outros municípios em que você já morou e por quanto tempo.: _____
A3. Em que bairro você mora? _____
A4. Esta área é rural ou urbana? 1. Urbana 2. Rural 88. Recusou a responder 99. Não sei
A5. Esta área é coberta por um posto de saúde da família? 1. Sim 2. Não 88. Recusou a responder 99. Não sei
A6. Nos últimos 2 anos, você passou um tempo em outros lugares (para trabalho ou outros motivos) por mais de 1 mês de cada vez? 1. Sim (especificar local e tempo de duração): _____ 2. Não 88. Recusou a responder 99. Não sei
A7. Qual a sua idade? _____ 99. Não sei
A8. Qual é o seu sexo: 1. Masculino 2. Feminino 3. não binário 4. Prefere se autodescrever: _____ 88. Recusou a responder
A9. Como você descreveria sua raça? 1. Negro 2. Branco 3. Pardo 4. Asiático 5. Indígena 6. Outro: _____ 88. Recusou a responder 99. Não sei
A10. Quantas pessoas moram na sua casa? _____ 88. Recusou a responder 99. Não sei
A11. Você está trabalhando atualmente? 1. Sim, tempo integral 2. Sim, meio período 3. Não (to A13) 88. Recusou a responder (to A13)
A12. Se sim, qual é a sua ocupação atual: _____ (to A15)
A13. Se você não está trabalhando atualmente, por que não? 1. Está desempregado 2. Temporariamente em casa 3. Motivos de saúde 4. Aposentado 5. Cuidando das crianças/dona de casa 6. Outros: _____ 88. Recusou a responder
A14. Se você não está trabalhando atualmente, que ocupação/profissão (ões) você teve no passado?

HMM- \_\_\_\_\_

A15. Qual é o seu salário médio mensal ou o de sua família (renda mensal)			
1. < de 1 Salário mínimo	2. 1-3 Salário Mínimo	3. 3 a 5 Salário Mínimo	4. >5 Salário Mínimo
A16. Quantas pessoas na casa esse salário dá suporte (o salário sustenta quantas pessoas da casa)? [ _____ ]			
88. Recusou a responder		99. Não sei	
A17. Qual o seu maior nível de escolaridade?			
1. Nenhum	2. Ensino fundamental	3. Ensino médio	4. Nível Técnico
5. Nível superior	6. Pós-graduação	88. Recusou a responder	99. Não sei
A18. Você tem uma cicatriz da vacina BCG? <b>VERIFICAR NO BRAÇO DO PARTICIPANTE</b>			
Sim		2. Não	
88. Recusou a responder		99. Não sei	
<b>PARTE B. Água, Saneamento e Higiene (WASH), Fatores Domiciliares e Ambientais.</b>			
B1. Qual é a principal fonte de água potável para os membros da sua família? Por favor, indique apenas um.			
11. Água encanada para casa	12. Água canalizada para o quintal		
13. Tubo vertical de torneira pública	14. Cisterna		
15. Poço cavado protegido	21. Poço cavado desprotegido		
16. Bomba de água protegida	22. Bomba de água desprotegida		
17. Coleta de água da chuva	18. Água engarrafada		
23. Carrinho com pequeno tanque / tambor	24. Caminhão-tanque		
25. Águas superficiais	19. Outro: _____		
88. Recusou a responder		99. Não sei	
B2. Qual é a principal fonte de água usada para cozinhar? Por favor, indique apenas um.			
11. Água encanada para casa	12. Água canalizada para o quintal		
13. Tubo vertical de torneira pública	14. Cisterna		
15. Poço cavado protegido	21. Poço cavado desprotegido		
16. Bomba de água protegida	22. Bomba de água desprotegida		
17. Coleta de água da chuva	18. Água engarrafada		
23. Carrinho com pequeno tanque / tambor	24. Caminhão-tanque		
25. Águas superficiais	19. Outro: _____		
88. Recusou a responder		99. Não sei	
B3. Qual é a PRINCIPAL fonte de água utilizada para o banho e para a lavagem das mãos?			
11. Água encanada para casa	12. Água canalizada para o quintal		
13. Tubo vertical de torneira pública	14. Cisterna		
15. Poço cavado protegido	21. Poço cavado desprotegido		
16. Bomba de água protegida	22. Bomba de água desprotegida		
17. Coleta de água da chuva	18. Água engarrafada		
23. Carrinho com pequeno tanque / tambor	24. Caminhão-tanque		
25. Águas superficiais	19. Outro: _____		
99. Eu não sei		88. Recusou-se	
B4. Você lava as mãos antes das refeições?			
1. Sempre	2. Algumas vezes	3. Nunca	4. Outro: _____
88. Recusou a responder		99. Não sei	
B5. Você tem sabonete disponível hoje para lavar as mãos em casa?			
1. Sim	2. Não	88. Recusou a responder	99. Não sei
B6. Você trata sua água de alguma forma para torná-la mais segura para beber?			
1. Sim	2. Não (to B8)	88. Recusou a responder (to B8)	99. Não sei (to B8)
B7. O que você costuma fazer com a água para torná-la mais segura para beber? Por favor, indique apenas um.			
11. Ferve	12. Adiciona água sanitária / cloro	13. Usa um filtro de água	
14. Desinfecção solar	21. Passa por um pano	22. Deixa repousar e assentar	
23. Outros: _____	88. Recusou a responder	99. Não sei	

HMM- \_\_\_\_\_

B8. Que tipo de banheiro os membros da sua casa usam com mais frequência? Por favor, indique apenas um.			
<i>A Descarga</i>			
11. Vai para o sistema de água encanada		12. Vai para a fossa séptica	
13. Vai para a fossa		14. Vai para um lugar a céu aberto	
18. não sabe para onde vai			
<i>Latrinas de fossa seca</i>			
22. Latrina de fossa com laje		23. Latrina de fossa sem laje / fossa a céu aberto	
<i>Sanitário de compostagem</i>			
31. Poço duplo com laje		32. Fossa dupla sem laje	
33. Outros banheiros compostáveis			
41. Balde		42. Saneamento baseado em contêineres	
51. Sanitário suspenso		95. Sem instalações	
96. Outro: _____			
88. Recusou a responder	99. Não sei		
B9. Você compartilha esta instalação com outras famílias?			
1. Sim	2. Não (to B11)	88. Recusou a responder (ir para B11)	99. Não sei (ir para B11)
B10. Quantas famílias usam este banheiro além da sua? [ _____ ]			
88. Recusou a responder	99. Não sei		
B11. Você lava todas as frutas e vegetais antes de cozinhar e servir?			
1. Sim	2. Não (to B13)	88. Recusou a responder (ir para B13)	99. Não sei (ir para B13)
B12. Como você lava suas frutas e vegetais?			
1. Lavo com água da torneira		2. Lavo em água com vinagre	
3. Lavo com água filtrada e uma baixa concentração de água sanitária		4. Eu não os lavo	
88. Recusou a responder	99. Não sei		
B13. Com que frequência as roupas de cama são trocadas em sua casa? <sup>1</sup>			
1. Menos que quinzenal	2. Quinzenalmente ou com mais frequência		
88. Recusou a responder	99. Não sei		
B14. Você compartilha a cama ou outro espaço de dormir com outras pessoas? <sup>1</sup>			
1. Sim	2. Não	88. Recusou a responder	99. Não sei
B15. Quantas pessoas por cômodo há em sua casa? <sup>1</sup>			
1. 0-3 people	2. 4 or more people	88. Recusou a responder	99. Não sei
B16. Você morou em uma casa com piso de areia ou barro nos últimos 10 anos? <sup>1</sup>			
1. Sim	2. Não	88. Recusou a responder	99. Não sei
Ja morou em algum momento da sua vida?			
1. Sim	2. Não		
B17. Você realiza alguma atividade de trabalho e / ou contato recreativo com a água de rios, lagos, córregos ou outra fonte natural de água? <sup>1</sup>			
1. Sim	2. Não (to B20)	88. Recusou a responder (to B20)	99. Não sei (to B20)
Ja realizou em algum momento da sua vida?			
1. Sim	2. Não		
B18. Em caso afirmativo, especifique que tipo de atividade.			
1. Natação	2. Pesca	3. Tomando banho	4. Vadiar
5. Lavando roupas	6. Outros:	88. Recusou a responder	

HMM-\_\_\_\_\_

B19. Com que frequência você realiza esse tipo de atividade?			
1. Mais de uma vez por semana	2. Cerca de uma vez por semana		
3. Uma ou duas vezes por mês	4. Algumas vezes por ano		
5. Raramente	88. Recusou a responder	99. Não sei	
B20. Você trabalhou em uma área agrícola (roça) nos últimos 10 anos? <sup>1</sup>			
1. Sim	2. Não	88. Recusou a responder	99. Não sei
Já trabalhou em algum momento da sua vida? 1. Sim 2. Não			
B21. Você trabalhou em uma floresta/mata/roça nos últimos 10 anos? <sup>1</sup>			
1. Sim	2. Não	88. Recusou a responder	99. Não sei
Já trabalhou em algum momento da sua vida? 1. Sim 2. Não			
B22. Você já caçou nos últimos 10 anos? <sup>1</sup>			
1. Sim	2. Não (to B24)	88. Recusou a responder (to B24)	99. Não sei (to B24)
Já caçou em algum momento da sua vida? 1. Sim 2. Não			
B23. Com que frequência você caça?			
1. Mais de uma vez por semana	2. Cerca de uma vez por semana		
3. Uma ou duas vezes por mês	4. Algumas vezes por ano		
5. Raramente	88. Recusou a responder	99. Não sei	
B24. Existem animais de estimação em sua casa ou animais em sua propriedade? <sup>1</sup>			
1. Sim (especificar): _____	2. Não	99. Não sei	88. Recusou-se
B25. Você já teve contato com tatu?			
1. Muito frequentemente	2. Frequentemente		
3. Às vezes	4. Raramente		
5. Nunca	99. Eu não sei	88. Recusou-se	
B26. Em caso afirmativo, especifique o tipo de contato.			
1. Visto à distância	2. Caça	3. Manuseio de carcaça	
4. Comer	5. Outros: _____	88. Recusou a responder	

**PARTE C. Infecções**

C1. Você já foi diagnosticado com uma infecção por verme/verminose			
1. Sim	2. Não (to Part D)	88. Refused (to Part D)	
99. Não sei (to Part D)			
C2. Se sim, você se lembra de qual verme			
1. Lombriga	2. Schistose	3. Amarelão	
4. Tenia ou solitaria	5. Oxiurus	6. Giardia	
7. Ameba	8. Outros (especificar): _____		
99. Eu não sei	88. Recusou-se		
C3. Em caso afirmativo, você recebeu tratamento para este verme ou outros no passado?			
1. Sim	2. Não	88. Recusou a responder	99. Não sei
C4. Você já teve hanseníase (lepra)? Se sim, <b>tem quanto tempo?</b>			
C5. Você conhece alguém que tem ou que já teve hanseníase (lepra)? Se sim, <b>quem?</b>			

HMM- \_\_\_\_\_

**PARTE D. Nutrição e Insegurança Alimentar.**

D1. Você mudou sua ingestão de alimentos ou dieta recentemente?	
1. Não	2. Sim, para perder peso
3. Sim, por razões médicas	4. Sim, para ser vegetariano ou reduzir o consumo de carne
5. Sim, para reduzir a ingestão de sal	6. Sim, para reduzir o colesterol
7. Sim, para ganhar peso	8. Outros: _____
88. Recusou a responder	99. Não sei
D2. Você está tomando algum suplemento dietético?	
1. Não,	2. Sim, regularmente (especifique): _____
3. Sim, mas não regularmente (especifique): _____	
88. Recusou a responder	99. Não sei
D3. Com que frequência sua família compra comida/faz compra em supermercado/mercearia?	
1. Mais frequentemente do que uma vez por semana	3. Uma vez a cada 2 semanas
2. Uma vez por semana	5. Menos frequentemente do que uma vez a cada 3 semanas
4. Uma vez a cada 3 semanas	
88. Recusou a responder	99. Não sei
D4. Nos últimos 3 meses, você estava preocupado em ficar sem comida antes de poder comprar ou receber mais comida?	
1. Nunca	2. Quase todos os dias
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias
88. Recusou a responder	99. Não sei
D5. Nos últimos 3 meses, você ficou sem comida antes de ter dinheiro para comprar mais? (nos últimos 3 meses)	
1. Nunca	2. Quase todos os dias
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias
88. Recusou a responder	99. Não sei
D6. Nos últimos 3 meses, ficou sem dinheiro para comprar uma alimentação saudável e variada?	
1. Nunca	2. Quase todos os dias
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias
88. Recusou a responder	99. Não sei
D7. Nos últimos 3 meses, você teve que mudar sua dieta em apenas alguns tipos de alimentos porque não havia dinheiro suficiente para comprar alimentos?	
1. Nunca	2. Quase todos os dias
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias
88. Recusou a responder	99. Não sei
D8. Nos últimos 3 meses, você reduziu o tamanho das suas refeições porque não havia dinheiro suficiente para comprar comida?	
1. Nunca	2. Quase todos os dias
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias
88. Recusou a responder	99. Não sei
D9. Nos últimos 3 meses, você teve que ficar sem uma refeição porque não havia dinheiro suficiente para comprar comida?	
1. Nunca	2. Quase todos os dias
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias
88. Recusou a responder	99. Não sei
D10. Nos últimos 3 meses, você comeu menos do que achava que deveria porque não havia dinheiro suficiente para comprar comida?	
1. Nunca	2. Quase todos os dias
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias
88. Recusou a responder	99. Não sei

HMM- \_\_\_\_\_

D11. Nos últimos 3 meses, você sentiu fome mas não comeu porque não tinha dinheiro para comprar comida?			
1. Nunca	2. Quase todos os dias		
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias		
88. Recusou a responder	99. Não sei		
D12. Nos últimos 3 meses, você perdeu peso porque não tinha dinheiro para comprar comida?			
1. Não	2. Sim, um pouco	3. Sim, some	4. Sim, muito
88. Recusou a responder	99. Não sei		
D13. Nos últimos 3 meses, você não conseguiu oferecer aos seus filhos / adolescentes uma alimentação saudável e variada por não ter dinheiro suficiente?			
1. Nunca	2. Quase todos os dias		
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias		
88. Recusou a responder	99. Não sei	00. Não tem filhos	
D14. Nos últimos 3 meses, alguma das crianças / adolescentes não comeu o suficiente porque não havia dinheiro suficiente para comprar alimentos?			
1. Nunca	2. Quase todos os dias		
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias		
88. Recusou a responder	99. Não sei	00. Não tem filhos	
D15. Nos últimos 3 meses, você já reduziu o tamanho das refeições de seus filhos / adolescentes porque não tinha dinheiro suficiente para comprar comida?			
1. Nunca	2. Quase todos os dias		
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias		
88. Recusou a responder	99. Não sei	00. Não tem filhos	
D16. Nos últimos 3 meses, seus filhos / adolescentes alguma vez tiveram que ficar sem uma refeição porque não havia dinheiro para comprar comida?			
1. Nunca	2. Quase todos os dias		
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias		
88. Recusou a responder	99. Não sei	00. Não tem filhos	
D17. Nos últimos 3 meses, seus filhos / adolescentes já passaram fome porque você não conseguiu comprar mais comida?			
1. Nunca	2. Quase todos os dias		
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias		
88. Recusou a responder	99. Não sei	00. Não tem filhos	
D18. Nos últimos 3 meses, os seus filhos alguma vez ficaram sem comer um dia inteiro porque não havia dinheiro suficiente para comprar comida?			
1. Nunca	2. Quase todos os dias		
3. Em apenas alguns dias	4. Em apenas um ou dois dias		
88. Recusou a responder	99. Não sei	00. Não tem filhos	

Obrigado por participar desta pesquisa. Seu tempo e contribuição aumentarão o conhecimento para combater infecções em sua comunidade

Horário de término da entrevista \_\_\_\_: \_\_\_\_ am / pm

#### References

- Kerr-Pontes LRS, Barreto ML, Evangelista CMN, Rodrigues LC, Heukelbach J, Feldmeier H (2006). Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. *International Journal of Epidemiology*, 35, 994-1000. doi: 10.1093/ije/dyl072.
- Hackett M, Melgar-Quinónez H, Pérez-Escamilla R, Segall-Corrêa AM (2008). Gender of respondent does not affect the psychometric properties of the Brazilian Household Food Security Scale. *International Journal of Epidemiology*, 37(4), 766-774. doi: 10.1093/ije/dyn084.

## ANEXO B – Questionário com aspectos clínicos

HMM- \_\_\_\_\_

### Identificando Fatores de Risco para a Transmissão de Hanseníase Relacionados a Co-infecções, Água Contaminada e Subnutrição Utilizando o Novo Multiplex Sorológico e Ensaios Metabômicos de Alta Resolução

#### Instruções para ENTREVISTADOR

1. Leia qualquer texto em itálico em voz alta
2. Escreva o número do ID HMM em cada página do questionário
3. Leia as perguntas em voz alta, mas não leia as respostas
4. Siga o padrão de salto especificado na coluna padrão de salto
5. Circule o número que coincide com a resposta do participante
6. Para perguntas com respostas abertas, escreva a resposta nas linhas designadas
7. Para perguntas que tenham várias respostas, confira tudo o que se aplica

#### Introdução

*Olá meu nome é \_\_\_\_\_. Obrigado por participar deste estudo. Faça parte de uma equipe de cientistas da Universidade Federal de Juiz de Fora – GV e da Emory University que investiga os efeitos da hanseníase no corpo humano. Você assinou um formulário de consentimento, e para lembrá-lo, tudo o que você disser aqui será mantido em sigilo. Sua contribuição é totalmente voluntária e você pode mudar de ideia a qualquer momento. Seu nome não será mencionado em nenhuma apresentação/publicação relacionada a este estudo. A duração prevista desta pesquisa é de 10 a 15 minutos. Você ainda concorda participar? ( ) Sim ( ) Não*

Horário de início da entrevista \_\_\_\_\_: \_\_\_\_\_am/pm

#### SEÇÃO A: Parte Geral

A1	Você notou alguma mudança em sua saúde desde a última vez que participou deste estudo? 1. Sim 2. Não 88. Não Sabe 99. Se recusou a responder
A2	Você recebeu algum novo diagnóstico de doença desde a última vez que participou deste estudo? 1. Sim 2. Não (IR PARA QUESTÃO A4) 88. Não Sabe 99. Se recusou a responder
A3	Que novo diagnóstico você recebeu? _____
A4	Foi prescrito algum medicamento novo, desde a última vez que participou neste estudo? 1. Sim 2. Não (IR PARA QUESTÃO A6) 88. Não Sabe 99. Se recusou a responder
A5	Que novo(s) medicamento(s) você recebeu? _____

A6	<p>Você sentiu/experimentou os seguintes sintomas? (obs: pode ser assinalado mais de uma alternativa).</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Dormência nas mãos ou pés</td> <td><input type="checkbox"/> Dor nos nervos do corpo</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Formigamento</td> <td><input type="checkbox"/> Inchaço nas mãos ou pés</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Dormência na pele</td> <td><input type="checkbox"/> Inchaço no rosto</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Cãibras</td> <td><input type="checkbox"/> Fraqueza nas mãos</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Sensação de picada ou agulhada na pele</td> <td><input type="checkbox"/> Fraqueza nos pés</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Manchas na pele</td> <td><input type="checkbox"/> Perda de cílios ou pelos da sobrancelha</td> </tr> </table> <p>88. Não sabe 99. Se recusou</p>	<input type="checkbox"/> Dormência nas mãos ou pés	<input type="checkbox"/> Dor nos nervos do corpo	<input type="checkbox"/> Formigamento	<input type="checkbox"/> Inchaço nas mãos ou pés	<input type="checkbox"/> Dormência na pele	<input type="checkbox"/> Inchaço no rosto	<input type="checkbox"/> Cãibras	<input type="checkbox"/> Fraqueza nas mãos	<input type="checkbox"/> Sensação de picada ou agulhada na pele	<input type="checkbox"/> Fraqueza nos pés	<input type="checkbox"/> Manchas na pele	<input type="checkbox"/> Perda de cílios ou pelos da sobrancelha
<input type="checkbox"/> Dormência nas mãos ou pés	<input type="checkbox"/> Dor nos nervos do corpo												
<input type="checkbox"/> Formigamento	<input type="checkbox"/> Inchaço nas mãos ou pés												
<input type="checkbox"/> Dormência na pele	<input type="checkbox"/> Inchaço no rosto												
<input type="checkbox"/> Cãibras	<input type="checkbox"/> Fraqueza nas mãos												
<input type="checkbox"/> Sensação de picada ou agulhada na pele	<input type="checkbox"/> Fraqueza nos pés												
<input type="checkbox"/> Manchas na pele	<input type="checkbox"/> Perda de cílios ou pelos da sobrancelha												

SEÇÃO B: Status da vacinação COVID-19							
B1	<p>Você recebeu alguma vacina aprovada contra COVID-19?</p> <p>1. Sim 2. Não (IR PARA QUESTÃO C1) 88. Não Sabe 99. Se recusou a responder</p>						
B2	<p>Quantas doses da vacina contra COVID-19 você recebeu?</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Uma</td> <td><input type="checkbox"/> Três</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Duas</td> <td><input type="checkbox"/> Quatro</td> </tr> </table> <p>88. Não sabe (IR PARA QUESTÃO C1) / 99. Se recusou</p>	<input type="checkbox"/> Uma	<input type="checkbox"/> Três	<input type="checkbox"/> Duas	<input type="checkbox"/> Quatro		
<input type="checkbox"/> Uma	<input type="checkbox"/> Três						
<input type="checkbox"/> Duas	<input type="checkbox"/> Quatro						
B3	<p>Marca da Vacina da Primeira Dose? (Verificar informação no cartão de vacina, se estiver disponível)</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Coronavac</td> <td><input type="checkbox"/> Pfizer</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> AstraZeneca</td> <td><input type="checkbox"/> Janssen</td> </tr> <tr> <td>88. Não sabe / 99. Se recusou</td> <td><input type="checkbox"/> Outra (especificar: _____)</td> </tr> </table>	<input type="checkbox"/> Coronavac	<input type="checkbox"/> Pfizer	<input type="checkbox"/> AstraZeneca	<input type="checkbox"/> Janssen	88. Não sabe / 99. Se recusou	<input type="checkbox"/> Outra (especificar: _____)
<input type="checkbox"/> Coronavac	<input type="checkbox"/> Pfizer						
<input type="checkbox"/> AstraZeneca	<input type="checkbox"/> Janssen						
88. Não sabe / 99. Se recusou	<input type="checkbox"/> Outra (especificar: _____)						
B4	<p>Data da Primeira Dose: (formato DD/MM/AA) __/__/____ 88. Não sabe</p>						
B5	<p>Marca da Vacina da Segunda Dose? (Verificar informação no cartão de vacina, se estiver disponível)</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Coronavac</td> <td><input type="checkbox"/> Pfizer</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> AstraZeneca</td> <td><input type="checkbox"/> Janssen</td> </tr> <tr> <td>88. Não sabe / 99. Se recusou</td> <td>Outra (especificar: _____)</td> </tr> </table> <p>00. Não recebeu a segunda dose</p>	<input type="checkbox"/> Coronavac	<input type="checkbox"/> Pfizer	<input type="checkbox"/> AstraZeneca	<input type="checkbox"/> Janssen	88. Não sabe / 99. Se recusou	Outra (especificar: _____)
<input type="checkbox"/> Coronavac	<input type="checkbox"/> Pfizer						
<input type="checkbox"/> AstraZeneca	<input type="checkbox"/> Janssen						
88. Não sabe / 99. Se recusou	Outra (especificar: _____)						
B6	<p>Data da Segunda Dose: (formato DD/MM/AA) __/__/____ 88. Não sabe</p>						
B7	<p>Marca da Vacina da Terceira Dose? (Verificar informação no cartão de vacina, se estiver disponível)</p> <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Coronavac</td> <td><input type="checkbox"/> Pfizer</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> AstraZeneca</td> <td><input type="checkbox"/> Janssen</td> </tr> <tr> <td>88. Não sabe / 99. Se recusou</td> <td>Outra (especificar: _____)</td> </tr> </table> <p>00. Não recebeu a terceira dose</p>	<input type="checkbox"/> Coronavac	<input type="checkbox"/> Pfizer	<input type="checkbox"/> AstraZeneca	<input type="checkbox"/> Janssen	88. Não sabe / 99. Se recusou	Outra (especificar: _____)
<input type="checkbox"/> Coronavac	<input type="checkbox"/> Pfizer						
<input type="checkbox"/> AstraZeneca	<input type="checkbox"/> Janssen						
88. Não sabe / 99. Se recusou	Outra (especificar: _____)						
B8	<p>Data da Terceira Dose: (formato DD/MM/AA) __/__/____ 88. Não sabe</p>						
B9	<p>Marca da Vacina da Quarta Dose? (Verificar informação no cartão de vacina, se estiver disponível)</p>						

HMM-\_\_\_\_\_

	<input type="checkbox"/> Coronavac <input type="checkbox"/> AstraZeneca 88. Não sabe / 99. Se recusou 00. Não recebeu a quarta dose	<input type="checkbox"/> Pfizer <input type="checkbox"/> Janssen Outra (especificar: _____)
B10	Data da Quarta Dose: (formato DD/MM/AA) __/__/____ 88. Não sabe	

SEÇÃO C: História Detalhada da Hanseníase - Contatos	
C1	Você já teve contato com alguém que foi diagnosticado com hanseníase? 1. Sim 2. Não (IR PARA SEÇÃO D) 88. Não Sabe 99. Se recusou a responder
C2	Com quem você teve contato? <input type="checkbox"/> Cônjuge <input type="checkbox"/> Pai <input type="checkbox"/> Irmão <input type="checkbox"/> Outro membro da família: _____ <input type="checkbox"/> Vizinho <input type="checkbox"/> Colega de trabalho <input type="checkbox"/> Outro: _____ 88. Não Sabe 99. Se recusou a responder
C3	Você mora/morou com alguém que tem/teve hanseníase? 1. Sim 2. Não (FINALIZAR A ENTREVISTA) 88. Não Sabe 99. Se recusou a responder
C4	Por quanto tempo você morou com essa pessoa? 1. Menos de 1 ano 2. Entre 1 e 5 anos 3. Entre 5 e 10 anos 4. Mais de 10 anos 88. Não sabe 99. Se recusou

Horário de final da entrevista \_\_\_\_:\_\_\_\_am/pm

SEÇÃO D: Resultados dos testes	
<b>PARA PARTICIPANTES NEGATIVOS ANTI-LID-1 (CONTROLES)</b>	
D1	Resultado do exame realizado por pesquisador <input type="checkbox"/> Lesões suspeitas observadas (continuar até D2) <input type="checkbox"/> Não foram observadas lesões suspeitas
<b>PARA PARTICIPANTES POSITIVOS ANTI-LID-1 (CASOS) OU CONTROLES COM LESÕES SUSPEITAS</b>	
	Resultado de exame realizado por dermatologista <input type="checkbox"/> Lesões suspeitas observadas <input type="checkbox"/> Não foram observadas lesões suspeitas
D2	Resultado da avaliação da mancha de pele (índice baciloscópico) <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não realizou teste
	Resultado da avaliação histopatológica da biópsia da lesão <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não realizou teste
	Resultado do qPCR <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não realizou teste

## ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido



Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa

### **O que é um estudo de pesquisa?**

O principal objetivo dos estudos de pesquisa é adquirir conhecimento. Este conhecimento pode ser usado para ajudar outras pessoas. Os estudos de pesquisa não pretendem beneficiá-lo diretamente, embora alguns possam.

### **Eu tenho que participar ?**

**Não. Participar deste estudo é inteiramente sua escolha. Se decidir participar deste estudo, você pode mudar de ideia mais tarde e retirar-se do estudo de pesquisa.**

A participação no estudo é separada dos cuidados médicos. A decisão de ingressar ou não no estudo de pesquisa não afetará seu status como paciente.

### **O que é este documento?**

Este documento é um termo de consentimento. Ele descreve os riscos do estudo, os procedimentos e quaisquer custos para você.

Ao assinar este documento, você está aceitando participar deste estudo e permite que suas informações de saúde sejam utilizadas.

### **O que eu devo fazer a seguir?**

1. Ler este termo de consentimento ou pedir que seja lido para você.
2. Certifique-se de que o médico ou a equipe do estudo explique o estudo para você.
3. Faça perguntas (por exemplo, por quanto tempo, palavras desconhecidas, procedimentos específicos, etc.)
4. Se houver tratamento médico, saiba quais são parte da pesquisa e quais são dos cuidados padrão.
5. Reflita sobre a sua participação e converse com sua família e amigos sobre isso.

### UNIVERSIDADE EMORY

#### TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAR DO ESTUDO DE PESQUISA

**Título: Identificando Fatores de Risco para a Transmissão de Hanseníase Relacionados a Co-infecções, Água Contaminada e Subnutrição Utilizando o Novo Multiplex Sorológico e Ensaio Metabólico de Alta Resolução**

**Principais Investigadores:** Jessica K Fairley, MD, MPH, Emory University, Atlanta, GA, USA

Lucia Alves de Oliveira Fraga, PhD, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Governador Valadares, Brazil

Jose Ferreira, PhD, MPH, Faculdade Saúde e Ecologia Humana (FASEH), Vespasiano, Brazil

**Fonte de Financiamento:** Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq)

*Se você for o responsável legal de uma criança que está sendo convidada a participar, o termo “você” usado neste termo de consentimento se refere à criança.*

### **Introdução**

Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa médica. Este termo de consentimento foi elaborado para dizer tudo o que você precisa saber antes de decidir se deseja fazer parte do estudo. **A escolha é inteiramente sua. Se você decidir participar, você pode mudar de ideia mais tarde e desistir de participar do estudo.** A decisão de participar

ou não do estudo não fará com que você perca nenhum benefício médico. Se decidir não participar do estudo, o seu tratamento irá continuar.

Antes de tomar sua decisão:

- Por favor, leia atentamente este termo de consentimento ou peça que ele seja lido para você
- Por favor, ouça o médico ou a equipe do estudo explicar tudo para você
- Por favor, faça perguntas sobre qualquer coisa que não esteja clara para você

Você pode tirar uma cópia deste termo de consentimento. Fique à vontade para pensar se gostaria de participar. Você pode discutir sua decisão com sua família e seus amigos. Não assine este termo de consentimento, a menos que você tenha a chance de fazer perguntas e obter respostas que façam sentido para você. Ao assinar este termo de consentimento, você não abrirá mão de quaisquer direitos legais.

**Qual é o objetivo deste estudo?**

O objetivo deste estudo é testar membros da comunidade para exposição ou infecção (passada ou presente) a diversas bactérias e parasitas patogênicos, incluindo a hanseníase, esquistossomose, outras infecções de helmintos e COVID-19. Ao medir os anticorpos para estas infecções em sua comunidade, estaremos mais aptos a compreender os padrões de transmissão e onde precisamos concentrar esforços para reduzir estas infecções. Além disso, ao identificar as pessoas que têm o anticorpo para a hanseníase, seremos capazes de acompanhá-las de perto para os sinais e sintomas da hanseníase e investigar seus fatores de risco, como exposições ambientais, fatores nutricionais e outras infecções. Embora este teste seja apenas para fins de pesquisa, se houver testes positivos para certas infecções, notificaremos o centro de saúde da família que poderá encaminhá-los para testes e tratamento adequados, se necessário. Planejamos inscrever 1200 participantes em todo o estado de Minas Gerais.

**O que me pedirão para fazer?**

Este é um estudo de vários anos. Alguns participantes só precisarão ter uma visita de estudo, outros poderão ser acompanhados a cada 6 ou 12 meses durante 3 anos, dependendo dos resultados do exame de sangue inicial. No máximo, você será solicitado a responder um breve questionário e a dar uma amostra de sangue, seja por meio de uma picada no dedo ou por meio de uma agulha. Você também poderá ser solicitado a colher amostras de fezes para o diagnóstico de infecções parasitárias. Aqueles que apresentarem resultados positivos no teste de anticorpos para a hanseníase serão notificados e examinados quanto à doença ativa.

**A quem pertencem as informações e amostras do meu estudo?**

Se você se juntar a este estudo, estará doando suas amostras e informações de estudo. Você não receberá nenhuma compensação se suas amostras ou informações forem utilizadas para fazer um novo produto. Se você se retirar do estudo, dados e amostras que já foram coletadas ainda poderão ser utilizados para este estudo.

**Quais são os possíveis riscos e desconfortos?**

Podem haver efeitos colaterais dos procedimentos que não são conhecidos neste momento.

Os riscos e desconfortos esperados neste estudo são os seguintes:

Para a retirada de sangue:

1. Pequenos hematomas e sangramentos no local da retirada de sangue e da picada no dedo.
2. Desconforto e pequena dor durante a retirada de sangue.

Menos comuns:

1. A tontura após a retirada do sangue.
2. Desmaio e infecção em casos muito raros.

Para o questionário:

1. Pequenos inconvenientes durante o preenchimento do questionário.

É possível que os pesquisadores aprendam algo novo durante o estudo sobre os riscos de estar nele. Se isso acontecer, eles lhe falarão sobre o assunto. Então você pode decidir se quer ou não continuar neste estudo. Você pode ser solicitado a assinar um novo formulário de consentimento que inclua as novas informações, caso decida permanecer no estudo. Há um risco de quebra de confidencialidade, mas todos os esforços serão feitos para garantir que isso não aconteça, armazenando informações privadas em computadores protegidos por senha ou em gabinetes e escritórios trancados.

**Vou me beneficiar diretamente com o estudo?**

Este estudo não foi elaborado para beneficiá-lo diretamente. Este estudo foi elaborado para aprender mais sobre a frequência de diferentes infecções na comunidade e quantas pessoas correm o risco de contrair essas infecções, que incluem hanseníase, infecções por vermes parasitas e outros. Os resultados do estudo podem ser usados para ajudar outras pessoas no futuro.

**Serei recompensado pelo meu tempo e esforço?**

Você não receberá uma compensação por participar deste estudo.

**Quais são minhas outras opções?**

Se você decidir não entrar neste estudo, você não precisa participar.

**Como você protegerá minhas informações privadas coletadas neste estudo?**

Sempre que possível, um número do estudo, em vez do seu nome, será usado nos registros do estudo. Seu nome e outras informações de identificação não aparecerão quando apresentarmos ou publicarmos os resultados do estudo.

Certos escritórios e outras pessoas que não os pesquisadores podem consultar os registros do estudo, por exemplo, os escritórios da Emory ou os da UFJF-Campus Valadares que fazem parte do Programa de Proteção ao Participante em Pesquisa em Seres Humanos e aqueles que estão envolvidos na administração do estudo. Isso inclui o IRB, Escritórios de Conformidade, Escritório de Proteção em Pesquisa Humana e o Escritório de Pesquisa Clínica. Agências governamentais e financiadores de estudos também podem consultar seus registros de estudo.

Um número de estudo, em vez de seu nome, será usado nos registros do estudo sempre que possível. Seu nome e outros fatos que possam apontar para você não aparecerão quando apresentarmos este estudo ou publicarmos seus resultados.

Faremos tudo o que estiver ao nosso alcance para impedir que outras pessoas saibam sobre sua participação na pesquisa.

**Certificado de Confidencialidade**

Existe um Certificado de Confidencialidade do "National Institutes of Health" (Institutos Nacionais de Saúde) para este estudo. O Certificado de Confidencialidade nos ajuda a evitar que outras pessoas saibam que você participou deste estudo. A Emory se baseará no Certificado de Confidencialidade para se recusar a fornecer informações do estudo que o identifiquem. Por exemplo, se Emory recebesse uma intimação para registros de estudo, ela não forneceria informações que o identificassem.

O Certificado de Confidencialidade não impede que você ou outra pessoa, como um membro da sua família, forneça informações sobre a sua participação neste estudo. Por exemplo, se você informar a sua seguradora de que está neste estudo e concordar em fornecer informações da pesquisa à seguradora, o investigador não poderá usar o Certificado para reter essas informações. Isso significa que você e sua família também precisam proteger sua privacidade.

O certificado não impede a Emory de fazer as seguintes divulgações sobre você:

- Fornecer informações às autoridades estaduais de saúde pública sobre certas doenças infecciosas,
- Dar aos oficiais de justiça informações sobre o abuso de uma criança, pessoa idosa ou pessoa com deficiência.
- Fornecer informações para evitar danos a você ou a outras pessoas.

Fornecer ao patrocinador ou financiadores do estudo informações sobre o estudo, incluindo informações para uma auditoria ou avaliação.

#### **Armazenamento e compartilhamento das suas informações**

Os dados não identificados deste estudo podem ser compartilhados com a comunidade de pesquisa em geral para o avanço da ciência e da saúde. Os dados deste estudo podem ser colocados em bancos de dados públicos onde, além de não ter identificadores diretos, os pesquisadores precisarão assinar acordos de uso de dados antes de acessar os dados. Removeremos ou codificaremos quaisquer informações pessoais que possam identificá-lo antes que suas informações sejam compartilhadas. Isso garantirá que, pelos padrões científicos atuais e métodos conhecidos, seja extremamente improvável que alguém seja capaz de identificá-lo a partir das informações que compartilhamos. Apesar dessas medidas, não podemos garantir o anonimato de seus dados pessoais.

Seus dados [e espécimes] deste estudo podem ser úteis para outras pesquisas feitas por pesquisadores da Emory ou em outro lugar. Para ajudar na ciência, podemos fornecer seus dados e / ou espécimes não identificados a outros pesquisadores. Se o fizermos, não incluiremos nenhuma informação que possa identificá-lo. Se seus dados ou amostras estiverem rotulados com seu ID do estudo, não permitiremos que outros investigadores vinculem esse ID às suas informações identificáveis.

#### **Em Caso de Intercorrências**

Se você ficar doente ou for ferido por participar do estudo, a UFJF ou a Emory o ajudarão a receber tratamento médico. Você deve informar ao médico do estudo imediatamente se você for ferido ou adoecer. Se você acredita que foi ferido ou adoeceu por causa deste estudo, você deve contactar a Dra. Fraga pelo número (33) 32795982/5983. Você também deve informar a qualquer outro profissional da saúde que o atender que você está participando de uma pesquisa científica.

Se você se ferir ou adoecer como resultado direto da participação neste estudo, o patrocinador irá custear o tratamento médico se:

- (a) Não for uma condição médica que você já havia antes de participar do estudo;
- (b) Não for resultado do progresso natural da sua doença ou condição;
- (c) Não for causada pela sua falha em seguir as orientações do estudo; e
- (d) Não for provado ter sido causado diretamente por negligência de um empregado da Emory ou do patrocinador. "Negligência" é a falha em seguir um dever de cuidado padrão.

Seu seguro será cobrado por quaisquer custos de tratamento médico para sua lesão ou doença que o patrocinador não pague. Sua seguradora pode ser informada de que você está em um estudo de pesquisa. Se você não tiver seguro ou se o seu seguro não cobrir, você terá que arcar com esses custos.

A Emory não reservou fundos para pagar você ou seu tratamento, caso você adoeca ou se machuque por participar do estudo. A única exceção a esta política é se ficar provado que sua lesão ou doença foi causada diretamente por negligência de um funcionário da Emory ou patrocinador.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Anuência do participante da pesquisa, criança, adolescente ou legalmente incapaz)

O menor

sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como **voluntário(a)** a participar da pesquisa "**Hanseníase, parasitoses e deficiência de micronutrientes: novos paradigmas para combater uma doença antiga**". O tempo de duração desta pesquisa será de 24 meses sendo início após aprovação do Comitê de Ética. Nesta pesquisa pretendemos "Entender porque algumas pessoas, tendo contato com as pessoas que têm hanseníase podem desenvolver a doença e outras não, além disso, vamos estudar se a presença de verminose e desnutrição pode afetar o desenvolvimento da hanseníase podendo tornar esta doença mais grave". O motivo que nos leva a estudar a doença hanseníase, baseia-se nos números elevados de casos novos nas cidades. Nossos objetivos são realizar a vigilância, o acompanhamento e o diagnóstico dos indivíduos que possuem o micróblio da hanseníase e também seus contatos domiciliares. Estas ações poderão contribuir para o controle mais eficaz dessa doença.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos:

1. Será realizado o exame clínico, por médicos e outros profissionais da saúde previamente treinados. Durante o exame clínico, será aplicado um questionário, com perguntas a respeito da hanseníase e aplicada uma entrevista para desenhar um gráfico, chamado genograma, onde estarão indicados todos os membros da família e todas as pessoas que residem juntas.
2. Serão realizados testes no sangue para auxiliar no diagnóstico da doença. Para estes testes iremos coletar não mais que 3ml/Kg em 24 horas ou no máximo 50 mL de sangue da veia do seu braço. O sangue coletado por profissional treinado será levado aos laboratórios de imunologia e biologia celular e genética molecular para fazer testes que irão mostrar como o seu organismo se defende contra o micróblio que causa a hanseníase. Os testes serão, por exemplo, medir substâncias de defesa (tais como anticorpos, citocinas e outras), verificar se o material genético (DNA) do micróblio que causa a hanseníase está presente no sangue; estudar no seu material genético se existem características herdadas que estejam relacionadas ao desenvolvimento ou não da hanseníase, bem como verificar as quantidade de micronutrientes (tais como vitamina A, ferro, vitamina D).
3. O raspado da pele será coletado para ver se o micróblio está presente. A coleta de raspado da pele será feita no lóbulo da orelha, do cotovelo ou mancha na pele com a utilização de um instrumento que raspa a pele.
4. Coleta de fezes para exame parasitológico. Você será instruído como as fezes devem ser coletadas quando você recebe o frasco.
5. Se você ainda não teve uma biópsia recente da pele para o diagnóstico de hanseníase, uma será realizada para confirmar o tipo da doença que você tem. Se o médico suspeita que você não tenha hanseníase, você não vai precisar de uma biópsia da pele. Fazer uma biópsia significa a remoção de um pequeno pedaço da pele. Para fazer esta biópsia da pele, você receberá uma injeção para anestésiar a área. Depois de anestésiar, será feito um pequeno corte para retirar o fragmento de pele. Não deverá ocorrer muito sangramento.

Os riscos são poucos e podemos citar: na coleta de sangue você pode sentir leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de manchas roxas no local da entrada da agulha. Estas manchas desaparecerem em alguns dias. A coleta será realizada de modo mais confortável possível. A coleta de raspado da pele pode trazer ardência e dor no local da coleta. Após algumas horas ou poucos dias a pele cicatriza sem necessidade de qualquer medicamento. Para a biópsia da pele, algumas pessoas (menos de uma em 10.000) são alérgicas a este tipo de injeção (anestésico). Se você é alérgico, você pode ter alguns dos seguintes sintomas: vermelhidão no local de injeção, coceira, erupção na pele, ou muito raramente dificuldade para respirar. Infecção pode ocorrer mas não é comum. Uma pequena cicatriz irá formar no lugar da biópsia. A cicatriz é geralmente muito menor do que o corte original, e às vezes é quase invisível.

A participação do menor é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo médico ou equipe de saúde. Para participar deste estudo você gastará nada. Você ou o menor não terão nenhum custo, nem receberão qualquer vantagem financeira. Se ocorrer danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização.

1 de 2

Campo de rubrica

Você pode perguntar o que quiser sobre este estudo e estará livre para participar ou recusar-se a participar em qualquer momento. Os resultados dos exames clínicos e laboratoriais serão informados e explicados a seu responsável. Caso os exames mostrem que você tem o micróbio da hanseníase você será encaminhado para tratamento médico adequado. O seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão e a do seu responsável. Em caso de publicação dos resultados da pesquisa você não será identificado. Se você decidir por participar da pesquisa, você estará em um dos três grupos: 1) aqueles recém diagnosticados da doença de hanseníase, 2) contatos saudáveis de pacientes com hanseníase, ou 3) os participantes saudáveis, sem contato conhecido de um paciente com hanseníase.

Este termo de consentimento de duas páginas encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

#### Declaração de consentimento

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do documento de identidade \_\_\_\_\_, responsável pelo menor \_\_\_\_\_, nascido em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ com idade de \_\_\_\_\_ anos, residente no endereço (Rua/Av) \_\_\_\_\_ Nº. \_\_\_\_\_ complemento \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_, Cidade \_\_\_\_\_ (MG), fone de contato ( ) \_\_\_\_\_ e ( ) \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa "Hanseníase, parasitoses e deficiência de micronutrientes: novos paradigmas para combater uma doença antiga", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento posso solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_.  
Local e data

Nome	Assinatura do responsável	Data
Nome	Assinatura pesquisador	Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**CEP - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano-UFJF**

Campus Universitário da UFJF

Pró-Reitoria de Pesquisa

CEP: 36036-900

Fone: (32) 2102-3788 / E-mail: cep.propesq@uff.edu.br

**Nome do Pesquisador Responsável: Lucia Alves de Oliveira Fraga**

Universidade Federal de Juiz de Fora – Campus Governador Valadares

Rua Israel Pinheiro, 2000 Bairro Universitários (campus Univale II)

Fone: (33) 88629849

E-mail: [lucialvesfraga@yahoo.com.br](mailto:lucialvesfraga@yahoo.com.br), [lucialves.fraga@uff.edu.br](mailto:lucialves.fraga@uff.edu.br)

Campo de rubrica