

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA E PATOLOGIA LEGAL  
CURSO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA

LUCIANO AUGUSTO OLIVEIRA DE JESUS

PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$  EM PACIENTES COM HANSENÍASE E EM SEUS  
CONTACTANTES NUMA AMOSTRA POPULACIONAL DO MUNICÍPIO DE SOBRAL-  
CEARÁ

FORTALEZA  
2007

LUCIANO AUGUSTO OLIVEIRA DE JESUS

PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$  EM PACIENTES COM HANSENÍASE E EM SEUS CONTACTANTES NUMA AMOSTRA POPULACIONAL DO MUNICÍPIO DE SOBRAL-CEARÁ

Dissertação Submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Imunologia  
Orientadora: Lília Maria Carneiro Câmara

FORTALEZA  
2007

## Ficha catalográfica

J56p Jesus, Luciano Augusto Oliveira de  
Produção de IFN- $\gamma$  em pacientes com hanseníase e  
em seus contactantes numa amostra populacional do  
município de Sobral-Ceará/ Luciano Augusto Oliveira de  
Jesus. 2007.  
95 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara  
Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Ceará.  
Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2007.

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Interferon Tipo II . 3.  
Hanseníase. I. Câmara, Lília Maria Carneiro (Orient.). II.  
Título.

CDD 616.998

LUCIANO AUGUSTO OLIVEIRA DE JESUS

PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$  EM PACIENTES COM HANSENÍASE E EM SEUS CONTACTANTES NUMA AMOSTRA POPULACIONAL DO MUNICÍPIO DE SOBRAL-CE

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 26/10/2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara (Orientadora)  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Lígia Regina Kerr  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. João Santana da Silva  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

À minha esposa Rejane de Sá Duarte, pelo carinho, afeto, amor e compreensão, e paciência durante este estudo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meus irmãos, e toda a minha família que sempre acreditou na conclusão deste trabalho.

Aos pacientes e seus contactantes, principal motivação para este trabalho, por possibilitar o estudo da hanseníase.

À Professora, Dra. Lília Maria Carneiro Câmara pela orientação e observações criteriosas na elaboração deste trabalho.

À Dra. Lígia Kerr-Pontes pelo grande apoio, suporte e desenvolvimento do projeto.

Ao Professor Dr. Brennam do Mycobacteria Research Laboratories, Universidade do Estado do Colorado, pelo fornecimento do antígeno bruto de *Mycobacterium leprae*.

Ao Professor Dr. Júlio Sidrim, por possibilitar-me na realização da dosagem de IFN- $\gamma$ .

Ao Departamento de Parasitologia pelos conhecimentos compartilhados na padronização da técnica de cultura de células.

A Maria da Conceição Nunes, Sandra Flor e demais Equipe de Enfermagem do Município de Sobral-CE, que auxiliaram na coleta, distribuição e transporte de amostra.

A todos os professores e alunos deste Curso de Pós-Graduação, e todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A hanseníase, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*, é doença de amplo espectro clínico e imunopatológico. Suas apresentações clínicas estão correlacionadas com padrões imunológicos distintos, variando de uma vigorosa resposta imune mediada por células ao *M. leprae*, com padrão tipo 1 no polo tuberculóide, a uma ausência de resposta celular específica aos antígenos do *M. leprae* no pólo lepromatoso, com predomínio de resposta tipo 2 e exacerbação da resposta humoral. A capacidade do antígeno bruto de *M. leprae* em estimular células mononucleares do sangue periférico (PBMC) na produção de IFN- $\gamma$  foi avaliada em pacientes com hanseníase e em seus contactantes, do município de Sobral-CE. Um total de 30 casos foi estudado, antes de receberem tratamento poliquimioterápico. O grupo de casos paucibacilares foi constituído por oito com a forma indeterminada, dez com a forma tuberculóide, dois com a forma dimorfo tuberculóide; e o grupo multibacilar foi constituído por dez com a forma virchoviana e dois com a forma dimorfa virchoviana. O grupo de contactantes foi constituído por sessenta indivíduos, sendo 1 consangüíneo e 1 não consangüíneo para cada caso índice. O antígeno bruto de *M. leprae* estimulou a produção de IFN- $\gamma$  nas PBMC de sete casos dimorfo tuberculóide/tuberculóide (DT/TT), três com a forma indeterminada e dois com a forma dimorfa virchoviana/virchoviana (DV/VV). O grupo DT/TT produziu níveis de IFN- $\gamma$  significativamente maiores que o grupo DV/VV (Teste de Fisher,  $p=0,027$ ). A produção de IFN- $\gamma$  nos contactantes foi observada em 34 indivíduos, 21 consangüíneos e 13 não consangüíneos. Não foi observada diferença significativa entre os contactantes do grupo paucibacilar (forma indeterminada, DT/TT) e multibacilares (DV/VV). Porém, foi observada diferença significativa na produção desta citocina entre contactantes e casos DV/VV. O estudo sugere que não há diferença significativa na produção de IFN- $\gamma$  entre indivíduos contactantes consangüíneos e não consangüíneos, dos casos paucibacilares e multibacilares. Além disso, ao correlacionarmos a produção desta citocina nos indivíduos com a presença de cicatriz, também não observamos diferença significativa.

Palavras- chave: *Mycobacterium leprae*, Interferon tipo II, Hanseníase

## ABSTRACTS

Leprosy, which is caused by *Mycobacterium leprae*, is an illness of ample clinical and immunopathological spectrum. Its clinical manifestations are correlated with distinct immunologic form, varying from a vigorous immune response mediated by cells to *M. leprae*, with type 1 standard in the tuberculóide polar region, to an absence of specific cellular response to antigens of *M. leprae* in the lepromatous polar region, with predominance of type 2 response and exacerbations of humoral response. The capacity of whole *M. leprae* antigen to stimulate peripheral blood mononuclear cell (PBMC) in the IFN- $\gamma$  production was measured in leprosy patients and their household's contacts, in the city of Sobral, state of Ceará. A total of 30 leprosy patients were used for the study, before start chemotherapy. The paucibacillary leprosy patient group consisted of eight polar indeterminate, ten polar tuberculóide, two borderline tuberculóide, and the multibacillary leprosy patient group consisted of ten lepromatous leprosy and two borderline lepromatous leprosy. The household contacts group consisted of sixty healthy individuals, consanguineous and non consanguineous. The whole *M. leprae* antigen stimulated IFN- $\gamma$  production in the PBMC of seven borderline tuberculóide/tuberculóide (DT/TT), three indeterminate form, two borderline lepromatous/lepromatous (DV/VV the DT/TT group produced IFN- $\gamma$  levels significantly higher than DV/VV group (Fisher Test,  $p=0,027$ ).

The IFN- $\gamma$  production in the household contacts was observed in 34, 21 consanguineous and 13 non consanguineous. It wasn't observed significant difference between paucibacillary household's contacts (DT/TT, indeterminate form) and multibacillary household's contacts groups in the IFN- $\gamma$  production to whole *M. leprae* antigen. However, it was observed significant difference in the production of these cytokine between household contacts and DV/VV patients. This study suggests that there wasn't significative difference in the production IFN- $\gamma$  between non consanguineous and consanguineous subjects of the paucibacillary and multibacillary cases. Moreover, at correlacionated the production in these cytokine in the subjects with the presence of scar, we didn't observed significative difference too.

Keywords: *Mycobacterium leprae*, Interferon type II, Leprosy



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 Histórico da disseminação da hanseníase no mundo.....	15
FIGURA 2 Distribuição da hanseníase no mundo.....	17
FIGURA 3 Modelo esquemático do envelope celular do <i>Mycobacterium leprae</i> .....	19
FIGURA 4 Possível função de células T helper 17 (Th17) na inflamação crônica de desordens autoimunes.....	25
FIGURA 5 O complexo mecanismo de células T CD4 regulatória e efetora.....	27
FIGURA 6 Padrão de citocinas produzidas na hanseníase.....	30
FIGURA 7 Fluxograma da amostra para dosagem de IFN- $\gamma$ . ....	35
FIGURA 8 Distribuição dos casos segundo a classificação clínica.....	40
FIGURA 9 Distribuição dos casos segundo a classificação operacional.....	41
FIGURA 10 Níveis de IFN- $\gamma$ produzidos por “PBMC” após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>M. leprae</i> dos casos índices segundo as formas clínicas: indeterminada, dimorfa tuberculóide/tuberculóide e dimorfa virchoviana/virchoviana.	46
FIGURA 11 Níveis de IFN- $\gamma$ produzidos por “PBMC” após estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>M. leprae</i> em contactantes segundo as formas clínicas dos respectivos casos índices.....	48
TABELA 1 Distribuição das formas clínicas dos casos índices pelo número de lesões apresentadas.....	42
TABELA 2 Distribuição dos contactantes quanto à consangüinidade e ao sexo.....	43
TABELA 3 Distribuição dos casos índices quanto a forma clínica da hanseníase e à presença ou ausência de cicatriz pela vacina com BCG.....	44
TABELA 4 Distribuição dos contactantes quanto à presença ou ausência de cicatriz pela vacina com BCG.....	44
TABELA 5 Comparação entre casos índices e os contactantes quanto à presença ou ausência de cicatriz pela vacina com BCG.....	45
TABELA 6 Distribuição dos casos índices segundo a forma clínica e a detecção da produção de IFN- $\gamma$ .....	47

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 7 Distribuição dos contactantes quanto à consangüinidade e à detecção da produção de IFN- $\gamma$ .....	49
TABELA 8 Distribuição dos contactantes quanto à forma clínica do caso índice, à consangüinidade e à detecção da produção de IFN- $\gamma$ .....	50
TABELA 9 Distribuição dos contactantes segundo a classificação operacional (paucibacilar ou multibacilar) dos casos índices e quanto à detecção da produção de IFN- $\gamma$ .....	50
TABELA 10 Distribuição dos indivíduos (casos e contactantes) agrupados segundo a forma clínica do caso índice e quanto à detecção da produção de IFN- $\gamma$ .....	51
TABELA 11 Distribuição dos indivíduos (casos e contactantes) agrupados segundo a presença ou não de cicatriz pela vacina com BCG e à detecção da produção de IFN- $\gamma$ .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura/Sigla	Significado
a.c	Antes de Cristo
APC	Célula apresentadora de antígeno
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
Células NK	Células " <i>Natural Killers</i> "
DC	" <i>Dendritic cell</i> "
ELISA	" <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> "
g/l	Grama por Litro
GM-CSF	Fator Estimulante de Colônia Granulócito-macrófago.
HRP-avidina	" <i>Horseradish peroxidase -avidina</i> "
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IFN-γ	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
mg	Miligramas
DT	Dimorfo tuberculóide
TT	Tuberculóide
DV	Dimorfo Virchoviana
VV	Virchoviana
ml	Mililitros
mM	Micromol

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

M $\phi$	Macrófago
MMPP	Metaloproteinase
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio
°C	Graus Celsius
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	" <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> " (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	" <i>Phosphate Buffer Saline</i> " - solução salina tamponada em fosfato
PGL-1	Glicolípido Fenólico 1
PHA	Fitohemaglutinina
SES-CE	Secretaria de Saúde do Estado do Ceará
STAT-4	' <i>Signal transducer and activator of transcription – 4</i> '
TGF- $\beta$	Fator transformador de Crescimento-beta
Th1	Células T do Tipo 1
Th2	Células T do Tipo 2
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
TNF- $\beta$	Fator de necrose tumoral-beta
TLRs	' <i>Toll-like receptors</i> '
U/ml	Unidade Internacionais por Mililitros
X g	Força Centrífuga Relativa - gravitacional
$\mu$ g	Microgramas
$\mu$ l	Microlitros
WHO/OMS	' <i>World healthy Organization</i> '/Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 A definição da Hanseníase.....	14
1.2 O histórico da Hanseníase.....	14
1.3 A epidemiologia da Hanseníase.....	16
1.4 O agente etiológico da Hanseníase.....	18
1.5 Classificação e manifestações clínicas da Hanseníase.....	20
1.6 Os critérios de diagnóstico da Hanseníase.....	23
1.7 Regulação da resposta imune.....	24
1.8 A resposta imunológica da Hanseníase.....	24
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos Gerais.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Casuística.....	34
3.1.1 Casos índices e contactantes.....	34
3.1.2 Aspectos éticos.....	35
3.2 Delineamento experimental.....	35
3.3 Processo logístico da amostra.....	36
3.4 Diagnóstico da hanseníase.....	36
3.5 Materiais e métodos.....	36
3.5.1 Obtenção do sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico sob diferentes estímulos.....	36
3.5.2 Ensaio imunoenzimático para dosagem IFN- $\gamma$ .....	38
3.6 Análise estatística.....	39
4 RESULTADOS	40

## SUMÁRIO

4.1 Casos índices: características clínicas e epidemiológicas.....	40
4.2 Contactantes: características epidemiológicas.....	43
4.3 Detecção da cicatriz pela vacina com BCG nos casos índices e nos contactantes.....	44
4.4 Produção de IFN- $\gamma$ em sobrenadantes de cultura de “PBMC” dos casos índices após estímulo com extrato bruto de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	45
4.5 Produção de IFN- $\gamma$ em sobrenadantes de cultura de “PBMC” dos contactantes após estímulo com extrato bruto de <i>M. leprae</i> .....	48
4.6 Correlação entre casos índices e seus respectivos contactantes quanto à produção de IFN- $\gamma$ em sobrenadantes de cultura de “PBMC” após estímulo com extrato bruto de <i>M. leprae</i> .....	51
4.7 Correlação entre a presença de cicatriz pela vacina com BCG e a produção de IFN- $\gamma$ em sobrenadantes de cultura de “PBMC” após estímulo com extrato bruto de <i>M. leprae</i> .....	52
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICES.....	68
ANEXOS.....	89

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A definição da Hanseníase

A hanseníase é uma infecção granulomatosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, que é um patógeno intracelular infecta que macrófagos e células nervosas, essencialmente as células de Schwann, onde constitui o principal nicho de sobrevivência e replicação. Seu dano resulta numa perda da capacidade motora e sensorial ocasionando inabilidades e deformidades (MARQUES et al., 2001; BRITTON & LOCKWOOD 2004; ALCAIS 2005; SCOLLARD et al., 2006).

### 1.2 O histórico da Hanseníase

A hanseníase é descrita como uma enfermidade existente há mais de 4000 anos na China, Índia, Japão e no Egito. A principal porta de entrada para a Europa foi pelos comerciantes, colonizadores e soldados gregos, entre os séculos 10 e 15 (WHEELER 2003; EIDT 2004; MONOT et al., 2005). Durante os séculos 17 e 18, a hanseníase diminuiu acentuadamente no continente europeu em decorrência das melhores condições sócio-econômicas. Durante o período de colonização, a América Latina tornou-se o grande foco endêmico de hanseníase, principalmente por colonizadores portugueses e escravos africanos. Nesta mesma época, colonizadores escandinavos disseminaram a hanseníase na América do Norte, como ilustrado na figura 1 (EIDT 2004; MONOT et al., 2005).

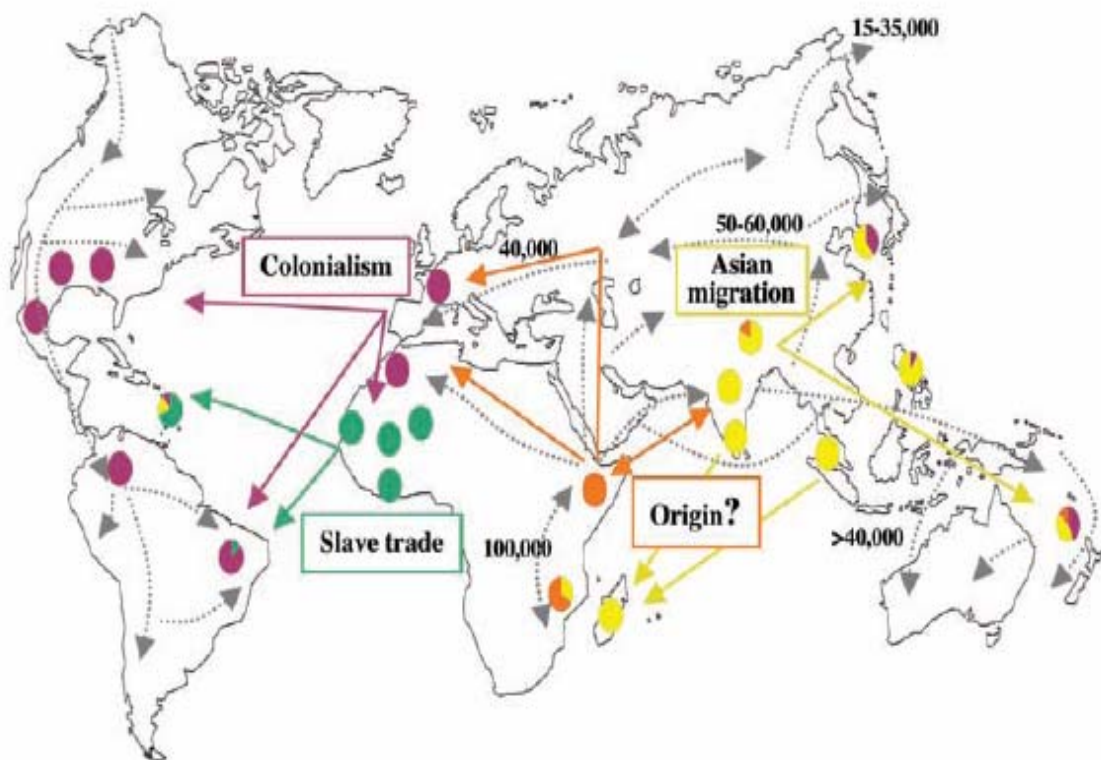


FIGURA 1 - Histórico da disseminação da hanseníase no mundo.  
 FONTE : MONOT et al 2005

Em 1873, o Norueguês Gerhard Armauer Hansen identificou o bacilo causador da hanseníase, que desde então ficou conhecido como “ Bacilo de Hansen” (WHEELER 2003; EIDT2004; PEREIRA et al., 2006).

No Brasil, os primeiros casos registrados foram no Rio de Janeiro no século 17. Somente após dois séculos, o governo adotou medidas contra a doença, porém, sem muito êxito (EIDT 2004).

No Congresso Sul-Americano de Dermatologia, em 1912, Emílio Ribas destacou a importância do tratamento de hanseníase com rigor científico, dando maior ênfase ao isolamento humanitário em hospitais-colônias e a adoção de medidas profiláticas para os doentes (EIDT 2004).

Em 1941, foi criado o Serviço Nacional de Lepra, do Departamento Nacional de Saúde, onde houve a criação dos dispensários, serviços ambulatoriais para investigação de novos casos e internação de casos suspeitos. Vinte anos mais tarde, foram adotadas alterações dos métodos profiláticos e das políticas de controle da



hanseníase; principalmente a educação sanitária e tratamento ambulatorial com sulfona (EIDT 2004). Com o surgimento da resistência à dapsona, em 1982, foi implementada a poliquimioterapia baseada na combinação de dapsona, clofazimina, e rifampicina, proporcionando maior eficácia contra a doença (OLIVEIRA et al., 2003; RINALDI 2005).

### 1.3 A epidemiologia da Hanseníase:

A hanseníase é uma doença endêmica em muitos países em desenvolvimento, sendo, preferencialmente, as populações com baixas condições socioeconômicas, as mais afetadas. Pacientes não tratadas são as maiores fontes de infecção, sendo que a terapia multidroga (MDT), como preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a melhor forma utilizada para conter a transmissão, e eventualmente, levar à eliminação da doença. Entretanto, a MDT tem sido implementada há 20 anos, mas a taxa de detecção da hanseníase permanece invariável em alguns países (WENG et al. 2007).

De acordo com relatos oficiais de 115 países, no início do ano de 2006, o registro global foi de aproximadamente 220 mil casos, enquanto que no ano anterior era de aproximadamente 300 mil casos; o que representa uma queda global do número de novos casos detectados (WHO, 2007). Entretanto, Brasil, Angola, e outros países do continente Africano permanecem com alta endemicidade, conforme ilustrado na figura 2.

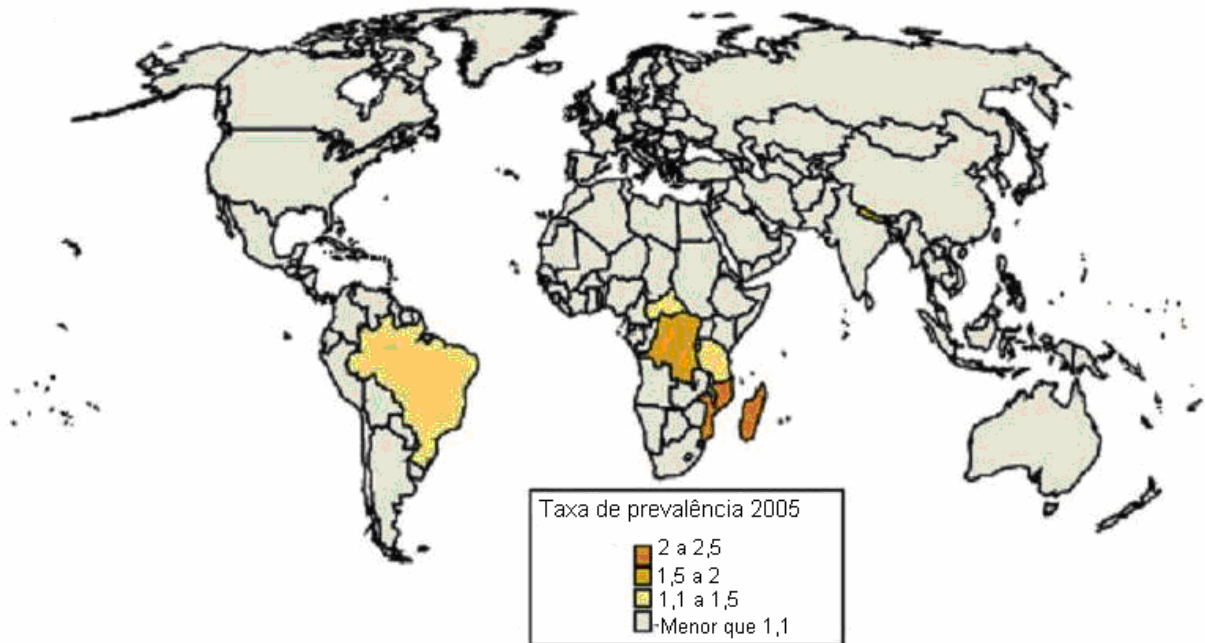


FIGURA 2 - Distribuição da hanseníase no mundo.

FONTE: WHO, 2007 <http://www.who.int/lep/situation/PrateEnd2005v2-WM2.pdf>

O diagnóstico precoce e o acompanhamento dos pacientes durante todo tratamento são medidas preconizadas pelo OMS (Organização Mundial de Saúde) para o controle da hanseníase, principalmente, nesses países endêmicos (WHO, 2007).

A transmissão da hanseníase ocorre, primariamente, de pessoa-a-pessoa, com maior fonte de infecção entre os multibacilares não tratados, tendo um risco de cinco a dez vezes maiores, em famílias onde existam casos já previamente detectados (GOULART & PENNA & CUNHA 2002; PARKASH et al., 2006).

O *Mycobacterium leprae* pode persistir e proliferar no meio ambiente em associação com certas plantas e animais, sendo a infecção resultante de exposições prolongadas ou repetitivas de fonte ambiental contendo bacilos viáveis. A investigação experimental torna-se difícil devido à impossibilidade do cultivo 'in vitro' em laboratório, e sendo atualmente, muitos resultados obtidos por estudos epidemiológicos (KERR-PONTES et al. 2006).

O Brasil apresenta quase 80% dos casos do continente americano, sendo a região Norte e Centro-oeste de maior incidência e prevalência. No ceará, a distribuição

da doença apresenta-se de forma irregular devido à grande diferença social da população e às condições dos serviços de saúde oferecidos pelos municípios (MONTENEGRO et al., 2004; KERR-PONTES et al., 2006).

No ano de 2006 foram detectados 2665 novos casos de hanseníase no estado do Ceará, dos quais 59%, concentrados nos municípios de Sobral, Fortaleza, Caucaia, Maracanaú, Juazeiro do Norte, Crato e Iguatu. A taxa de detecção (número de novos casos para cada 10.000 habitantes) foi de 2,6; sendo este índice considerado alto, segundo a OMS, que estabelece como aceitável uma taxa de 0,5 casos/10000 habitantes. Especificamente no município de Sobral, foi observada uma taxa de detecção de 9,3 (SESA-CE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A taxa de prevalência (número de casos existentes por 10.000 habitantes) observada no estado do Ceará foi de 2,6/10000 habitantes; acima do preconizado pela Organização Mundial de Saúde, que estabelece índices abaixo de 01/10000 habitantes. No município de Sobral-CE, observamos que esta taxa apresenta um valor de 9,61/10000 habitantes, bem superior ao preconizado pela OMS (SES-CE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As populações de regiões semi-áridas do Brasil, sobretudo no Ceará, convivem com a escassez de água; principalmente de açudes e lagoas, que servem para recreação e uso domiciliar (KERR-PONTES et al., 2006). A extensa estiagem nessa região, e conseqüente formação de brejos favorecem uma variedade de plantas e animais, que podem servir como reservatório para o *Mycobacterium leprae*, e possível fonte de infecção da doença (KERR-PONTES et al., 2006).

#### 1.4 O agente etiológico da Hanseníase

O *M.leprae* é uma bactéria pertencente à classe *Actinobacteria*, subclasse *Actinobacteridae*, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae*, família *Mycobacteriaceae*, gênero *Mycobacterium* e espécie *M. leprae* (SASAKI et al., 2001).

É um parasita intracelular obrigatório, imóvel, em forma de bacilo discretamente curvo ou reto, não formador de esporos, microaerófilo, resistente à descoloração álcool-ácida, dispostos de forma isolada, em agrupamentos variados, ou

globias, sendo esta a forma peculiar da espécie, com tropismo por regiões frias do corpo, encontrado, sobretudo, nas células de Schwann (SASAKI et al., 2001; SCOLLARD et al., 2006; WHO 2007).

O peptidoglicano da parede celular é composto por ligações peptídicas de N-acetilglicosamina e N-glicosilmuramato. O ácido micólico, ligado à porção terminal da cadeia de arabinano, forma uma pseudo bicamada, sendo a porção mais externa constituída de uma cápsula composta de lipomanano, lipoarabinomanano, fosfatidilinositol e, sobretudo, glicolípido fenólico, cuja proteína antigênica específica do bacilo pode ser encontrada em tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares (VISSA & BRENNAM 2001; BRITTON & LOCKWOOD 2004; GOULART & PENNA & CUNHA 2002; SCOLLARD et al., 2006).

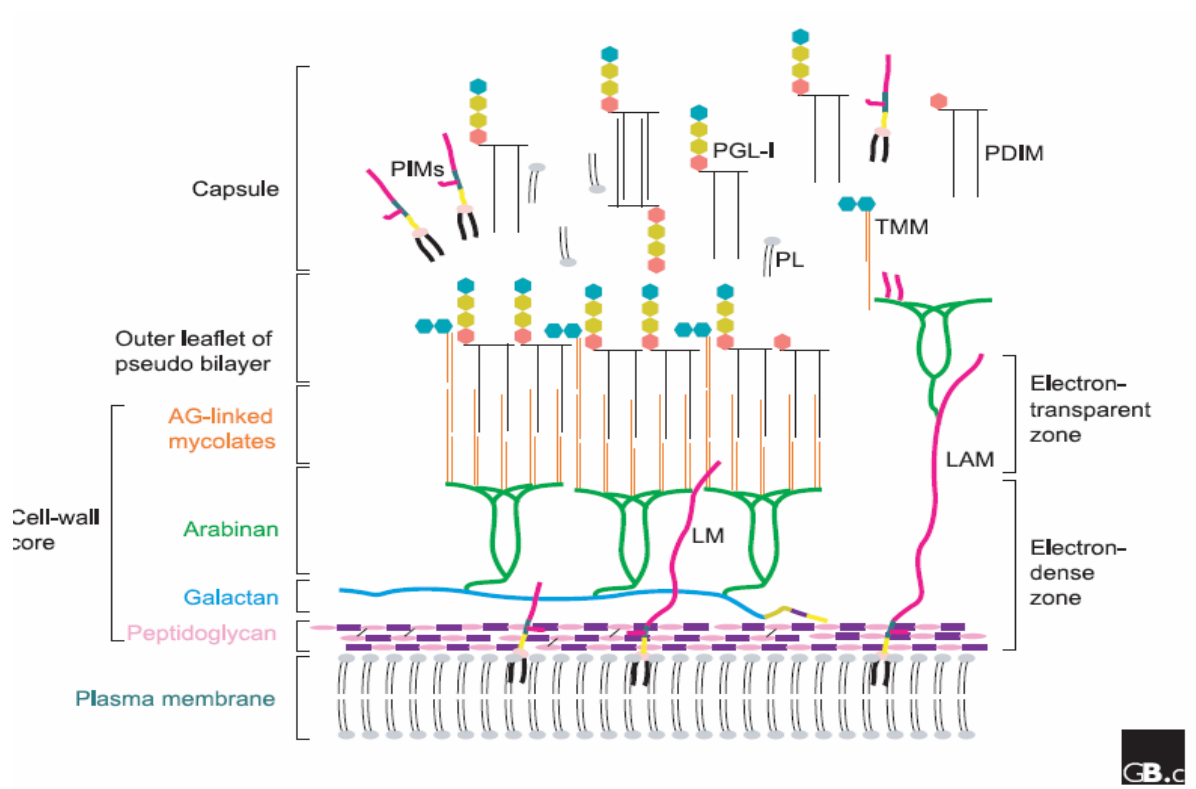


FIGURA 3: Modelo esquemático do envelope celular do *M. leprae*. Membrana plasmática é envolvida pela parede celular, na qual o peptidoglicano é ligado covalentemente ao galactano por unidade de arabinogalactano. Outras proteínas envolvidas na composição celular do *M. leprae* são compreendidas pelo TMM ( monomicolato de trealose), PDIMs ( ácidos micocerosóicos de dimicocerosato de fitiocerol), LM (lipomanano), LAM ( lipoarabinomanano) e PGL-1 (glicopeptídeo fenólico).  
 FONTE: SCOLLARD et al 2006.

Proteínas fracionadas de antígenos micobacterianos têm sido pesquisadas em pacientes com as formas tuberculóide e virchoviana da hanseníase e são propostas para o auxílio diagnóstico da doença (ARAOZ et al., 2006).

Várias proteínas de classe II (encontradas também em outras micobactérias) e classe III (proteínas de superfície) são reconhecidas por anticorpos circulantes. No entanto, proteínas de classe II induzem maior produção de IFN- $\gamma$  comparada a outras proteínas antigênicas previamente identificadas. Entre elas, a ML0308 e ML2498, mostram forte imunogenicidade, com ativação da imunidade tanto celular como humoral, sendo úteis no diagnóstico de pacientes com as formas tuberculóide e virchoviana da doença (ARAOZ et al 2006).

### 1.5 A classificação e as manifestações clínicas da Hanseníase

A classificação dessa doença infecciosa crônica, leva em consideração a resposta imunológica dos indivíduos em contato com o bacilo, podendo apresentar-se como forma indeterminada, forma tuberculóide (TT), dimorfa-tuberculóide (DT) e dimorfa virchoviana (DV), além da forma virchoviana (ADAMS et al., 2002; ARAUJO 2003).

A forma indeterminada, considerada a primeira manifestação clínica da hanseníase, apresenta um período de incubação de 02 a 05 anos. É um estágio inicial e transitório da hanseníase, que pode ser encontrado em indivíduos de resposta imune não definida diante do bacilo. A lesão inicial é caracterizada como uma área de hipoestesia definida ou por uma lesão visível, sendo a manifestação cutânea mais comum a presença de máculas hipopigmentadas e discretamente eritematosas, e mais secas do que a pele circunjacente. Pode ocorrer evolução para cura espontânea, desenvolver-se lentamente, ou ainda, involuir, ressurgindo tardiamente com características clínicas definidas dentro do espectro da doença, de acordo com sua capacidade de resposta imune ao *M. leprae* (SOUZA, 1997; ARAUJO, 2003).

A forma tuberculóide (TT) é caracterizada pela vigorosa resposta protetora, observada em biópsias de tecidos, como uma inflamação granulomatosa bem desenvolvida e com uma redução significativa de bacilos (paucibacilar). Na maioria dos

casos, as lesões cutâneas são únicas ou em pequeno número, bem demarcadas com hipoestesia e hipopigmentação central (SOUZA, 1997; ARAUJO, 2003).

Quando ocorrem máculas, estas se expressam como lesão hipocrômica ou eritematosas delimitadas por micropápulas. O aparecimento de placa pode também ocorrer como uma lesão eritematosa, difusamente infiltrada com limite externo sempre nítido e bem definida (SOUZA, 1997).

Em geral, as lesões em ramos neurais levam a alterações sensitivas e autonômicas, que evoluem para hipoestesia e anestesia. O envolvimento dos troncos nervosos ocorre usualmente próximo às lesões cutâneas. A pele usualmente apresenta-se com a superfície seca, hipodrótica, com diminuição ou ausência de pêlos (SOUZA 1997).

A forma virchoviana (VV) é uma manifestação clínica secundária à susceptibilidade ao bacilo, resultando em multiplicação do bacilo e disseminação da doença. Há uma ineficaz resposta imunológica com grande número de bacilos nas lesões teciduais (multibacilar). No início, as lesões apresentam-se como máculas mal definidas, discretamente hipocrômicas ou eritematosas, simetricamente distribuídas sobre a superfície corpórea. Com a evolução da doença, percebe-se aumento do eritema e do infiltrado, pele luzidia com poros dilatados, e sobrepondo-se a estas áreas, notam-se a presença de pápulas, nódulos e tubérculos. A região frontal, centromedial da face, e lóbulos da orelha, além de extensas áreas do tegumento, são mais frequentemente comprometidas. Nos membros, há comprometimento principalmente do antebraço, dorso das mãos e extremidades, observando-se articulações e dígitos edemaciados. Com a progressão da doença, há comprometimento de múltiplos troncos nervosos, perda sensitiva e motora, atrofia muscular, paralisias, deformidades e contraturas (SOUZA 1997; HERNANDEZ et al., 2003; DUGUE et al., 2004).

Embora a região dos nervos periféricos e pele sejam as mais afetadas pela hanseníase, outros sítios como olhos, trato respiratório superior, fígado, mãos e pés podem ser acometidos pelo bacilo. Muitas destas manifestações ocorrem cerca de 5 a 10 anos após o início da doença, com uma evolução clínica bastante variada. No aparelho respiratório superior, por exemplo, a mucosa torna-se congesta, edemaciada e obstruída; além de coriza mucopurulenta e epistaxe, sendo evidenciados também

perfuração septal e desabamento nasal. No aparelho ocular, a lesão pode ocorrer pela invasão direta do bacilo e pelo processo inflamatório local, sendo as manifestações oculares mais freqüentes: hipoestesia corneana, madarose, catarata e uveíte (SOUZA, 1997; MORENO et al 2003; SUDHIR & MATHEW & CHANDRAN 2006).

O eritema nodoso lepromatoso observado na pele é o resultado do envolvimento de múltiplos órgãos, frequentemente associado com manifestações sistêmicas em pacientes multibacilares e reflete um processo inflamatório agudo. Essa reação pode ocorrer em pacientes não tratados, embora seja mais freqüente após o início da terapêutica, persistindo em alguns pacientes por um período posterior ao término da poliquimioterapia. O mecanismo desta complicação tem sido atribuído à produção de citocinas liberadas no local da infecção ou sistemicamente (VIEIRA et al., 1996). Neste tipo de reação são freqüentes manifestações de queda do estado geral, prostração pela dor, anorexia, febre, insônia e depressão. A face, as mãos e os pés tornam-se edemaciados, assim como pode haver aumento do fígado, baço e linfonodos (SOUZA 1997; BRITTON & LOCKWOOD 2004).

Na hanseníase dimorfa, caracterizada por uma variação da resposta imunológica, ocorre grande variação nas manifestações clínicas. Na pele são observadas numerosas lesões com morfologia mesclando aspectos de hanseníase virchoviana e hanseníase tuberculóide, a depender da prevalência de um aspecto sobre o outro, ela pode ser caracterizada como dimorfa virchoviana (DV) ou tuberculóide (DT). Infiltração assimétrica da face, pavilhões auriculares, e a presença de lesões no pescoço e nuca são elementos sugestivos desta forma clínica. As lesões neurais são precoces, assimétricas e, com freqüência, levam à incapacidade física. A pesquisa de BAAR (Bacilo álcool ácido resistente) pode ser negativa ou positiva com índice bacilar variável (ARAÚJO, 2003; SCOLLARD et al., 2006).

## 1.6 Os critérios de diagnóstico da Hanseníase

O desenvolvimento de técnicas para o diagnóstico e acompanhamento da eficácia dos programas de saúde é a maior prioridade no controle da hanseníase. O diagnóstico deve ser realizado no intuito de detectar as variações clínicas desta doença, por isso requer a combinação de vários testes para um diagnóstico correto (TRICCAS & ROCHE & BRITTON 1998).

A baciloscopia é o exame complementar mais útil no diagnóstico, sendo de fácil execução e baixo custo. Sua alta especificidade permite a identificação de pacientes com maior potencial de infectividade e aqueles com maior risco de reincidência. A coleta de linfa é feita nos lóbulos das orelhas, cotovelos e em lesão suspeita. A coloração é feita pelo método de Ziehl-Neelsen, e o resultado é apresentado como índice baciloscópico, sendo a baciloscopia negativa nas formas tuberculóide e indeterminada, fortemente positiva na forma virchoviana, revelando resultados variáveis nas formas dimorfas (ARAUJO, 2003).

O diagnóstico histológico é considerado o padrão ouro. Histologicamente, a presença de inflamação neural diferencia a hanseníase de outras desordens granulomatosas. O exame histopatológico de pele é importante para dirimir dúvidas no diagnóstico, bem como para a classificação da doença. A biópsia de nervo é sempre indicada em caso de dúvidas quanto ao diagnóstico com outras neuropatias (ARAUJO 2003; BRITTON & LOCKWOOD 2004).

Nos pacientes em tratamento, deve ser feita avaliação da função motora, com a finalidade de detecção precoce de incapacidades. Seqüelas bem definidas podem ser encontradas já no período do diagnóstico, tais como: a paralisia facial do tipo periférico unilateral ou bilateral, ou a paralisia do ramo orbicular no nervo zigomático (BRITTON & LOCKWOOD 2004)



## 1.7 Regulação da resposta imune

Células do Tipo 1 (Th1) e do Tipo 2 (Th2) desempenham importantes funções na regulação da resposta protetora contra infecção de patógenos intracelulares e extracelulares, respectivamente (BETTELLI et al., 2006; DEENICK & TANGYE, 2007). Células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e linfotóxina- $\alpha$ , enquanto que Th2 pela produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. A diferenciação das células Th1 é regulada por fatores de transcrição; STAT-4 (sinais transdutores e ativadores da transcrição) e T-bet, nos quais são diferentes e antagonistas àqueles que controlam o desenvolvimento de Th2, que são STAT-6 e GATA-3 (NURIEVA et al., 2007; EVANS et al., 2007; KIMURA & NAKA & KISHIMOTO, 2007).

STAT-4 e T-bet são usualmente ativados quando IL-12 é produzida por células dendríticas e macrófagos, freqüentemente, em associação com a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK (*Natural killer*), em resposta à interação de produtos microbianos. Por contraste, a via do fator de transcrição de Th2 é usualmente ativada quando ocorre produção iniciais de IL-4, ao invés de IL-12 e IFN- $\gamma$  (ROMAGNANI et al., 2006).

Citocinas como IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ , não só favorece o desenvolvimento de células Th1, mas também inibe o desenvolvimento de células Th2. Do mesmo modo, vários microorganismos, produtos microbianos ou mesmo adjuvantes sintéticos, são capazes de interagir com TLRs (Receptores *toll-like*) presentes nas células NK/DC (*Dendritic cell*) e induzir a produção de IL-12 e/ou IFN- $\gamma$  pelas células da imunidade inata (ROMAGNANI et al., 2006).

Uma subclasse de Th, denominada de Th17, ou Th inflamatória, tem sido recentemente identificada como uma distinta linhagem de célula mediadora da resposta inflamatória com características funcionais distintas das células Th1 e Th2. TGF- $\beta$  e IL-6 exercem importante papel na diferenciação e proliferação desta linhagem celular, sendo este processo aumentado na presença de IL-23, e regulado por STAT3. Além disso, citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4 atuam como antagonistas de TGF- $\beta$  neste mecanismo (MANGAN et al., 2006; DEENICK & TANGYE, 2007; NURIEVA et al., 2007; KIMURA & NAKA & KISHIMOTO, 2007).

### Célula dendrítica

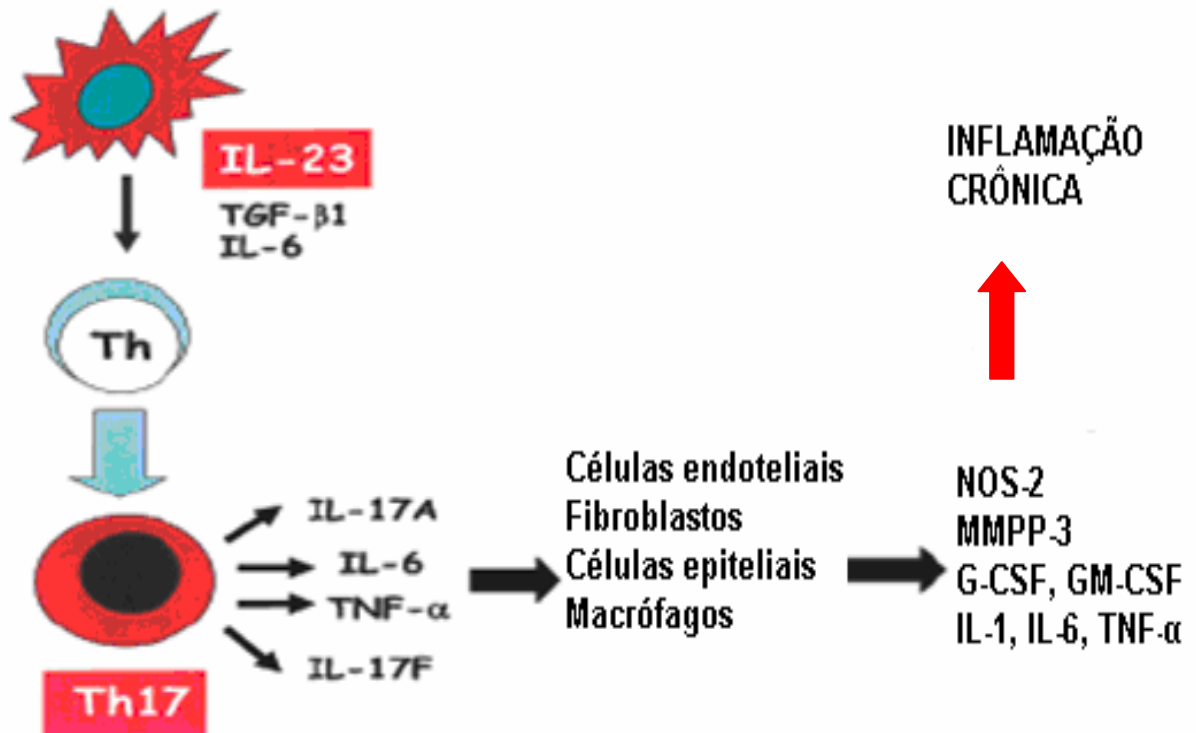


Figura 4: Possível função de células T helper 17 (Th17) na inflamação crônica de desordens autoimunes. Fonte: MANGAN et al., 2006; DEENICK & TANGYE, 2007; NURIEVA et al., 2007; KIMURA & NAKA & KISHIMOTO, 2007

Células dendríticas que produzem IL-12 promovem a diferenciação de células Th1, enquanto que as células dendríticas produtoras de IL-23, além de TGF- $\beta$  e IL-6, promovem a geração de células de Th17. Citocinas produzidas por células Th17, como IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17F são reguladoras da resposta inflamatória em tecidos e não estão relacionadas com a diferenciação de Th17. Essas citocinas, por sua vez, agem sob diferentes tipos celulares, bem como fibroblastos, células endoteliais, epiteliais e macrófagos, resultando na produção de quimiocinas, G-CSF (fator estimulador de granulócitos) e GM-CSF (fator estimulador granulócito-macrófago), que induzem no recrutamento de granulócitos. A produção de componentes inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , metaloproteinase (MMPP3) e óxido nítrico sintase (NOS<sub>2</sub>), também ocorrem e contribuem para a manutenção da inflamação tecidual crônica (figura 4). O recrutamento de neutrófilos por IL-17 sugere que esta citocina possa desempenhar um

importante papel na proteção contra bactérias extracelulares (BETTELLI et al., 2006; ROMAGNANI et al., 2006; EVANS et al., 2007).

A IL-21, outra citocina produzida por células Th17, atua na diferenciação da própria Th17, sendo este mecanismo induzido por IL-6. Sua deficiência leva a uma perda da geração de células Th17, resultando na proteção contra encefalomielite autoimune. Os principais fatores de transcrição na diferenciação de Th17 incluem STAT3 e ROR- $\gamma$ t (*retinoic acid receptor-related orphan receptor*). De outro modo, IL-21 inibe a geração de células T regulatórias (DEENICK & TANGYE, 2007; NURIEVA et al., 2007).

Além das células TCD4, Th1, Th2 e Th17, as células Treg são também essenciais reguladoras da resposta imune e doenças inflamatórias. Elas agem impedindo o processo autoimune e protegendo contra o dano tecidual. Estas são constituídas pelas células T NK naturais e células T CD4CD25 nas quais expressam o fator de transcrição Foxp3. O processo de diferenciação destas células é estimulado pela TGF- $\beta$  e antagonizado pela IL-6, como ilustrado na figura 5 (MANGAN et al., 2006; ROMAGNANI et al., 2006; KIMURA & NAKA & KISHIMOTO, 2007).

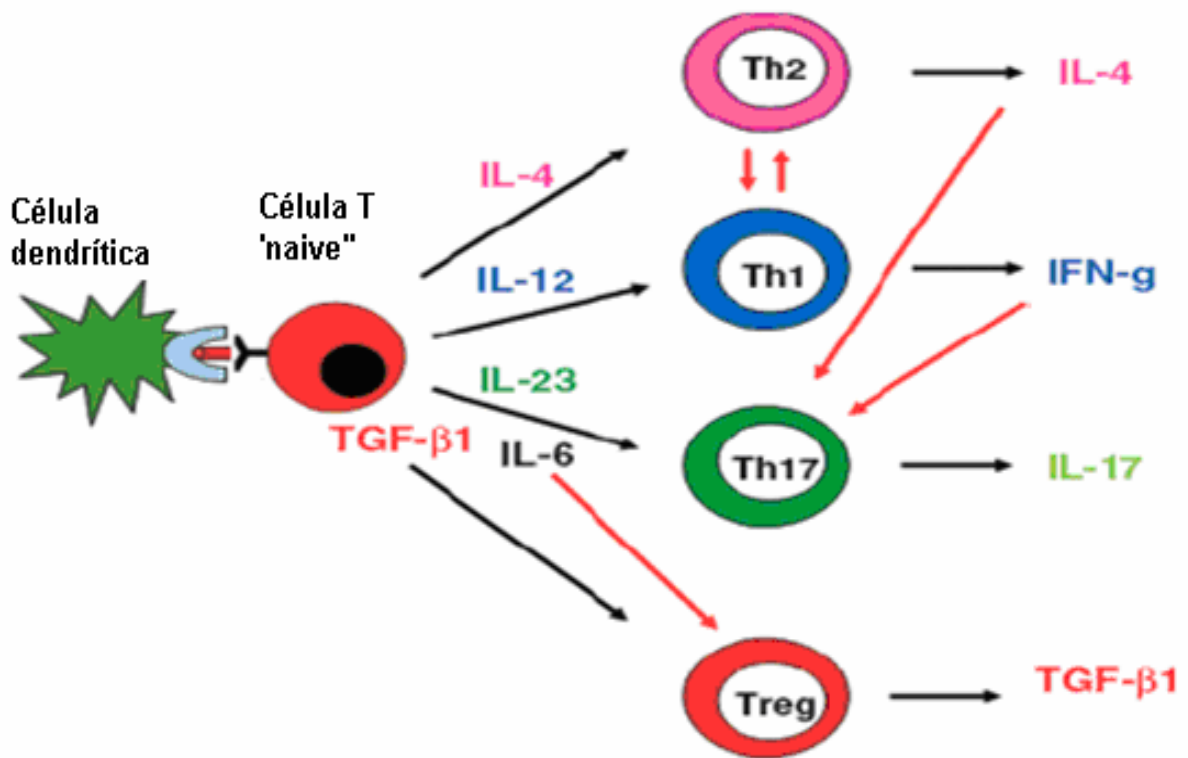


Figura 5: O complexo mecanismo de células T CD4 regulatória e efetora  
 Fonte : BETTELLI et al., 2006; ROMAGNANI et al., 2006; DEENICK & TANGYE, 2007

Células Treg e efectoras Th17 surgem numa forma exclusiva mútua, dependendo se elas são ativadas na presença de TGF- $\beta$  ou TGF- $\beta$  + IL-6. Num nível estável ou na ausência de qualquer dano inflamatório, TGF- $\beta$  produzida irá suprimir a geração de células T efectoras e induzirá células T regulatórias. Porém, sob um processo infeccioso ou inflamatório, a IL-6 produzida pelo sistema imune inato ativado irá inibir a geração de células Treg e induzirá a resposta de células T pro-inflamatórias, predominantemente células Th17, como ilustrado na figura 5 (BETTELLI et al., 2006; MANGAN et al., 2006; ROMAGNANI et al., 2006). Percebe-se, assim, uma via de desenvolvimento recíproco para a geração de células Th17 e células Treg no sistema imune dependendo do estado do sistema imune inato e da produção de citocinas, como IL-6. Uma vez induzido, células CD4CD25Foxp3 poderiam também suprimir outras subclasses de células T (como Th1 e Th2), bem como Th17. (BETTELLI et al., 2006; ROMAGNANI et al., 2006; DEENICK & TANGYE, 2007). Além disso, IFN- $\gamma$  é um importante bloqueador

de diferenciação das células Th17 agindo de forma mais expressiva do que as células Th2 via IL4 neste mecanismo inibitório (ROMAGNANI et al., 2006) .

### 1.8 A resposta imunológica na hanseníase

O padrão de citocinas produzido pelas células T contra os patógenos intracelulares é determinante para a natureza da resposta imunológica. É importante entender que a interação do patógeno com o hospedeiro envolve complexos mecanismos (GOULART & PENNA & CUNHA, 2002; STEFANI et al., 2003; BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

Na hanseníase, o perfil de resistência ou susceptibilidade ao bacilo é regulado por variações nos padrões de produção de citocinas, com a resistência associada ao padrão tipo 1, e a sensibilidade ao padrão tipo 2 (LIBRATY et al., 1997; KIM et al., 2001; KISZEWSKI et al., 2003; ALCAIS et al., 2005; SCOLLARD et al., 2006). Na forma tuberculóide da doença, as populações de células produtoras de citocinas do padrão 1 são responsáveis pela resistência do hospedeiro à micobactéria. Estas células são responsáveis pela produção de citocinas como IL-2 e IFN- $\gamma$ , que atuam na manutenção da resposta imune celular. A IL-2 ativa receptores dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, estimulando a formação de clones celulares responsáveis pela manutenção da produção de citocinas e, paralelamente, pela estimulação de células NK, com ação de potencializar uma maior produção de IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  age sobre macrófagos (figura 4) estimulando a fagocitose, a ativação de radicais microbicidas (derivados do oxigênio e nitrogênio) e a secreção autócrina de TNF- $\alpha$ , sendo este responsável por manter o macrófago ativado e, conseqüente, formação do granuloma. A IL-12, outra citocina sintetizada por macrófago, atua como importante reguladora da resposta Th1. O estímulo gerado por ela na proliferação de células Th1 favorece a síntese de grande quantidade de IFN- $\gamma$ . Além disso, o IFN- $\gamma$  exerce importante papel na inibição de células Th2 (KIM et al., 2001; GOULART & PENNA & CUNHA 2002; KISZEWSKI et al., 2003; ANTAS et al., 2004; ALCAIS et al., 2005; ANDERSSON et al., 2005; SCOLLARD et al., 2006).

A IL-12 também estimula diretamente células NK, induzindo a produção de IFN- $\gamma$  (KIM et al., 2001).

Por outro lado, no polo virchoviano da doença, as citocinas preferencialmente secretadas são a IL-4, IL-5, e IL-10, e estão relacionadas com doença progressiva. Na presença de IL-4, células T CD4<sup>+</sup> são ativadas para a produção de TGF- $\beta$  (figura 5). Esta citocina atua diminuindo a proliferação e função linfocitária, suprimindo a produção de IL-2 e inibindo a expressão do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC II). O TGF- $\beta$  também bloqueia a ativação do macrófago (induzido pelo IFN- $\gamma$ ). Além disso, exerce efeitos estimulatórios, especificamente, em células do tipo 2 promovendo a produção de IL-10. Esta, por sua vez, atua suprimindo o próprio macrófago e inibindo a secreção de IL-12. Tanto IL-4 como IL-10 inibem a ativação de macrófagos, favorecendo uma infecção progressiva na hanseníase (SASAKI et al., 2001; GOULART & PENNA & CUNHA 2002; KISZEWSKI et al., 2003; ANTAS et al., 2004; SCOLLARD et al., 2006).

Adicionalmente, IL-4 estimula a proliferação de linfócitos B e síntese de imunoglobulinas, e ativa mastócitos, que passam a produzir mais IL-4, incrementando a resposta supressora macrofágica (GOULART & PENNA & CUNHA 2002).

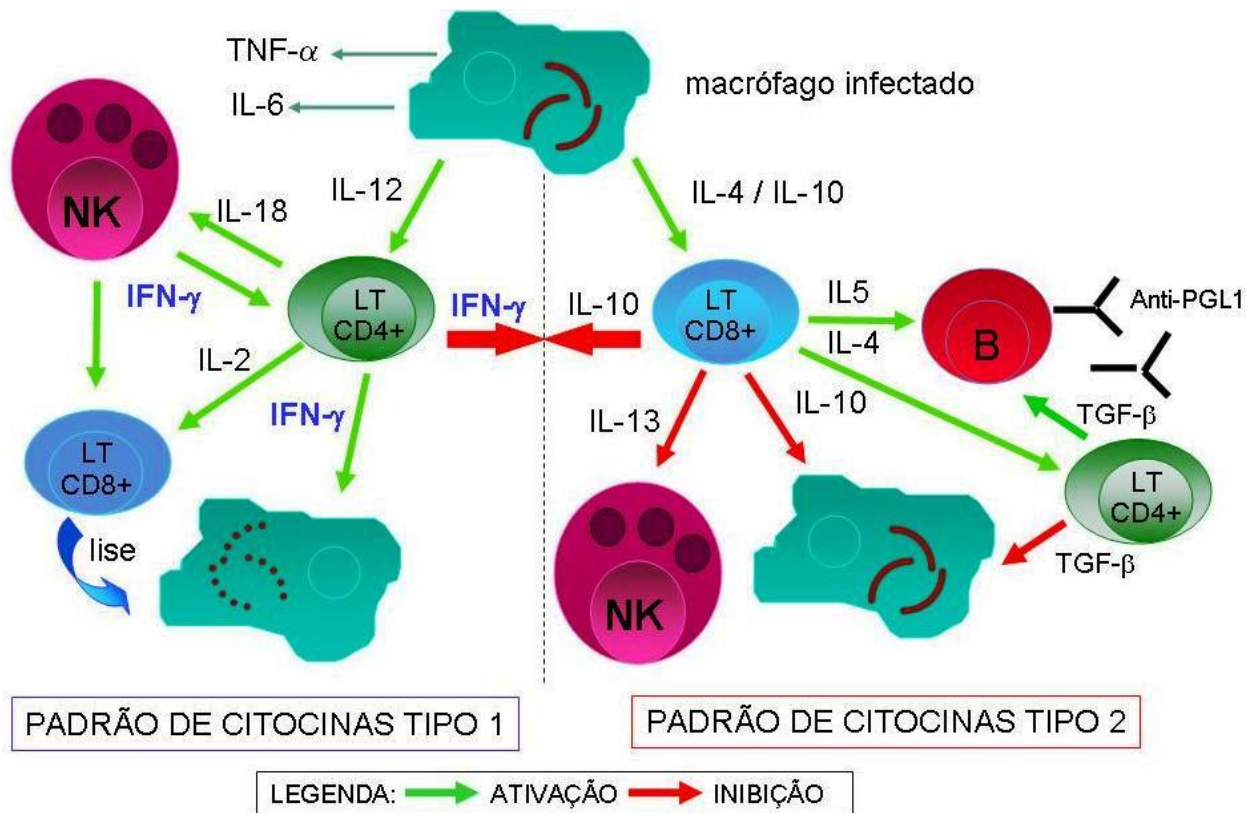


FIGURA 6 : Padrão de citocinas produzidas na hanseníase.  
 FONTE: GOULART & PENNA & CUNHA 2002; BARRERA et AL., 2004

Outras duas citocinas,  $IL-18$  e  $IL-13$ , podem influenciar a atividade de células NK na diferenciação de linfócitos T em PBMC de pacientes com hanseníase. A  $IL-18$  modula a geração de linfócitos T citotóxico induzido por hsp65 e colaboram com  $IL-12$  para este efeito. De outro modo,  $IL-13$  diminui a geração desses linfócitos T, sendo esta citocina também responsável pela produção diminuída de  $IFN-\gamma$  pelas células NK (BARRERA ET AL., 2004).

REDDY et al. (2004), ao utilizarem cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*) cultivadas com fitohemaglutinina e enterotoxina B, demonstraram que a produção do  $IFN-\gamma$  é um forte ativador de macrófagos; e que a produção de  $IL-4$  e de  $IL-10$  interferem negativamente na regulação da resposta inflamatória por linfócitos produtores de  $IFN-\gamma$ . Além disso, Goulart et al. (2002) demonstraram que níveis de  $IL-1$ ,  $IL-6$  e  $TNF-\alpha$ , detectados por

ELISA, estão mais altos no soro e sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com a forma tuberculóide da doença do que a forma virchoviana. Também nos sobrenadantes de culturas de PBMC de pacientes com a forma tuberculóide, níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$  estão bastante superiores aos encontrados na forma virchoviana, onde IL-4 predomina no soro e em sobrenadantes de culturas de PBMC.

Níveis aumentados do anti-PGL-1 têm sido descritos na hanseníase virchoviana e tendem a decrescer com o tratamento específico. Na forma tuberculóide são encontrados baixos níveis destes anticorpos. Há estudos inconclusivos que procuram estabelecer uma relação entre a positividade ao anti-PGL-1 e o risco de adoecer ou de identificar infecção subclínica (ARAUJO, 2003).

A evolução clínica da infecção por *M. leprae* em um hospedeiro parece depender do padrão de citocinas no sítio de infecção pelo microorganismo. Nesse contexto, deve existir uma predisposição genética do indivíduo na susceptibilidade ou resistência à infecção por *M. leprae* (GOULART & PENNA & CUNHA 2002).

Contactantes exibem alto risco em desenvolver a hanseníase, ou populações de diferentes etnias que convivem numa mesma região endêmica apresentam proporções diferentes quanto à prevalência da doença (MORAES et al., 2006). Outros estudos mostram que o risco de contactantes adoecerem é muito maior naqueles que convivem no mesmo domicílio, sendo maior em contactantes de indivíduos multibacilares (DOUGLAS et al., 2004).

Estudos epidemiológicos relacionados à hanseníase são baseados na comparação de frequências de marcadores genéticos em casos controles utilizando alguns genes. Têm sido identificadas algumas regiões cromossômicas para avaliar a associação com a hanseníase. Os resultados têm sugerido que diferentes genes estão envolvidos na resistência ou susceptibilidade, como aqueles responsáveis por codificarem proteínas como TNF- $\alpha$ , IL-10, e receptores de vitamina D (o gene deste receptor é responsável pelos efeitos biológicos da vitamina D na forma ativa, sendo produzido por monócitos e linfócitos T e B), embora alguns desses resultados obtidos em diferentes populações sejam controversos. Apesar dos recentes avanços na epidemiologia genética e genômica, os resultados devem ser confirmados utilizando



melhores técnicas para que possam identificar com precisão, os genes correlacionados com a progressão ou regressão da doença (MORAES et al., 2006).

Portanto, pesquisas genéticas e avaliações clínico-epidemiológicas em contactantes e casos índices são essenciais para um melhor entendimento dos mecanismos de transmissão, de diagnóstico, ou mesmo, no seguimento da hanseníase. Além disso, achados imunológicos também contribuem para melhor compreensão desses mecanismos, sobretudo, a pesquisa de citocinas em resposta a diferentes estímulos antigênicos.

Se fatores genéticos estão envolvidos na gênese da hanseníase, é possível, que casos índices e contactantes consangüíneos, apresentem perfis de citocinas semelhantes. Se o IFN- $\gamma$  é uma importante citocina na resistência do indivíduo à infecção pelo *M. leprae*, as famílias de pacientes com as formas paucibacilares deveriam produzir maiores quantidades daquela citocina, e sua ausência em contactantes de indivíduos multibacilares poderia ser um fator de risco ao desenvolvimento da doença.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Estudar em casos de hanseníase e de seus contactantes, consangüíneos ou não consangüíneos, o perfil da produção de IFN- $\gamma$  frente ao estímulo, *in vitro*, com o extrato bruto de *Mycobacterium leprae*.

### 2.2 Objetivos específicos

1- Em indivíduos com diagnóstico clínico e laboratorial de hanseníase, investigar a correlação entre a produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares do sangue periférico, sob estímulo *in vitro* com o extrato antigênico bruto de *Mycobacterium leprae* com o estadiamento clínico.

2- Em contactantes de indivíduos com hanseníase investigamos a correlação entre a produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares do sangue periférico, sob estímulo *in vitro* com o extrato antigênico bruto de *Mycobacterium leprae*, com a existência de consangüinidade, e com o estadiamento clínico do caso-índice.

### 3 Casuística, materiais e métodos

#### 3.1 Casuística:

##### 3.1.1 Casos índices e Contactantes:

O estudo foi realizado com moradores do município de Sobral, no estado do Ceará, durante maio de 2005 a dezembro de 2006. Durante este período foram realizadas as coletas das amostras de tecido para a realização de biópsias, e a coleta de linfa para a pesquisa de BAAR na qual utilizou-se a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen; além da avaliação clínico-epidemiológica por profissionais da Secretaria de Saúde do município.

Após a confirmação dos casos de hanseníase, foram coletadas amostras de sangue desses pacientes e encaminhadas para o Laboratório de Imunologia da UFC para a dosagem de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de PBMC. Este estudo foi constituído por 30 casos índices com diagnóstico clínico e laboratorial de hanseníase e 60 contactantes. Foram coletadas amostras de dois contactantes de cada caso índice estudado. Do total de 30 casos, 20 foram constituídos por contactantes consangüíneo e não consangüíneo. Outros 7 casos foram constituídos por ambos contactantes consangüíneos, e outros 3 casos por contactantes que não eram consangüíneos.

De cada indivíduo, por punção venosa, foram coletados 7,5 ml de sangue utilizando-se 1 tubo contendo heparina de lítio para separação das células mononucleares do sangue periférico, e 4,9 ml de sangue em tubo sem anticoagulante, para a obtenção de soro.

A coleta nos casos índices foi realizada antes de iniciarem o tratamento poliquimioterápico por profissionais treinados. Os dados epidemiológicos (idade, sexo, presença de cicatriz pela vacina com BCG) e clínicos (classificação clínica, número de lesões, grau de incapacidade, classificação operacional, baciloscopia e biópsia) foram obtidos a partir do questionário padronizado pela Profa. Dra. Lígia Kerr-Pontes (Apêndice II), senda a pesquisa aprovada pelo CNPq, processo 401256/2005-7.

### 3.1.2 Aspectos éticos:

A coleta das amostras e dados epidemiológicos foi realizada mediante termo de consentimento dos indivíduos selecionados (Apêndice I).

O projeto EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE NO CEARÁ: APROFUNDAMENTO DOS ESTUDOS IMUNO-EPIDEMIOLÓGICOS, ao qual este subprojeto está vinculado, foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará através da Resolução número 125/05.

### 3.2 Delineamento experimental

Da coleta da amostra de sangue no posto ou domiciliar até a dosagem de IFN- $\gamma$ .

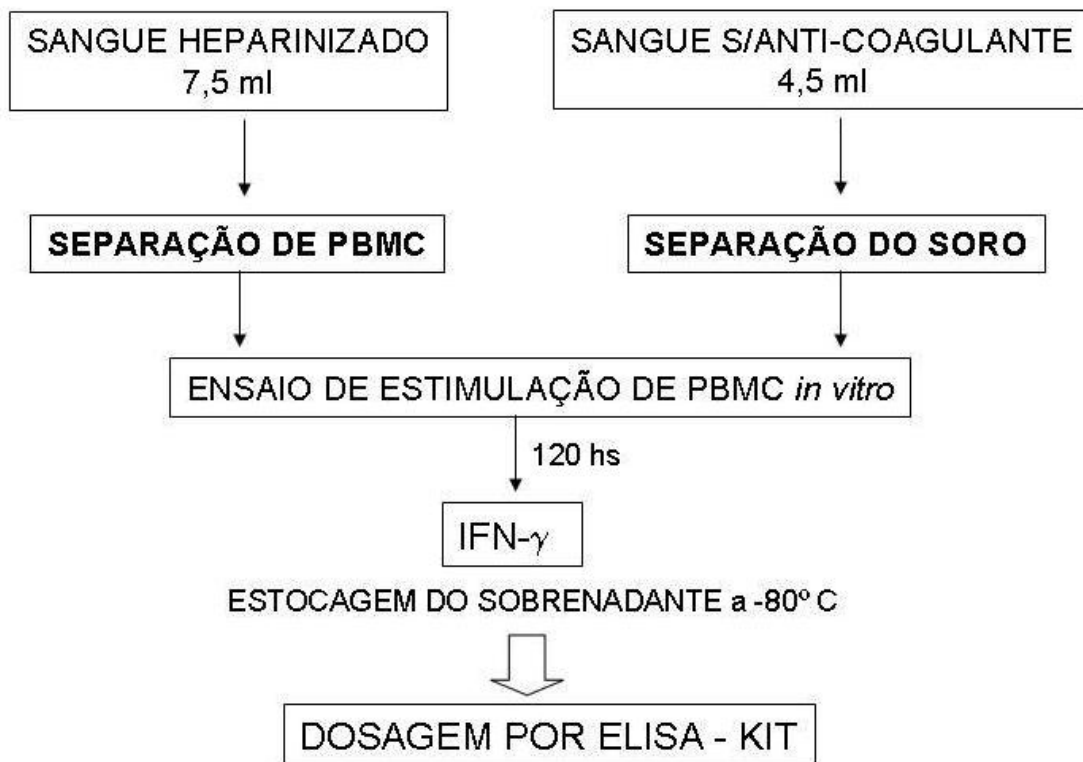


FIGURA 7 – Fluxograma da amostra para dosagem de IFN- $\gamma$ .

### 3.3 Processo Logístico da Amostra:

Para as coletas das amostras de sangue total, utilizamos tubos de polipropileno, com heparina de lítio (Sarsted, Alemanha), e para a obtenção do soro, utilizamos tubo, em polipropileno, com gel separador (Sarsted, Alemanha). As coletas foram executadas durante o período da manhã, pela equipe de Enfermagem do posto de Saúde da Secretaria Municipal de Sobral – CE; e em seguida, enviadas via transporte coletivo, ou particular, para o Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza, sendo processadas até 12 horas após a coleta. Durante o transporte estas amostras foram acondicionadas em caixa de isopor contendo almofadas de gelo reciclável resfriado a 4° C.

### 3.4 Diagnóstico da Hanseníase:

A caracterização clínico-epidemiológica das diferentes formas da hanseníase foi feita por profissional médico com formação em dermatologia e capacitação em hanseníase da Secretaria de Saúde do Município de Sobral. Optamos pela nomenclatura que utiliza o termo dimorfa para as formas intermediárias, em substituição ao termo “*borderline*” utilizado pelos avaliadores clínicos.

O exame histopatológico dos indivíduos com suspeita clínica de hanseníase foram realizados previamente à coleta do sangue para confirmar o diagnóstico no Laboratório Biopse, em Fortaleza-CE.

A baciloscopia foi realizada pelo Laboratório da Secretaria de Saúde do Município de Sobral.

### 3.5 Materiais e Métodos:

#### 3.5.1 Obtenção de sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico sob diferentes estímulos

As condições utilizadas para o desenvolvimento deste ensaio foram baseadas no trabalho de SPENCER et al., (2005) com algumas modificações. A escolha desta metodologia está fundamentada no conceito que no sangue periférico encontraremos células primadas pelo antígeno com potencial de migração para os diversos locais onde está ocorrendo a resposta imunológica ao *Mycobacterium leprae*.

A citocina que pretendemos mensurar é representativa do padrão de resposta imunológica protetora contra o *Mycobacterium leprae* descrito na literatura.

As amostras de sangue heparinizadas foram, primeiramente, homogeneizadas, e em seguida dispensadas lentamente em um tubo contendo Ficoll-Hypaque 1077 (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA), sendo esta diluição na proporção 2:1.

Após diluição, a camada de células mononucleares do sangue periférico foi obtida por gradiente de densidade, após uma centrifugação de 600 x g por 30 minutos a 25°C (Rotor 11192 da centrífuga refrigerada, modelo 2k-15, Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA). Em seguida, as células mononucleares foram colhidas na interface da solução de Ficoll-Hypaque e lavadas 3 vezes com solução de Hank's (Sigma Chemical Company-St. Louis, EUA), centrifugada a 250 x g por 10 minutos a 5°C, e desprezado o sobrenadante a cada lavagem. Essas células foram ressuspensas com 1 ml do meio RPMI-1640 contendo HEPES e bicarbonato de sódio 2 g/l, L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 ug/ml), provenientes da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA).

A viabilidade celular foi verificada através da adição de 10 µl da suspensão de células a 90µl da solução azul de tripano 1% (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA). Em seguida, feita a contagem na câmara de Neubauer (Hirschmann EM Techcolor, EUA). Um limite de 90% de viabilidade foi estabelecido para que as células pudessem ser usadas nos ensaios.

Após contagem, de acordo com o volume requerido de células, foi ajustada a concentração celular para  $2 \times 10^6$  de PBMC/ml utilizando meio RPMI-1640 e soro autólogo a 10% .

Em placas de 96 poços (Nunc, EUA) foram preparadas culturas contendo  $3,6 \times 10^5$  células num volume de 180  $\mu$ l por poço, incubadas, em triplicata, com 20  $\mu$ l dos seguintes reagentes: meio RPMI, ou PHA (fitohemaglutinina) na concentração de 10  $\mu$ g/ml (Difco, Detroit, EUA), ou extrato bruto antigênico de *Mycobacterium leprae* a 20  $\mu$ g/ml (fornecido pelo Prof. Brennan, Universidade Estadual do Colorado). As placas foram incubadas em estufa úmida a 37°C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, sendo os sobrenadantes coletados após 120 horas e armazenados em alíquotas de 150  $\mu$ l a menos 80°C até o momento da dosagem de IFN- $\gamma$ , pelo método imunoenzimático.

### 3.5.2 Ensaio imunoenzimático para dosagem IFN- $\gamma$

Para a quantificação de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas de PBMC na presença do meio RPMI (controle negativo), ou de PHA (mitógeno, controle positivo), ou de extrato antigênico do *Mycobacterium leprae* foi utilizado o método imunoenzimático ELISA indireto do tipo sanduíche do conjunto diagnóstico do fabricante eBioscience, EUA.

A técnica baseia-se no uso de um anticorpo monoclonal de captura, em fase sólida, específico para a citocina presente na amostra, que foi detectada utilizando-se um segundo anticorpo biotinilado. A ligação foi evidenciada pela adição de estreptavidina conjugada a peroxidase seguida da adição da solução substrato tetrametilbenzidina (TMB). A leitura foi realizada em filtro de 450 nm em leitora da Amersham eBiosciences (EUA), sendo os resultados plotados numa curva feita a partir dos valores obtidos com a citocina recombinante padrão constante no conjunto diagnóstico em diferentes concentrações (mínimo de 4 pg/ml e máximo de 500 pg/ml). No Anexo I encontram-se detalhadas as etapas de realização do ensaio.

Os ensaios foram realizados em triplicata e foram suficientemente sensíveis para discriminar as diferentes concentrações dessas citocinas presentes nas várias formas clínicas da hanseníase.

### 3.6 Análise estatística

As variáveis qualitativas foram apresentadas através de uma análise descritiva e representadas através de tabelas e figuras. O teste de associação e homogeneidade da distribuição de variáveis categorizadas com dados não pareados foi realizado através do teste Exato de Fisher, sendo o limite de significância aceito de 5% ( $p < 0,05$ ).

O programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, IL) versão 13 foi utilizado para as análises estatísticas e o *Software Microsoft Office Excel* 2003 para utilizado para elaboração de tabelas e figuras.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Casos índices: características clínicas e epidemiológicas

Participaram deste estudo 30 casos índices, sendo 10 do sexo feminino e 20 do sexo masculino. A média de idade do grupo foi de 47 anos, com idade mínima de 17 anos e máxima de 85 anos.

Os casos foram divididos de acordo com suas classificações clínicas: oito indivíduos apresentaram a forma indeterminada, dois a forma dimorfa tuberculóide, oito a forma tuberculóide, dois foram classificados como dimorfos virchovianos e oito virchovianos. As formas dimorfas foram agrupadas conforme sua associação como a forma tuberculóide ou virchoviana, por apresentarem semelhanças em seus quadros clínicos, conforme está ilustrado na figura 7.

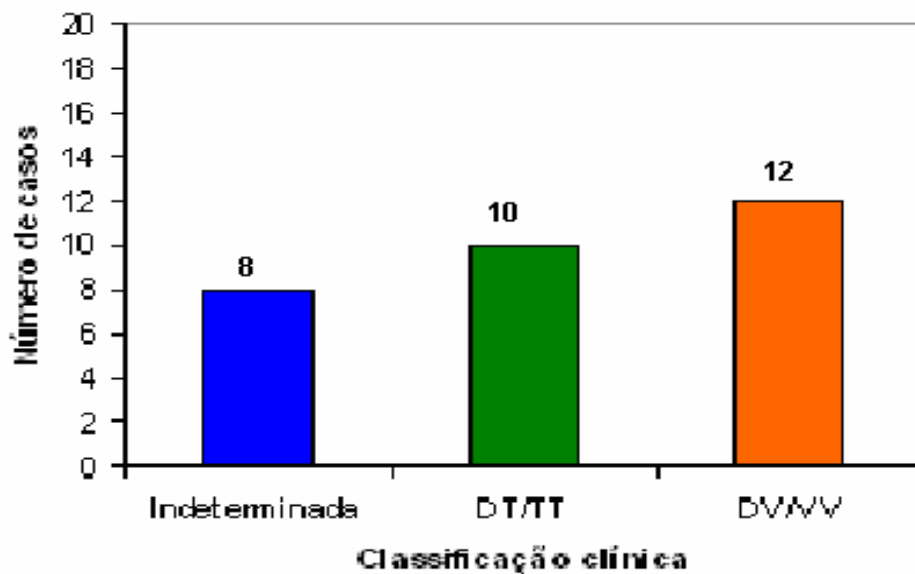


FIGURA 8 - Distribuição dos casos índices segundo a classificação clínica: 8 casos com a forma indeterminada, 10 casos dimorfos tuberculóide/tuberculóide (DT/TT) e 12 casos dimorfos virchovianos/virchovianos (DV/VV).

Dos 30 casos estudados, 18 (60,0%) apresentaram as formas paucibacilares da doença, sendo 08 com a forma indeterminada, 02 com a dimorfa tuberculóide e 8 tuberculóide. Doze (40,0%) indivíduos apresentaram as formas multibacilares, sendo 2 dimorfos virchovianos e 8 virchovianos, conforme está ilustrado na figura 8.

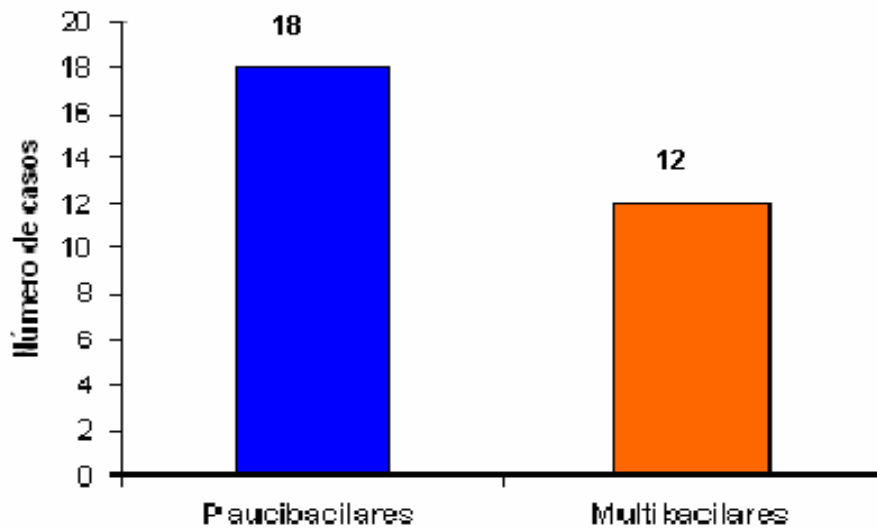


Figura 9 - Distribuição dos casos segundo a classificação operacional: 18 paucibacilares (indeterminada, dimorfa tuberculóide e tuberculóide) e 12 multibacilares (dimorfa virchoviana e virchoviana).

O número de lesões nos 30 casos índices foi mensurado utilizando três parâmetros: presença de lesão única, de dois a cinco lesões, e presença de mais que cinco lesões, conforme ilustrado na tabela 1.

Em quatro casos, todos com a forma multibacilar da hanseníase, foram detectados graus variáveis de incapacidade física. Desses, três foram classificados como virchovianos e um como dimorfo virchoviano.

Tabela 1  
Distribuição das formas clínicas dos casos índices pelo número de lesões apresentadas

Formas clínicas	Lesão única	02 a 05 lesões	≥ 05 lesões	Total
Indeterminada	6	1	1	8
DT / TT	6	4	0	10
DV / VV	1	2	9	12
TOTAL	13	7	10	30

#### 4.2 Contactantes: características epidemiológicas

Participaram da pesquisa 60 contactantes, sendo 26 não consangüíneos e 34 consangüíneos. O sexo feminino prevaleceu nos dois grupos – consangüíneos e não consangüíneos (tabela 2).

A média de idade entre os contactantes consangüíneos do sexo masculino foi de 37 anos, enquanto que a dos contactantes do sexo feminino foi 41 anos. Para os não consangüíneos, esta média foi respectivamente, 37 e 49 anos.

Em dois terços das famílias estudadas, os indivíduos foram pareados segundo a existência ou não de consangüinidade. Em três famílias, os contactantes eram todos consangüíneos e em sete famílias, os contactantes eram não consangüíneos.

Quanto à forma clínica do caso índice, 16 indivíduos eram contactantes de casos com a forma indeterminada, 20 eram contactantes de casos com as formas DT/TT e 24 eram contactantes de casos com as formas DV/VV.

TABELA 2  
Distribuição dos contactantes quanto à consangüinidade e ao sexo

Sexo	Contactantes	%	Contactantes	%
	consangüíneos		Não consangüíneos	
MASCULINO	14	41.2	07	27.0
FEMININO	20	58.8	19	73.0
TOTAL	34	100	26	1000

#### 4.3 Detecção da cicatriz pela vacina com BCG nos casos índices e nos contactantes

Vinte e um (70%) casos índices não apresentaram cicatriz por BCG, sem diferença estatisticamente significativa quando comparados quanto à forma clínica apresentada (tabela 3).

TABELA 3  
Distribuição dos casos índices quanto à forma clínica da hanseníase e à presença ou ausência de cicatriz pela vacina BCG.

Formas clínicas	Presença de cicatriz	Ausência de cicatriz
Indeterminada	4	4
DT / TT	2	8
DV / VV	3	9
TOTAL	9	21

No grupo de contactantes foram observados que 43 (66%) indivíduos apresentaram cicatriz pela vacina com BCG, e 17 (34%) contactantes não mostraram presença de cicatriz, sem diferença estatisticamente significativa quando comparados quanto à consangüinidade (tabela 4).

TABELA 4  
Distribuição dos contactantes quanto à consangüinidade e à presença ou ausência de cicatriz pela vacina BCG.

Contactantes	Presença de cicatriz	Ausência de cicatriz
Consangüíneos	23	11
Não consangüíneos	20	6
TOTAL	43	17

Quando comparamos os dados de presença ou ausência de cicatriz nos casos índices com os contactantes, observamos uma diferença significativa entre esses dois grupos (Teste de Fisher,  $p=0,0002$ , tabela 5).

TABELA 5  
Comparação entre casos índices e os contactantes quanto à presença ou ausência de cicatriz pela vacina BCG.

Indivíduos	Presença de cicatriz	Ausência de cicatriz
Casos índices	9	21
Contactantes	43	17
TOTAL	52	38

Teste Estatístico de Fisher ( $p = 0,0002$ )

#### 4.4 Produção de IFN- $\gamma$ em sobrenadantes de cultura de "PBMC" dos casos índices após estímulo com extrato bruto de *Mycobacterium leprae*.

Nos sobrenadantes das culturas de células incubadas somente com meio RPMI (controle negativo) tanto dos casos índices como dos contactantes, não foi detectada a produção de IFN- $\gamma$ , pois as concentrações ficaram abaixo do limite de detecção (menor que 4 pg/ml).

Nos sobrenadantes das culturas de células de todos os casos índices e contactantes incubadas com fitohemaglutinina (controle positivo), foram encontrados valores acima do limite de detecção (maior ou igual a 4 pg/ml). O valor mínimo encontrado para IFN- $\gamma$  foi de 119,8 pg/ml e máximo de 229,9 pg/ml, sendo a média igual a 165,39 pg/ml e desvio padrão de 25,45.

Nas amostras cujos níveis de IFN- $\gamma$  foram iguais ou acima de 4 pg/ml (limite de detecção do método), o coeficiente de variação das triplicatas variou de mínimo de 2% a um máximo de 39%.

Nos sobrenadantes das culturas de células dos casos índices incubados somente com extrato bruto de *Mycobacterium leprae*, foram detectados níveis desta citocina em três (37,5%) casos com a forma indeterminada (mínimo de 74,3 pg/ml e

máximo de 200,2 pg/ml), em 7 (70,0%) casos com as formas dimorfa tuberculóide/tuberculóide (mínimo 44,6 pg/ml e máximo de 114,1 pg/ml), e em apenas 2 (16,6%) casos com as formas dimorfa virchoviana/virchoviana (mínimo 49,7 pg/ml e máximo de 111,1 pg/ml), conforme ilustra a figura 9. Nas amostras cujos níveis de IFN- $\gamma$  foram iguais ou acima de 4 pg/ml (limite de detecção do método), o coeficiente de variação das triplicatas variou de mínimo de 1% a um máximo de 21%

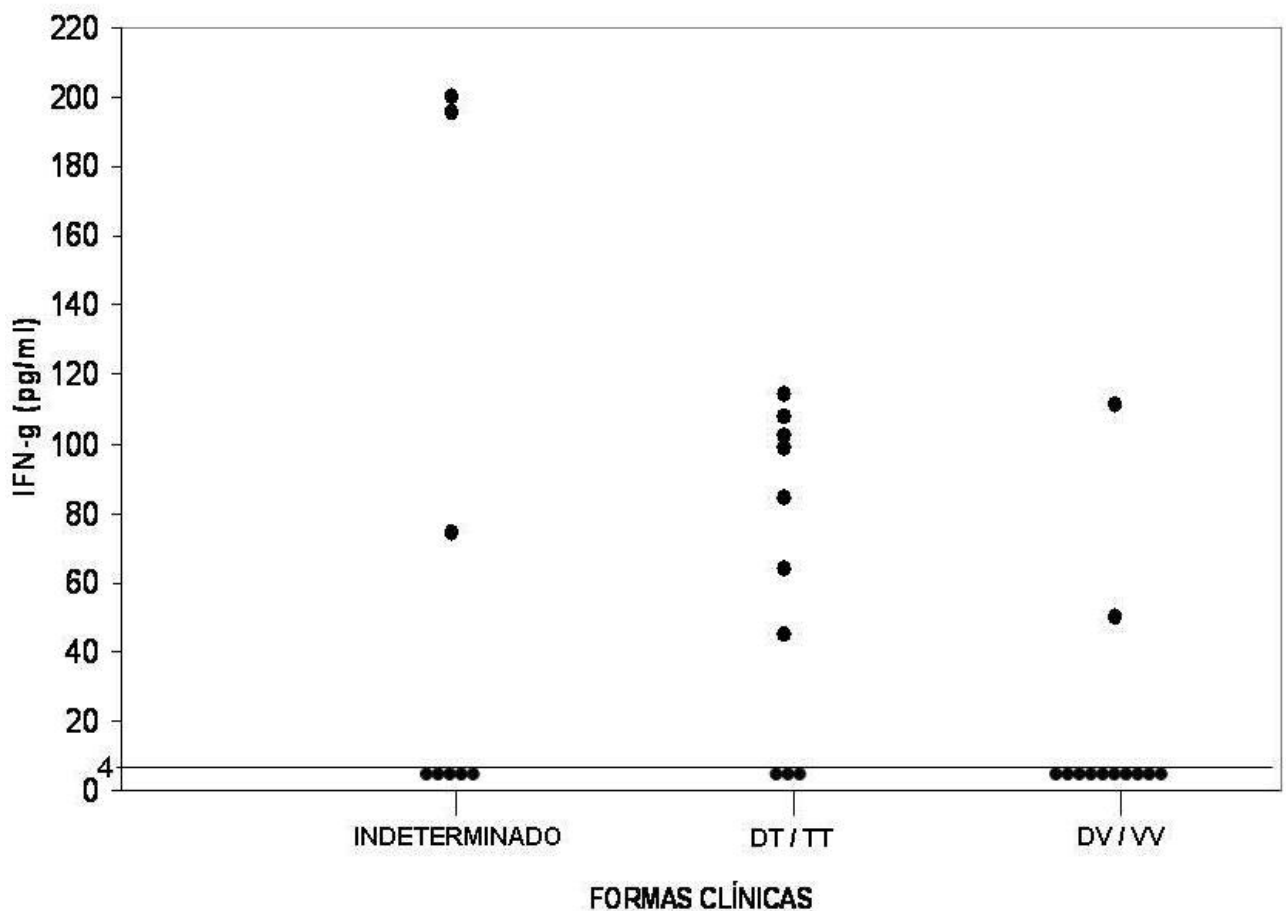


FIGURA 10- Níveis de IFN- $\gamma$  produzidos por "PBMC" após estímulo *in vitro* com *M. leprae* dos casos índices segundo as formas clínicas: indeterminada, dimorfa-tuberculóide e tuberculóide, dimorfa-virchoviana e virchoviana.

Observamos, ainda que, de todos os casos que produziram a citocina em níveis detectáveis, a grande maioria (10/12) é paucibacilar. No grupo de multibacilares, os níveis de IFN-  $\gamma$  foram detectados em apenas 02 casos, ambos virchovianos.

Quando comparamos a produção de níveis detectáveis da citocina entre as diferentes apresentações clínicas, observamos que houve diferença significativa na produção do IFN- $\gamma$  nas formas dimorfa tuberculóide/ tuberculóide em relação às formas dimorfo virchoviana/virchoviana (teste de Fisher  $p=0,027$ , tabela 6).

Contudo quando comparamos os resultados obtidos nos casos com a forma indeterminada com o grupo dimorfo tuberculóide/tuberculóide ou com o grupo dimorfo virchoviano/virchoviano não encontramos diferença significativa (teste de Fisher;  $p=0,342$  e  $0,347$ , respectivamente) (tabela 6).

TABELA 6  
Distribuição dos casos índices segundo a forma clínica e a detecção da produção de IFN- $\gamma$

Formas Clínicas	IFN- $\gamma$ não detectável	IFN- $\gamma$ detectável*	TOTAL
Indeterminado	5	3	8
DT / TT	3	7	10
DV / VV	10	2	12
TOTAL	18	12	30

\* Valor de IFN- $\gamma$   $\geq 4$  pg/ml. Teste Estatístico de Fisher (DT/TT versus DV/VV,  $p= 0,027$ )



#### 4.5 Produção de IFN- $\gamma$ em sobrenadantes de PBMC dos contactantes após estímulo com o extrato bruto de *Mycobacterium leprae*.

Trinta e quatro (56,7%) contactantes produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , dos quais 9/16 eram contactantes dos casos indeterminados (mín. 27,1 pg/ml e máx. de 212,8 pg/ml), 10/20 dos casos com as formas dimorfa tuberculóide/tuberculóide (mínimo 20,9 pg/ml e máximo de 94,7 pg/ml) e 15/24 dos casos com as formas dimorfa virchoviana/virchoviana (mínimo 29,8 pg/ml e máximo de 160,1 pg/ml), conforme está ilustrado na figura 10.

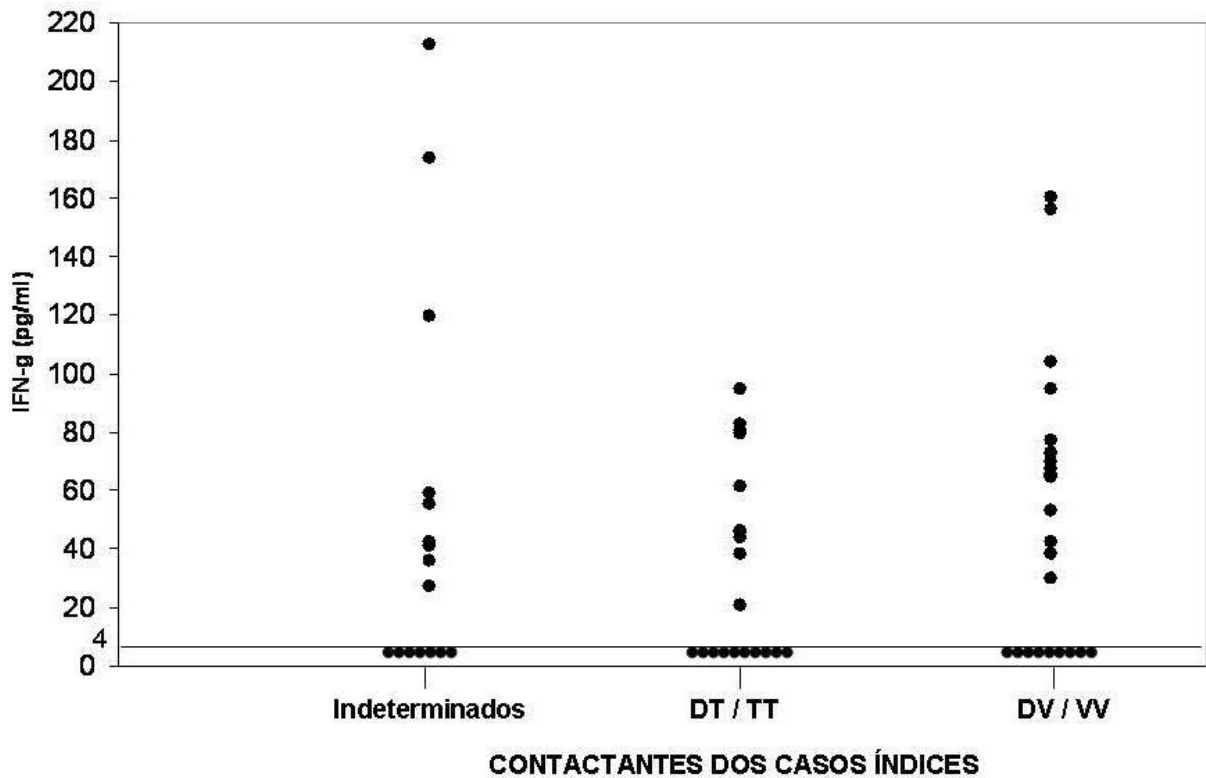


FIGURA 11- Níveis de IFN- $\gamma$  produzidos por "PBMC" após estímulo *in vitro* com antígeno de *M. leprae* em contactantes segundo as formas clínicas dos respectivos casos índices.

Ao avaliarmos a produção de IFN- $\gamma$  nos contactantes quanto à consangüinidade, verificamos que dos 60 contactantes, 34 (56,5%) produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , sendo 21/34 (61,8%) indivíduos consangüíneos, porém não houve diferença significativa entre os grupos (tabela 7).

TABELA 7  
Distribuição dos contactantes quanto à consangüinidade e à detecção da produção de IFN- $\gamma$

Contactantes	IFN- $\gamma$ não detectável	IFN- $\gamma$ detectável*	TOTAL
Consangüíneo	13	21	34
Não consangüíneo	13	13	26
TOTAL	26	34	60

\* Valor de IFN- $\gamma$   $\geq$  4 pg/ml

Ao analisarmos os contactantes segundo a existência ou não de consanguidade e a relação com as formas clínicas os casos índices, observamos que nos contactantes de casos com a forma indeterminada, nove indivíduos produziram IFN- $\gamma$  em níveis detectáveis, sendo oito (88,8%) contactantes consangüíneos (tabela 8).

O número de contactantes consangüíneos dos casos dimorfo tuberculóide/tuberculóide que produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$  foi de 5/10 (50,0%). O mesmo percentual é observado para os contactantes não consangüíneos (tabela 8).

Para os contactantes do grupo de casos dimorfo virchoviano/virchoviano, nossos dados revelam que 15/24 (62,5%) produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , sem diferença significativa quanto à consanguidade (tabela 8).

TABELA 8

Distribuição dos contactantes quanto à forma clínica do caso índice, à consangüinidade e à detecção da produção de IFN- $\gamma$

Contactantes	IFN- $\gamma$ não detectável	IFN- $\gamma$ detectável*	TOTAL
<b>Casos Indeterminados</b>			
Consangüíneo	5	8	13
Não consangüíneo	2	1	3
<b>Casos DT/TT</b>			
Consangüíneo	5	5	10
Não consangüíneo	5	5	10
<b>Casos DV/VV</b>			
Consangüíneo	3	8	11
Não consangüíneo	6	7	13
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>34</b>	<b>60</b>

\* Valor de IFN- $\gamma$   $\geq$  4 pg/ml

Quando consideramos a classificação operacional dos casos índices, 36 (60,0%) contactantes são pertencentes ao grupo de casos paucibacilares (dimorfo tuberculóide, tuberculóide e indeterminado), e 24 (40,0%) ao grupo de casos multibacilares (dimorfo virchoviano, virchoviano). Quanto à produção de IFN- $\gamma$ , não encontramos diferença significativa entre os contactantes desses dois grupos (teste de Fisher,  $p=0,596$ , tabela 9).

TABELA 9

Distribuição dos contactantes segundo a classificação operacional (paucibacilar ou multibacilar) dos casos índices e quanto à detecção da produção de IFN- $\gamma$

Contactantes de casos	IFN- $\gamma$ não detectável	IFN- $\gamma$ detectável*	TOTAL
Paucibacilares	17	19	36
Multibacilares	9	15	24
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>34</b>	<b>60</b>

\*Valor de IFN- $\gamma$   $\geq$  4 pg/ml

4.6 Correlação entre casos índices e seus respectivos contactantes quanto à produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de cultura de “PBMC” após estímulo com extrato bruto de *Mycobacterium leprae*

Nas famílias dos casos com a forma clínica indeterminada, 37,5% dos casos índices produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , contra 56,2% de seus contactantes, mas a diferença não foi significativa (teste de Fisher,  $p=0,6668$ , tabela 10).

Nas famílias dos casos com as formas dimorfa tuberculóide/tuberculóide, 70% dos casos produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , assim como 50% de seus contactantes, logo sem diferença significativa entre eles (teste de Fisher,  $p = 0,4404$ , tabela 10). Apenas 16,7% dos casos DV/VV produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , e ao correlacionarmos a produção de IFN- $\gamma$  entre os casos e seus contactantes deparamos com uma diferença significativa nessas famílias (teste de Fisher,  $p= 0,0140$ , tabela 10).

TABELA 10  
Distribuição dos indivíduos (casos e contactantes) agrupados segundo a forma clínica do caso índice e quanto à detecção da produção de IFN- $\gamma$

INDIVÍDUOS	IFN- $\gamma$ não detectável	IFN- $\gamma$ detectável*	TOTAL
Famílias Indeterminados <sup>1</sup>			
Casos índices	5	3	8
Contactantes	7	9	16
Famílias DT/TT <sup>2</sup>			
Casos índices	3	7	10
Contactantes	10	10	20
Famílias DV/VV <sup>3</sup>			
Casos índices	10	2	12
Contactantes	9	15	24
TOTAL	44	46	90

\*Valor de IFN- $\gamma \geq 4$  pg/ml. <sup>1</sup>Casos Indeterminados X Contactante (teste de Fisher,  $p=0,6668$ ).

<sup>2</sup>Casos DT/TT X Contactantes (teste de Fisher,  $p=0,4404$ ). <sup>3</sup>Casos VT/VV X Contactantes (teste de Fisher,  $p=0,0140$ )

4.7 Correlação entre a presença de cicatriz pela vacina BCG e a produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de cultura de “PBMC” após estímulo com extrato bruto de *Mycobacterium leprae*:

Dos doze indivíduos com hanseníase que produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , 16,6% apresentaram cicatriz pela vacina com BCG. Nos indivíduos que não produziram níveis detectáveis desta citocina, em 38,8% também foi observada a presença de cicatriz. Não evidenciamos diferença significativa (teste de Fisher,  $p=0,2487$ ) na produção de IFN- $\gamma$  entre os indivíduos com hanseníase que apresentam ou não a cicatriz pela vacina com BCG (tabela 11).

Dos 34 contactantes que produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , 67,6% apresentaram cicatriz pela vacina com BCG. Nos contactantes que não produziram níveis detectáveis desta citocina, em 76,9% também foi observada a presença de cicatriz. Não evidenciamos diferença significativa (teste de Fisher,  $p=0,5656$ ) na produção de IFN- $\gamma$  entre aqueles contactantes que apresentam ou não a cicatriz pela vacina com BCG (tabela 11).

TABELA 11  
Distribuição dos indivíduos (casos e contactantes) agrupados segundo a presença ou não de cicatriz pela vacina BCG e à detecção da produção de IFN- $\gamma$

Indivíduos	IFN- $\gamma$ não detectável	IFN- $\gamma$ detectável*	TOTAL
<b>Casos índices</b>			
Presença de cicatriz	7	2	9
Ausência de cicatriz	11	10	21
<b>Contactantes</b>			
Presença de cicatriz	20	23	43
Ausência de cicatriz	6	11	17
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>34</b>	<b>60</b>

\* Valor de IFN- $\gamma$   $\geq$  4 pg/ml

## 5 DISCUSSÃO

Desde o início do século passado, tem-se como objetivo pesquisar melhores testes para o diagnóstico precoce do *Mycobacterium leprae* e para avaliação do padrão de imunidade do indivíduo frente à doença. Embora existam testes sorológicos capazes de diagnosticar pacientes com a forma virchoviana, como a pesquisa de anticorpos anti-PGL1, estes por sua vez, demonstram certa limitação no diagnóstico de pacientes paucibacilares (forma indeterminada, dimorfa-tuberculóide e tuberculóide). Além disso, pacientes multibacilares são difíceis de serem diagnosticados no estágio inicial da doença, fase na qual o paciente já se apresenta como fonte ativa de infecção (MACFARLANE et al., 2001; GELUK et al., 2005).

Na avaliação da imunidade contra o *Mycobacterium leprae* tem sido utilizada a mensuração de citocinas em sobrenadantes de culturas de células estimuladas com o extrato bruto ou proteínas purificadas de componentes do bacilo. A importância do IFN- $\gamma$  na redução da infecção pelo *Mycobacterium leprae* é bem documentada 'in vitro' e 'in vivo'. Esta citocina desempenha uma função central no controle da infecção bacteriana (MACFARLANE et al., 2001). O aumento da imunidade mediada por célula com ativação de macrófagos e posterior destruição do microorganismo através de radicais microbicidas são alguns dos papéis importantes na participação desta citocina neste complexo mecanismo imunológico contra patógenos intracelulares (REDDY et al., 2004).

Populações celulares do sangue periférico são estimuladas ao reconhecerem peptídeos antigênicos do *Mycobacterium leprae*. Células mononucleares, como monócitos, células dendríticas e células B estão envolvidas na resposta imunológica, desempenhando importantes funções como células apresentadoras de antígenos e na própria produção de IFN- $\gamma$ . A ativação dessas células leva a um padrão de resposta celular adaptativa na qual a IL-12 produzida está diretamente envolvida na proliferação e diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$ . Esta produção é de grande importância na ativação de macrófagos, responsáveis pela destruição do microorganismo (LIBRATY et al., 1997; FOOTE 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de IFN- $\gamma$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com extrato antigênico bruto de *Mycobacterium leprae*. Essas células foram obtidas de indivíduos com diferentes formas clínicas da hanseníase e de seus respectivos contactantes.

Como conseguimos detectar a produção de IFN- $\gamma$ , inferimos que o extrato bruto de *M. leprae* por nós utilizados, deve possuir epítomos também encontrados nas a(s) cepa(s) infectante(s) presente(s) no município de Sobral-CE. Caso não existissem antígenos comuns, acreditamos que não haveria produção da citocina pelos indivíduos infectados ou por seus contactantes.

Em nosso estudo verificamos que os casos índices com a forma tuberculóide da hanseníase apresentaram uma maior resposta ao estímulo de *M. leprae* do que as demais formas clínicas desta doença. Além disso, a produção de IFN- $\gamma$  no grupo de casos paucibacilares - tuberculóide e dimorfo tuberculóide - difere significativamente comparada ao grupo de casos multibacilares, cujos níveis desta citocina foram detectáveis em apenas 2 casos (16,7%).

Nossos dados evidenciam uma predominância na população linfocitária produtora de citocinas padrão tipo 1, que exerce importante papel na proteção contra o bacilo intracelular, como o IFN- $\gamma$ . Por outro lado, a baixa resposta observada nos casos multibacilares demonstra uma provável predominância de outros tipos celulares produtores de citocinas (MACFARLANE et al., 2001; LISTVANOVA et al., 2002).

Da mesma forma que encontrado em nosso trabalho, MacFarlane et al. (2001) mostraram que casos índices com a forma tuberculóide produziram níveis detectáveis e significativamente mais altos de IFN- $\gamma$  do que casos virchovianos em resposta ao antígeno sonicado de *M. leprae* e de antígenos específicos como a proteína de 45 KDa.

Wilkinson et al. (1999), utilizando antígeno bruto de *M. leprae*, também mostraram que o número de casos índices tuberculóides que produziram IFN- $\gamma$  em níveis detectáveis foi bem superior ao grupo multibacilar (dimorfo virchivano/virchoviano), confirmando que casos paucibacilares são caracterizados por uma forte imunidade mediada por célula com baixa produção de anticorpos, ao contrário do grupo multibacilar.

A resposta ao estímulo antigênico de *M. leprae* foi avaliada também nos contactantes dos casos índices estudados.

Considerando todos os contactantes, observamos que 34 (56,7%) produziram IFN- $\gamma$ , cujo percentual não diferiu daquele encontrado nos pacientes (40%). Ao analisarmos os casos índices agrupados através da classificação clínica, observamos que apenas o grupo multibacilar e seus contactantes apresentaram diferença significativa, cujos dados são possivelmente justificados pelo baixo número de casos multibacilares que apresentaram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$  frente ao estímulo bruto de *M. leprae*.

Spencer et al (2005), utilizando metodologia semelhante a nossa, encontraram que 9/10 indivíduos paucibacilares e 9/10 dos contactantes domiciliares de casos multibacilares, todos provenientes do Rio de Janeiro - Brasil, produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ . Inferimos que as diferenças encontradas por aqueles autores e nossos achados devam ser secundárias às características epidemiológicas das populações estudadas. Além de um maior número de contactantes domiciliares estudados por nós, estes devem apresentar condições sanitárias e sócio-econômicas que comprometem o padrão de sua resposta imunológica.

As condições individuais e socioeconômicas, como estado nutricional, situação de higiene e, principalmente, as de moradia da população parecem influenciar na transmissão, o que dificulta o controle da endemia (AQUINO et al. 2003).

O grupo de contactantes dos casos estudados por nós, é geralmente considerado de alto risco em desenvolver a hanseníase. Estudos mais aprofundados, bem como o seguimento desses indivíduos, seriam de grande interesse para determinar se aqueles contactantes, que não produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , são realmente os de maiores riscos (mais prováveis) em desenvolver a doença.

Com relação à ausência da produção da citocina nos contactantes, algumas possíveis explicações seria um menor contato com o *M. leprae* no convívio social, para os contactantes de paucibacilares. Outra hipótese seria a existência de um estado de anergia que pode estar relacionado à deficiência na expressão do gene responsável pela síntese de IFN- $\gamma$ , ou mesmo, à baixa ativação de uma população linfocitária produtora de citocinas padrão tipo 1.



Quando consideramos a existência ou não de consangüinidade entre os contactantes e os casos índices e sua relação com a produção de IFN- $\gamma$ , observamos que percentuais semelhantes de contactantes não consangüíneos produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , tanto os que pertenciam às famílias de paucibacilares como aqueles das famílias de multibacilares,.

Observamos também que mais da metade dos contactantes consangüíneos produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ . Esse índice de positividade foi presente tanto para os contactantes dos casos paucibacilares quanto dos multibacilares.

MacFarlane et al. (2001) utilizando antígeno sonicado de *M. leprae*, mostrou que o grupo de contactantes, na maioria dos casos virchovianos, produziu níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ .

Vale ressaltar que os trabalhos prévios encontrados não discriminam consangüinidade. Por outro lado, nossos dados permitem-nos, a princípio, sugerir que consangüinidade entre o caso índice – nas suas diferentes formas clínicas - e seus contactante, não influencia na produção de IFN- $\gamma$ .

Vários genes podem estar envolvidos na susceptibilidade à hanseníase. Devido às associações terem sido encontradas em pequenos grupos de pacientes, ou numa única população, é necessária a confirmação através de um amplo estudo imunogenético, embora haja evidências que o risco de desenvolver a doença é parcialmente determinado pela genética. A contribuição da hereditariedade permanece em ser quantificado e ampliado para um número mais de indivíduos de uma mesma família (MOET et al., 2006; MORAES et al., 2006).

Observamos que a grande maioria dos contactantes apresenta cicatriz pela vacina com BCG, sendo esse número significativamente maior que nos casos índices. Porém a ausência de produção de níveis detectáveis de IFN- $\gamma$  por 46,5% desses contactantes deve-se, provavelmente, à diferença de populações linfocitárias estimuladas por diferentes peptídeos antigênicos do *M. leprae* comparado com o bacilo de Calmete-Guerrin (BCG).

MOET et al. (2006), trabalhando com fatores de risco para hanseníase em contactantes, mostraram que indivíduos mais velhos (acima dos 30 anos) são mais propensos a desenvolverem a hanseníase. Neste trabalho foi relatada também a

importância do convívio social, onde aparentados de primeiro grau, bem como não aparentados (especialmente o cônjuge) exibem maior risco de desenvolverem a doença.

A BCG é utilizada como estímulo antigênico vacinal capaz de estimular um processo inflamatório local onde células dendríticas e macrófagos, dentre outras, reconhecem o antígeno e migram para reservatórios celulares onde apresentam o peptídeo antigênico para diferentes populações linfocitárias, sendo estas capazes de formar células de memória circulantes; bem como nos linfonodos e sistema retículo endotelial (BERVELEY, 2002).

Em nosso trabalho, tivemos também a oportunidade de comparar a detecção dos níveis de IFN- $\gamma$  nos casos índices correlacionando com a presença ou ausência de cicatriz (BCG). Em 30 casos estudados observamos que não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Também relacionamos a produção de IFN- $\gamma$  com a presença de cicatriz nos contactantes, e sua relação com a consangüinidade, porém não encontramos diferença significativa nos grupos estudados.

Estudos de casos de vacinação por BCG em contactantes, ou mesmo numa população geral de pacientes com hanseníase, têm mostrado que a vacina fornece proteção contra esta doença, especialmente quando dada em doses repetidas. Embora a magnitude deste efeito protetor difere consideravelmente, de 20 % a 80%, é provável que a vacinação por BCG (indicado pela cicatriz) indique baixo risco de contrair a doença (MOET et al., 2006).

A vacina BCG mostra proteção variada em diferentes populações, porém a razão desta variação não é clara. Várias hipóteses como diferentes cepas de *M. leprae*, diferentes cepas de BCG, micobactérias ambientais e características imunogenéticas da população podem ser alguns dos fatores relacionados com diferentes respostas, mesmo em indivíduos ou casos de uma mesma região (MOET et al., 2006; MORAES et al., 2006).

Entretanto, não se tem muito conhecimento sobre o curso da hanseníase em casos já imunizados com a vacina BCG. RAMADASAN et al. (2003), estudando 562 casos de hanseníase, no Paquistão, demonstraram que não houve qualquer diferença

significativa nos padrões das formas clínicas da hanseníase em vacinados ou não vacinados.

Da mesma forma, a monitorização da vacinação por BCG nos contactantes é necessária. A ausência na produção de IFN- $\gamma$  em alguns indivíduos, e a presença em outros, necessita de um acompanhamento por um período prolongado, no intuito de investigar se aqueles com cicatriz não irão desenvolver a doença, ou se os contactantes que não têm cicatriz, e que não produziram IFN- $\gamma$ , são realmente os de maior risco em adoecer. Sabidamente, todos esses indivíduos convivem diariamente com pessoas infectadas pelo bacilo.

Quanto aos contactantes que produziram níveis detectáveis de IFN- $\gamma$ , não podemos afirmar que esses não venham a desenvolver a doença, uma vez que, trabalhamos com uma amostra populacional pequena, e para que haja uma maior segurança nesta afirmação é necessário o seguimento desses contactantes.

Outro fator importante a ser considerado é também o acompanhamento dos casos índices com a forma indeterminada da doença, pois relatamos que a maioria não produziu IFN- $\gamma$  ao estímulo antigênico utilizado. Sabe-se que indivíduos com esta forma clínica apresentam uma resposta imunológica indefinida diante do bacilo, podendo ocorrer evolução para cura espontânea, ou desenvolver-se lentamente, ou ainda, involuir ressurgindo tardiamente com características clínicas definidas dentro do espectro da doença (SOUZA 1997; ARAUJO 2003).

## 6 CONCLUSÕES

Em nosso trabalho observamos que pacientes com a forma paucibacilar da doença produziram níveis significativamente maiores que os pacientes com a forma multibacilar. Ao correlacionarmos casos índices e contactantes quanto à consangüinidade concluímos que estes dois grupos não estão diretamente relacionados com a produção de IFN- $\gamma$ . Além disso, a produção de citocina entre esses casos índices e contactantes independem da presença de cicatriz de BCG.

Contudo, a dosagem de IFN- $\gamma$  isoladamente não nos assegura em determinar o perfil de susceptibilidade e resistência nesses casos. A necessidade de outros achados clínicos e laboratoriais e de acompanhamento clínico, provavelmente, nos dariam maiores conclusões a respeito deste complexo mecanismo imunológico e epidemiológico que representa a hanseníase.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier Editora, Rio de Janeiro, 5ª. Edição, 2005.
- ADAMS, L.B.; SCOLLARD, D. M.; RAY N. A.; COOPER, A. M.; FRANK, A. A.; ORME, I. M.; KRAHENBUHL J. L. The study of *Mycobacterium leprae* infection in interferon- $\gamma$  gene-disrupted mice as a model to explore the immunopathologic spectrum of leprosy. **The Journal of Infections Diseases**, v.185, 2002.
- ALCAIS, A.; MIRA, M.; CASANOVA, J.; SCHURR, E.; ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Science Direct**, v.17, p.44-48, 2005.
- ALMEIDA, E.C.; MARTINEZ, A. N.; MANIERO, V. C.; SALES, A. M.; DUPPRE, N. C.; SARNO, E.N.; SANTOS, A. R.; MORAES, M. O. Detection of mycobacterium leprae dna by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of brazilian household contacts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p.509-512, August, 2004.
- ANDERSSON, A.K.; KHANOLKAR-YOUNG, S.; JAIN, S.; SUNEETHA, L.; SUNEETHA, S.; LOCKWOOD, D. N. Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. **Infection and Immunity**, v. 73, n.06, p.3725-3733, June, 2005.
- ANTAS, P. R. Z.; SALES, J. S.; PEREIRA, K. C.; OLIVEIRA, E. B.; CUNHA, K. S.; SARNO, E. N.; SAMPAIO, E. P. Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infection. **Journal of Immunology**, v.37. n.8, p.1119-1129, 2004.
- AQUINO, D.M.C.; CALDAS, A. J.M.; SILVA, A. A. S.; COSTA, J.M.L. Perfil dos pacientes com hanseníase em área hiperendêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p.57-64, Jan-fev, 2003
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**, v. 36, n. 03, p.373-382, mai-jun, 2003.

ARAOZ R., HONORE, N.; CHO, S.; MONOT, M.; DEMANGEL, C.; BRENNAN, P.J.; COLE, S.T. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infection and Immunity**, v. 74, n.1, p.175-182, January, 2006.

BARRERA, S.; FINIASZ, M.; ILARREGUI, J.; ALEMAN, M.; OLIVARES, L.; FRANCO, M.C. NK cells modulate the cytotoxic activity generated by Mycobacterium leprae-hsp65 in leprosy patients: role of IL-18 and IL-13. **Clinical Experimental Immunology**, v.135, p. 105-113, 2004.

BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T.B.; OUKKA, M.; WEINER, H.L.; KUCHROO, V.K. Reciprocal development pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. **Nature**, v.441, may, 2006.

BEVERLEY, P.C.L. Immunology of vaccination. **British Medical Bulletin**, v.62, p. 15-28, 2002.

BRITTON W.J.; LOCKWOOD D. N. J. Leprosy. **Lance**, v.363, p.1209-1219, 2004.

DEENICK E.K.; TANGYE S.G. IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. **Immunology and Cell Biology**, v.285, p.503-505,2007.

DOCKREEL, H. M.; YOUNG, S.K.; BRITTON, K.; BRENNAN P. J.; RIVOIRE, B.; WATERS, M.F.R.; LUCAS, S.B.; SHAHID, F.; DOJKI, M.; CHIANG, T.J.; EHSAN, Q.; MCADAM, K.P.W.J.; HUSSAIN, R. Inductions of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. **American Society for Microbiology**, v.64, n.10, p.4385-4389, oct.,1996.

DUGUE, C.; PERRAUT, R.; YOUINO, P.; RENAUDINEAU y. Effects of anti-endothelial cell antibodies in leprosy and malaria. **Infection and Immunity**, v.72, n.01, p. 301-309, Jan. 2004.

EIDT, L. M. Breve História da Hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, v.13, n.2, p.76-88, mai-ago, 2004.

EVANS, H.G.; SUDDASON, T.; JACKSON, I.; TAAMS, L.S.; LORD, G.M. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of toll-like receptor-activated monocytes. **PNAS**, v.104, n.43, p.17034-17039, October, 2007.

FOSS, N.Y. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.30, p. 335-339, julho-setembro, 1997.

GELUK, A.; KLEIN, M.R.; FRANKEN, K.L.M.; MEIJGAARDEN, K.E.V.; WIELES, B.; PEREIRA, K.C.; BUHRER-SÉKULA, S.; KLATSER, P.R.; BRENNAM, P.J.; SPENCER, J.S.; WILLIAMS, P.R.; SAMPAIO, E.P; PESSOLANI M.C.V. Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. **Infection and Immunity**. V. 73, n.09, p. 5636-5644, sept., 2005.

GOULART, I .M. B.; PENNA,G .O. ; CUNHA,G .Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.4, p.365-375, jul-ago, 2002.

HERNANDEZ, M.O.; JR, I.N.; SALES, J.S.; CARVALHO, D.S. Inductions of apoptosis in monocytes by mycobacterium leprae in vitro: a possible role for tumour necrosis factor- $\alpha$ . **Immunology**, v.109, p.56-164, 2003.

LIBRATY, D.H.; AIRAN, L.E.; UYEMURA, K.; JULLIEN, D.; SPEELBERG, B.; REA, T.H. Interferon- $\gamma$  differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. **The American Society for Clinical Investigation**, v.99, n.2, p.336-341, January, 1997.

KERR-PONTES L.R.S.; BARRETO, M. L.; EVANGELISTA, C. M. N.; RODRIGUES, L. C.; HEUKELBACH, J.; FELDMIEIER, H. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. **International Journal of epidemiology**, March, 2006.

KIM j.;UYEMURA, K.; VAN DYKE, M. L. LEGASPI, A. J.; REA, T. H. ;SHAUI, K. ;MODLIN, R. L.A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. **Journal of Immunology**, v.167, n.2, p.779-786, July 2001.

KIMURA, A.; NAKA, T.; KISHIMOTO, T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. **PNAS**, v.104, n.29, p. 12099-12104, July, 2007

KISZEWSKI, C.A.; BECERRIL, E.; BAQUERA, J.; AGUILAR L. D.; HERNANDEZ, R. Expression of transforming growth factor -  $\beta$  isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. **Scandinavian journal of immunology**, v. 57, p.279-285, 2003

LISTVANNOVA, S.; TEMMERMAN, S.; STORDEUR, P.; VERSCHEURE, V.; PLACE, S.; ZHOU, L.; LOCHT, C.; MASCART, F. Optimal kinetics for quantification of antigen-induced cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by real-time PCR and by ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v.281, p.27-35, 2003.

LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy elimination a virtual phenomenon or a reality? **British Medical Journal**, v. 324, p.1516-1518, 2002.

MACFARLANE, A.; MONDRAGON-GONZALEZ, R.; VEGA-LOPEZ, F.; WIELES, B.; PENA, J.; RODRIGUEZ, O.; TORRE, R.S.; VRIES, R.R.P.; OTTENHOFF, T.H.M.; DOCKRELL, H.M. Presence of human T-cell responses to the *Mycobacterium leprae* 45-kilodalton antigen reflects infection with or exposure to *Mycobacterium leprae*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, n.3, p.604-611, May, 2001.

MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E.; QUINN D.B.; HELMS, W.S.; BULLARD, D.C.; ELSON, C.O.; HATTON, R.D.; WAHL, S.M.; SCHOEB, T.R.; WEAVER, C.T. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the Th17 lineage. **Nature**, v.441, May, 2006.

MARQUES, M.A.; MAHAPATRA, S.; SARNO, E.N.; SANTOS, S.; SPENCER, J.S.; BRENNAN, P.J.; PESSOLANI, M.C.; Further biochemical characterization of *Mycobacterium leprae* laminin-binding proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.04, p.463-470, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acompanhamento de Hanseníase no Ceará**. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe> > Acesso em: 20 ago.2007.



MOET, F.J.; PAHAN, D.; SCHURING, R .P.;OSKAM L.; RICHARDUS, J. H. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. **The Journal of Infections Disease**, v.193, p.346-353,2006.

MONOT, M.; HONORE, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPEE, J.; LACROIX, C.; SOW, S.; SPENCER, J. S.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L.; GELBER, R. On the origin of leprosy. **Science**. v.308, May, 2005.

MORAES, M. ; CARDOSO, C.C.; VANDERBORGHT, P.R.; PACHECO, A.G. Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**. v.77, p.189-202, 2006.

MONTENEGRO A. C. D.; WERNECK, G. L.; KERR-PONTES, L. R. S.; BARRETO, M. L. ;FELDMEIER, H. Spatial analysis of the distribution of leprosy in the state of ceará, northeast brazil. **Mem. Institute Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 683-686, November, 2004.

MOREIRA, A. S.; SANTOS, R. C. R.; BASTOS, R. R.; SILVA, J. V.; SANTOS, P. M. Baciloscopia da conjuntiva no diagnóstico e acompanhamento de pacientes portadores de Hanseníase. **Arquivo Brasileiro oftalmológico**, v.69, n.6, p.865-869, 2006.

MORENO, R. D. ; WOODS, W.; MORENO, N.; TRINDADE, R.; NETO, J. T.Alterações oculares na hanseníase observadas em pacientes ambulatoriais do serviço de referência da cidade de Rio Branco, Acre-Brasil. **Arquivo Brasileiro oftalmológico**, v. 66, p. 755-764, 2003.

NURIEVA, R.; YANG, X.O.; MARTINEZ, G.; ZHANG, Y.; PANOPOULOS, A. D.; SCHLUNS, K.; TIAN, Q.; WATOWICH, S.S.; JETTEN, A. M.; DONG, C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v. 448, July, 2007

OLIVEIRA, B. R.; OCHOA, M. T.; SIELING, P. A.; REA, T. H.; RAMBUKKANA, A.; SARNO, E. N.; MODLIN, R. L. Expression of Toll-like Receptor 2 on Human Schwann Cells: a mechanism of nerve Damage in Leprosy. **Infection and Immunity**, v.71, n.03, p.1427-1433, March, 2003.

PARKASH, O., KUMAR, A., NIGAM, A.; GIRDHAR B. K. Detection of antibodies against *Mycobacterium leprae* culture filtrate protein-10 in leprosy patients. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p. 1337-1341, 2006.

PEREIRA, H. L. A.; RIBEIRO, S. L. E.; CICONELLI, R. M.; FERNANDES, A. R. C. Avaliação por Imagem do comprometimento Osteoarticular e de nervos periféricos na Hanseníase. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.46, p. 30-35, 2006.

RAMADASAN, P.; DAS A.L.; PATRA A.K. Effects of BCG vaccination on evolution of leprosy. **Medical Journal of Army Forces India**, v.61, n.01, 2005.

RINALDI, A. The global campaign to eliminate leprosy. **PLoS Medicine**, v.2,n. 12, Dezembro, 2005.

REDDY, M.; EIRIKIS, E.; DAVIS, C.; DAVIS, H. M.; PRABHAKAR, U. Comparative analyses of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an *in vitro* model to monitor cellular immune function. **Journal of Immunological Methods**, v. 293, n.1-2, p.127-142, 2004.

ROMAGNANI, S. Regulation of the T cell response. **Clinical and Experimental Allergy**, v.36, p.1357-1366, 2006.

SASAKI, S.; TAKESHITA F, OKUDA K, ISHII, N. *Mycobacterium leprae* and Leprosy: A Compendium. **Microbiology and Immunology**. v.45, n.11, p.729-736, 2001.

SCOLLARD, D.M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology**, v.19, n.2, p. 338-381, April, 2006.

SECRETARIA DE SAÚDE DO CEARÁ. **Casos de hanseníase registrados em 2006**. Fortaleza, 2007. Disponível em: > <http://www.saude.ce.gov.br/clipping/modules.php> >. Acesso em: 01 set.2007.

SOUZA, C.S. Hanseníase: forma clínica e diagnóstico diferencial. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.30, p.325-334, jul/set,1997.

SPENCER, J. S.; DOCKRELL, H.M.; KIM, H.J.; MARQUES, M. A. M.; WILLIAMS, D. L.; MARTINS, M. V. S. B.; MARTINS, M. L. F.; LIMA, M. C B. S.; SARNO, E. N.; PEREIRA,

G. M. B.; MATOS, H.; FONSECA, L. S.; SAMPAIO, E. P.; OTTENHOFF, T. H. M.; GELUK, A.; CHO, S.; STOKER, N. G.; COLE, S.T.; BRENNAN P. J.; PESSOLANI, M. C.V. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. **Journal of Immunology**, v.175, p, 7930-7938, 2005.

STEFANI, M.M.A.; MARTELLI, C.M.; GILLIS, T.P.; KRAHENBUHL. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. **The Journal of Infections Diseases**, v.188, p.1024-1031,2003.

SUDHIR, K.; MATHEW, A.; CHANDRAN, G. Cranial nerve involvement in patients with leprosy neuropathy. **Department of Neurological Sciences, Christian Medical College**, Vellore, Tamil Nadu, India, v.54, ed.03, p.283-285, 2006.

TRICCAS, J.A.; ROCHE, P. W.; BRITTON, W.J. Specific Serological diagnosis of leprosy with a Recombinant *Mycobacterium leprae* Protein Purified from a rapidly growing mycobacterial host. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.08, p.2363-2365, August, 1998.

VIEIRA, L. M. M.; SAMPAIO, E. P.; NERY, J. A. C.; DUPPRE, N. C.; ALBUQUERQUE, E. C. A.; SCHEINBERG, M. A.; SARNO, E. N. Immunological status of ENL (Erythema Nodosum Leprosum) patients: Its relationship to bacterial load and levels of circulating IL-2R. **Revista do Instituto Médico tropical**, v.38, ed. 2, P.103-111, Março-abril, 1996.

VISSA, V.D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biology**, v.2, n.8, p.1023.1-1023.8, August 2001.

WENG, X., WANG, Z., KIMURA, M.; BLACK, W. C.; HUANYING, L., VISSA V.D. Identification and Distribution of *Mycobacterium leprae* Genotypes in a Region of High Leprosy Prevalence in China: a 3-Year Molecular Epidemiological Study, **American Society for Microbiology**, v.45, n.6, p. 1728–1734, June, 2007.

WHEELER, P. R. Leprosy- clues about the biochemistry of *Mycobacterium leprae* and its host-dependency from the genome. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.01-16, 2003.

WILKINSON, K. A.; KATOCH, K.; SENGUPTA, U.; SINGH, M.; SARIN, K. K.; IVANYI, J.; WILKINSON, R. J. Immune responses to recombinant proteins of *Mycobacterium leprae*. **The Journal of Infections disease society of America**, v.179, p.1034-1037, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION -WHO. **Leprosy elimination** - Microbiology of *M. leprae*. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/microbiology/en/index.html>> Acesso em: 11 Janeiro 2007.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Leprosy Situation**. Disponível em [http:// www.who.int/lep](http://www.who.int/lep) Acesso em: 23 mai. 2007.

## APENDICE I Termo de Consentimento

Universidade Federal do Ceará/UFC

Secretaria de Estado da Saúde do Ceará- SESA –CE

Termo de consentimento

Estamos convidando você a participar de uma pesquisa que será realizada no estado do Ceará, referente ao estudo da hanseníase, uma doença que ainda traz muitos problemas de saúde para nossa população. Os objetivos principais deste projeto são: estudar como ocorre a transmissão da hanseníase no estado e quais os principais fatores associados com esta transmissão. As informações colhidas por este estudo podem colaborar muito com a prevenção e controle da hanseníase em nosso estado, minorando o sofrimento que ela ainda acarreta.

A entrevista não oferecerá nenhum risco à sua saúde ou do menor sob sua responsabilidade e a colheita a partir de uma agulha na veia e um cotonete que será passado levemente no interior do nariz ou do menor sob sua responsabilidade.

Será garantido o total sigilo de todas as informações que você nos fornecer.

Em caso de dúvida, você poderá procurar pela Dra. Lígia Regina S. Kerr Pontes, responsável pela pesquisa, no telefone 85-4009 8044 ou 85-4009 8050.

Portanto, eu \_\_\_\_\_  
 declaro que compreendi o estudo e aceito participar:

Assinatura do participante da pesquisa \_\_\_\_\_

Assinatura do representante legal \_\_\_\_\_

Assinatura de quem obteve o termo de consentimento \_\_\_\_\_

Local \_\_\_\_\_ e data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

APENDICE II Ficha clínico-epidemiológica



Universidade Federal do Ceará  
Departamento de Saúde Comunitária



CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico



Secretaria de Estado da Saúde do Ceará / SESA – CE



Prefeitura de Sobral  
Secretaria Municipal de Saúde

DINÂMICA DA TRANSMISSÃO DO MYCOBACTERIUM LEPRAE NO ESTADO DO  
CEARÁ: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE FONTES DE INFECÇÃO HUMANAS  
E AMBIENTAIS EMPREGANDO TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Recusa Caso ( )  
Controle Interno ( )

Dados sócio-demográficos Idade \_\_\_ anos  
Estado Civil \_\_\_\_\_  
Estudou até que série \_\_\_\_ série  
Poderia dizer o motivo da recusa?  
\_\_\_\_\_

Família (1 a 999)	Indivíduo (1 a 99)	No. do questionário
		Caso Índice 1
		Caso Secundário 2
		Controle interno 3
		Controle externo 4
		Outro 5
Tipo de participante		TIPO____
		TIPOUT_
		_____
		Especificar _____

Entrevistador:

Data da entrevista: \_\_/\_\_/\_\_

Nome/iniciais:

Local da Entrevista:

Supervisor: Assinatura:

Data: \_\_/\_\_/\_\_

2004

1. Caracterização Sócio-econômico-demográfica				
101.	Você conhece ou conheceu alguém que tem hanseníase?	Sim	1	CONAHAN —
		Não (pule para a 108)	2	
		Não sei	-3	
102.	Se sim, quantas pessoas?	_____	_____	QTPESHA
		_____	_____	N__
		Parente (com quem convive freqüentemente)	1	QUEMHAN
		_____	2	—
		Parente (com quem tem pouca convivência)	3	_____
		_____	4	QUEMESP
		Vizinho	5	—
103.	Se sim, quem era? (Especificar)	Amigo	6	_____
		Conhecido	-8	_____
		Colega de trabalho	_____	_____
		Outro	_____	_____
		_____	_____	_____
104.	Essa pessoa vivia ou ainda vive com você na mesma casa?	Sim	1	COMVIVE
		Não	2	
		Não respondeu	-9	
105.	Quanto tempo você viveu com alguém que tinha hanseníase?	_____	_____	QUVIVHA
		_____	_____	N__

---

 1 Caracterização Sócio-econômico-demográfica
 

---

106.	Com quantas pessoas com hanseníase você vive ou viveu?	_____ pessoas	QUANPES _____
		Dormia na mesma cama/rede 1. Sim 2. Não	CONTDOR M_
		Dormia no mesmo quarto 1. Sim 2. Não	CONTQUA R_
		Dormia em quartos separados 1. Sim 2. Não	CONTQSE P_
		Usavam as mesmas roupas 1. Sim 2. Não	CONTRou P_
107.	Que tipo de contato você tinha com esta(s) pessoa(s)? 1. Sim 2. Não	Usavam a mesma toalha de banho 1. Sim 2. Não	CONTOAL H_
		Cuidava dela (banho, alimento) 1. Sim 2. Não	CONTCUI D_
		Namorava 1. Sim 2. Não	CONTNAM O_
		Trabalhava junto 1. Sim 2. Não	CONTRRA B_
		Outro contato 1. Sim 2. Não	CONTOU R_
		Especificar_	CONTE SP_
108.	Qual sua idade?	_____ anos	IDADE____
109.	Qual sexo?	Masculino 1 Feminino 2	SEXO____
110.	Cor da pele	Branca 1 Parda 2 Negra 3 Amarela 4 Outra (especificar) -8	COR____ COROU _____

---



---

 1. Caracterização Sócio-econômico-demográfica
 

---

		Solteiro	1	
		Casado	2	
		Junto/amigado	3	ESTCIV__
111.	Qual seu estado civil?	Divorciado	4	
		Desquitado/separado	5	-
		Viúvo	6	
		Não respondeu	-9	
		Católica	1	
		Protestante	2	RELCRI__
		Pentecostal	3	
		Espírita	4	-
112.	Qual a sua religião?	Umbanda, candomblé, batuque	5	
		Judaica	6	
		Nenhuma	7	OUTRECR I__
		Outra	-7	
		(especificar)		
		Não sabe	-3	

---

		Não freqüentei a escola	1	GRINSTR_
		Primeiro grau incompleto	2	_____
		Primeiro grau completo	3	
113.	Você estudou até que série?	Segundo grau incompleto	4	
		Segundo grau completo	5	
		Superior	6	
		Pós-graduação	7	
		Não respondeu	-9	

---

---

 1. Caracterização Sócio-econômico-demográfica
 

---

		Empregado	1	
		Desempregado	2	
		Autônomo, trabalha por conta própria	3	
		Empregador	4	
		Profissional universitário autônomo	5	FUNCAO__
114.	No momento você está:	Dono de negócio familiar (não tem empregados)	6	ESPFUNCA_
		Fazendo bicos	-8	_
		Outro_____		
		(especifique)	-3	
		Não sabe informar	-9	
		Não quer informar		
		Indústria	1	
		Comércio	2	
		Prestação de serviço	3	
115.	Qual é a atividade principal de seu trabalho?	Agropecuária	4	SETECN_
		Construção civil	5	
		Serviço Público	6	
		Não sabe informar	-3	
		Não quer informar	-9	
		Sem rendimento	1	
		Menos de um salário mínimo	2	
		Um a menos de quatro salários mínimos	3	
		Quatro a menos de oito salários mínimos	4	
116.	Em qual dessas faixas de renda a sua família se enquadra? (SM=R\$260,00)	Oito a menos de doze salários mínimos	5	RENFAM_
		Doze salários mínimos ou mais	6	
		Não sei	-3	
		Não respondeu	-9	
		Maior	1	RENDA10__
		Igual	2	
		Menor	3	
117.	Sua renda, há cerca de 10 anos era:	Não sabe	-3	
		Não respondeu	-9	

---



---

 1. Caracterização Sócio-econômico-demográfica
 

---

120.	Você sempre teve comida suficiente para a família?	Sim	1	COMIDAS U__
		Não	2	
		Não sei	-3	
		Não respondeu	-9	
121.	Você já passou por grandes dificuldades financeiras durante sua vida?	Sim	1	GRDIFIC_ __
		Não	2	
		Não sei	-3	
		Não respondeu	-9	
122.	Há quanto tempo mora nesta casa?	meses		TEMPCAS __

---

2. Situação Clínica (Só para casos, pule para 301, se controle)

CÓDIGOS/CATEGORIAS

	Indeterminada	1	
	Tuberculóide	2	
	Virshoviana	3	
201. Classificação clínica	Dimorfa BT	4	CLASSCL
	Dimorfa BB	5	—
	Dimorfa BL	6	
	Neural Pura	7	
	Ignorada	-9	
202. Classificação Operacional	Paucibacilar	1	CLASSOP
	Multibacilar	2	
	Ignorado	-9	—
	Única	1	NLESOES
203. Número de lesões	Duas a cinco	2	
	Mais que cinco	3	—
204. Localização			LOCA
	Nenhum problema com os olhos devido à hanseníase		OENENH
	Diminuição ou perda da sensibilidade Lagofalmo e/ou ectrópio		— OESENS_
	Triquíase		— OELAGO
	Opacidade corneana central		F__
205. Grau de incapacidade no Olho D	Acuidade visual < 0,1 ou não conta dedos a 6 m		OETRIQU
1. ( ) Presença 0. ( ) Ausência			— OEO PAC — OEA CUI_

---

 2. Situação Clínica (Só para casos, pule para 301, se controle)
 

---

206.	Grau de incapacidade no Olho E 1. ( ) Presença 0. ( ) Ausência	Nenhum problema com os olhos devido à hanseníase	ODNENH
		Diminuição ou perda da sensibilidade	ODSENS
		Lagofalmo e/ou ectrópio	ODLAGO
		Triquíase	F__ODTRIQU
		Opacidade corneana central	ODOPAC
207.	Grau de incapacidade no na mão D 1. ( ) Presença 0. ( ) Ausência	Acuidade visual < 0,1 ou não conta dedos a 6 m	ODACUI_
		Nenhum problema com as mãos devido à hanseníase	MDNENH
		Diminuição ou perda da sensibilidade	MDSSENS
		Lesões tróficas e/ou lesões traumáticas	MDTROF
		Garras	MDGARR
208.	Grau de incapacidade no na mão E 1. ( ) Presença 0. ( ) Ausência	Reabsorção	A__MDREAB
		Mão caída	MDCAIDA
		Nenhum problema com as mãos devido à hanseníase	MENENH
		Diminuição ou perda da sensibilidade	MESENS
		Lesões tróficas e/ou lesões traumáticas	METROF
		Garras	MEGARR
		Reabsorção	A__MEREAB
		Mão caída	MECAIDA

---

## 2. Situação Clínica (Só para casos, pule para 301, se controle)

		Nenhum problema com as mãos devido à hanseníase	PDNENH
		Diminuição ou perda da sensibilidade	PDSSENS_
		Lesões tróficas e/ou lesões traumáticas	PDTROF_
		Garras	PDGARR
		Reabsorção	PDREAB_
		Pé caído	PDCAIDO
		Contratura do tornozelo	PDCONT R_
209.	Grau de incapacidade no pé D 1.( ) Presença 0.( ) Ausência		
		Nenhum problema com as mãos devido à hanseníase	PENENH_
		Diminuição ou perda da sensibilidade	PDSSENS_
		Lagofalmo tróficas e/ou lesões traumáticas	PDTROF_
		Garras	PDGARR
		Reabsorção	PDREAB_
		Pé caído	PDCAIDO
		Contratura do tornozelo	PDCONT R_
210.	Grau de incapacidade no pé E 1.( ) Presença 0.( ) Ausência		
211.	Data do diagnóstico	___/___/___	___/___/___
212.	Modo de detecção do caso	Encaminhamento 1 Demanda espontânea 2 Exame de coletividade 3 Exame de contratos 4 Outros modos 8 Ignorado -9	MODOEN C_
213.	Baciloscopia	Índice Baciloscópico Médio ___	1 INBACILM 2 ___ 3 ___ 9

---

 2. Situação Clínica (Só para casos, pule para 301, se controle)
 

---

		Sim	1	
214.	Já iniciou medicação?	Não (Pule para 217)	2	INICMEDI
		Não sabe (Pule para 217)	-3	C__
		Não respondeu (Pule para 217)	-9	
215.	Data do início da medicação			___/___/___
				___
		PQT/PB/6doses	1	
216.	Esquema terapêutico	PQT/MB/12 doses	2	ESQTER
		PQT/MB/24 doses	3	AP__
		Outro	-8	
		Não apresentou	1	
217.	Reação	Reação Reversa	2	REACAO
		Neurite	3	___
		Histopatologia	Sim	Não
			NR	
		Indeterminada	1	2
		Tuberculóide	1	2
		Borderline Tuberculóide		1
				2
				3
218.	Exame confirmatório para MH?	Borderline borderline	1	2
		Borderline lepromatosa		1
				2
				3
		Lepromatosa	1	2
				3
				HITIND__
				HITTB__
				HISTBT__
				HISTBB__
				HISTBL__
				HISTLL__
				___
219.	PCR	Positivo	1	
		Negativo	2	PCR__
		Não realizado	-9	
220.	ELISA	Positivo	1	
		Negativo	2	ELISA__
		Não realizado	-9	

---

 PESO\_\_

 221. Qual o seu peso?
 

---



---

2. Situação Clínica (Só para casos, pule para 301, se controle)

---

			INIPROP_
			INICEST_
		Iniciativa própria	ENC SER
		Iniciativa própria por causas estéticas	SA__
		Encaminhamento do serviço de saúde	ENCAGE
		Encaminhamento do agente comunitário de saúde	N__
		Sugestão de pessoas próximas	SUGPES
		Incentivado por campanhas na televisão	SO__
		Incentivado por campanhas no rádio	INCCATV
		Incentivado por propaganda através de cartaz, folder, etc	INCCARA
		Outros _	D__
			INCPRFO
			L__
			OUTPRO
			C__
222.	O que levou você a procurar o atendimento no serviço de hanseníase? Responda: 1. Sim 2. Não 3. Não sei		
223.	Quanto tempo se passou desde a sua decisão de procurar o atendimento até o momento atual?	_____ dias/ meses/ anos	QTEMAT EN__

---

3. Análise dos Hábitos			
301.	Quantos dormem no mesmo cômodo que você?	Atualmente, ___ pessoas	DORMEC A__
302.	E 10 anos atrás?	10 anos atrás, ___ pessoas	DORMEC 10__
303.	Onde você costuma dormir?	Rede 1 Cama 2 Colchão no chão 3 Outra -8	DORMEA __
304.	Onde você dormia há 10 anos atrás?	Rede 1 Cama 2 Colchão no chão 3 Outra -8	DORME1 0__
305.	Você costuma receber visitas para dormir em sua casa?	Sim 1 Não 2 Apenas há 10 anos atrás 3 Atualmente e há 10 anos atrás 4	VISITAS_ __
306.	Outras pessoas da casa usam a mesma cama ou mesma rede que você para dormir ou descansar?	Sim 1 Não 2 Não sei -3	CAMARE DE__
307.	Você costuma dormir ou descansar em redes ou camas usadas por outras pessoas?	Sim 1 Não 2 Não sei -3	RREDEO UTPE__
308.	Freqüência com que são lavados lençóis ou a rede onde você dorme:	Menos de 1X/mês 1 1X/mês 2 1X/15dias 3 1X/semana 4 diariamente 5 outra -8	LAVADO RM__ ESPLAV_ _____ _____
		(especificar)	

---

 3. Análise dos Hábitos
 

---

		Nenhuma	1	
		1 a 2 vezes	2	
		2 a 5 vezes	3	
309.	Quantas vezes, mais ou menos, você lava as mãos ao dia?	5 a 10 vezes	4	VESLAVM AO_
		Mais de 10 vezes	5	
		Não sei	-8	
		Não respondeu	-9	
	Você costuma lavar as	Sempre	1	
310.	mãos depois que vai ao banheiro?	Às vezes	2	LAVMABA N__
		Nunca	3	
		Não respondeu	-9	
		Só com água	1	
311.	Com que você lava mãos?	Com água e sabonete, sabão ou detergente	2	CLAVMA O__
		Desinfetante	3	
		Outro (Especificar)	-8	
			1	
312.	Você toma banho diariamente?	Sim	2	BANHDIA _
		Não	-9	
		Não respondeu	-9	
		Só água	1	
313.	Se sim, o que você usa?	Água e Sabonete ou sabão	2	BANHUS A__
		Às vezes só água, às vezes sabonete/sabão	3	
		Não respondeu	-9	
				MAGA__
	De onde vem a água de uso	Rede pública	1	VEMAGA
314.	geral (tomar banho/lavar louça) da sua casa?	Poço profundo	2	
		Cacimba	3	
		Rio	4	
		Açude	5	
		Chafariz	6	
		Lagoa	7	
		Outra	-8	

---

---

 3-Análise dos Hábitos
 

---

	Rede pública	1	
	Poço profundo	2	VEMAG10
	Cacimba	3	
315. E 10 anos atrás?	Rio	4	—
	Açude	5	VEMAG10
	Chafariz	6	OU_____
	Lagoa	7	_____
	Outra	-8	_____
	Rede pública	1	AGBEBE
	Poço profundo	2	
	Cacimba	3	A___
316. De onde vem a água para beber da sua casa?	Rio	4	AGBEBE
	Açude	5	
	Chafariz	6	AOU_____
	Lagoa	7	_____
	Outra	-8	_____
	Rede pública	1	
	Poço profundo	2	AGBEBE1
	Cacimba	3	
317. E 10 anos atrás?	Rio	4	0__
	Açude	5	AGBEBE1
	Chafariz	6	0OU_____
	Lagoa	7	_____
	Outra	-8	_____
	Coada	1	TRATA__
	Filtrada	2	
	Fervida	3	—
318. Por qual tratamento passa a água de beber?	Usa hipoclorito	4	ESPTRAT
	Não trata	5	A_____
	Não sabe	-3	_____
	Outro	-8	_____
	Coada	1	TRAT10_
	Filtrada	2	
	Fervida	3	—
319. E 10 anos atrás?	Usa hipoclorito	4	ESPTRAT
	Não trata	5	10_____
	Não sabe	-3	_____
	Outro	-8	_____

---

## 3-Análise dos Hábitos

		Nunca	1	
		Quase diariamente	2	
320	Você tem costume de tomar banho em AÇUDES ou LAGOAS?	Algumas vezes/semana	3	BANAC__
		Algumas vezes por mês	4	
		Algumas vezes no ano	5	-
		Raramente	6	
		Outra	-8	
321	Se sim, qual o motivo?	Lazer/diversão	1	
		Higiene	2	MOBANA
		Trabalho	3	C__
		Outro	-8	
		Nunca	1	
		Quase diariamente	2	
322	E 10 anos atrás?	Algumas vezes/semana	3	BANAC10
		Algumas vezes por mês	4	
		Algumas vezes no ano	5	—
		Raramente	6	
		Outra	-8	
		Lazer/diversão	1	
323	Se sim, qual o motivo?	Higiene	2	MOBANA
		Trabalho	3	C10_
		Outro	-8	
		Nunca	1	
		Quase diariamente	2	
324	Você tem costume de tomar banho em CANAL DE IRRIGAÇÃO, RIO, RIACHO OU CÓRREGO?	Algumas vezes/semana	3	BABRI__
		Algumas vezes por mês	4	
		Algumas vezes no ano	5	
		Raramente	6	
		Outra	-8	
		Lazer/diversão	1	
325	Se sim, qual o motivo?	Higiene	2	MOBABRI
		Trabalho	3	—
		Outro	-8	
		Nunca	1	BABRI10_
		Quase diariamente	2	
		Algumas vezes/semana	3	
		Algumas vezes por mês	4	
326	E 10 anos atrás?	Algumas vezes no ano	5	
		Raramente	6	
		Outra	-8	

## 3-Análise dos Hábitos

327	Se sim, qual o motivo?	Lazer/diversão	1	
		Higiene	2	MOBABRI
		Trabalho	3	10_
		Outro	-8	
		Nunca	1	
	Você tem costume de tomar	Quase diariamente	2	
328	banho em BREJO ou	Algumas vezes/semana	3	BBREJ__
	MANGUE	Algumas vezes por mês	4	
		Algumas vezes no ano	5	-
		Raramente	6	
		Outra	-8	
		Lazer/diversão	1	
329	Se sim, qual o motivo?	Higiene	2	MOBBRE
		Trabalho	3	J_
		Outro	-8	
		Nunca	1	
		Quase diariamente	2	
330	E 10 anos atrás?	Algumas vezes/semana	3	BBREJ10
		Algumas vezes por mês	4	
		Algumas vezes no ano	5	—
		Raramente	6	
		Outra _	-8	
		Lazer/diversão	1	
331	Se sim, qual o motivo?	Higiene	2	MOBBRE
		Trabalho	3	J10_
		Outro	-8	
	Você costuma molhar	Sim	1	MOLHAR
	alguma parte do corpo (pés,	Não	2	_____
	mãos) em lagoas, açudes	Não sei	-3	
332	ou rios por algum motivo?	Não Respondeu	-9	

## 3-Análise dos Hábitos

333	Tem o hábito de andar descalço?	Sim	1	DESCAA_
		Não	2	
		Não sei	-3	—
334	E 10 anos atrás?	Sim	1	DESCA10
		Não	2	
		Não sei	-3	—
335	Você trabalha ou já trabalhou na roça?	Sim	1	TRABRO
		Não	2	C__
336	E em matas? Há quanto tempo você trabalha ou trabalhou na roça?	Sim	1	TRABMA
		Não	2	T__
		meses		TTRAB__
337	Você caça?	Nunca	1	CACAA__
		De vez em quando	2	
		Regularmente	3	-
338	E há 10 anos atrás?	Nunca	1	CACA10_
		De vez em quando	2	
		Regularmente	3	—
339	O que você caça?	Pássaros	1	
		Preá	2	QCACAA
		Tatu	3	
		Peba	4	—
		Outro	-8	
340	E há 10 anos atrás?	Pássaros	1	
		Preá	2	QCACA10
		Tatu	3	
		Peba	4	—
		Outro	-8	
341	Você já comeu tatu ou peba?	Sim	1	COMETA
		Não	2	TU__
		Não sei	-3	
342	O peba ou tatu que você come ou comeu:	Nasceu no cativeiro	1	ORIGPEB
		Era tratado em cativeiro, mas não nasceu lá	2	A__
			3	
		Era comido sem tratar	-3	
		Não sei		

---

 3-Análise dos Hábitos
 

---

				Sim	1	
343	Você já criou ou cria			Não	2	CRIAPEB
	peba ou tatu?			Não sei	-3	A___
				Não respondeu	-9	
	Você já foi arranhado			Sim	1	
344	por um peba ou um			Não	2	ARRAPEB
	tatu?			Não lembra	3	A___
				Sim	1	CRIANIM
345	Você cria algum animal?			Não	2	AL___
				Não sei	-3	
				Cachorro		CACHOR
				Gato		___
				Pássaros		GATO___
				Galinha/pato/marreco		PASSAR_
				Macaco		_
				Vaca/boi		GALPAT_
				Cavalo		_
	Se sim, qual?			Porco		MACACO
				Jumento		___
				Outro		VACABOI
346	1. Sim	2. Não	3.	Especificar		___
	Não sei					CAVALO_
						___
						PORCO_
						___
						JUMENT_
						___
						OUTANI_
						___
						ESPANIM
						___
						CRIANIM
						10
347	E 10 anos atrás?			Sim	1	
				Não	2	
				Não sei	-3	

---



## 3-Análise dos Hábitos

				Cachorro	CACHOR
				Gato	10__
				Pássaros	GATO10_
				Galinha/pato/marreco	__
				Macaco	PASSAR1
				Vaca/boi	0__
				Cavalo	GALPAT1
				Porco	0__
				Jumento	MACACO
				Outro	10__
				Especificar	VACABOI
348.	1. Sim	2. Não	3. Não sei		10_
					CAVALO1
					0__
					PORCO1
					0__
					JUMENT1
					0__
					OUTANI1
					0__
					ESPANIM
					10_
				Sim	1
				Não	2
349.	Você já tomou BCG?			Não Sei	-3
					CG_
350.	Presença de cicatriz no braço direito?			Sim	1
				Não	2
					ZBD
351.	PCR Nasal			Positivo	1
				Negativo	2
				Não realizado	3
				Ignorado	-9
352.	Elisa			Positivo	1
				Negativo	2
				Não realizado	3
				Ignorado	-9

## ANEXO I Reagentes utilizados para cultura de células e etapas do ensaio de ELISA

## Reagentes para cultura de células:

1. Extrato antigênico de *Mycobacterium leprae*, fornecido pelo Prof. Brennam do Mycobacteria Research Laboratories, Colorado State University.
  - A partir do extrato puro de *M. leprae*, foram preparadas, sob condições estéreis, alíquotas 10x concentradas (200 µg/ml) e mantidas a -20° C até o momento do uso, utilizando como diluente o PBS 0,01M, pH7,2 (preparado em água destilada estéril).
2. Fitohemaglutinina 10µg/ml (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA).
  - A partir da concentração fornecida pelo fabricante, são preparadas, sob condições estéreis, alíquotas 10x concentradas (100 µg/ml) e mantidas a -20° C até o momento do uso, utilizando como diluente o PBS 0,01M, pH7,2 (preparado em água destilada estéril).
3. Solução de Hank's (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA).
  - A partir da solução estoque 10x concentrada, foi realizada, sob condições estéreis, a diluição do pó com água esterilizada (conforme instruções do fabricante), e a solução mantida a temperatura de 2 a 8° C até o momento do uso, devendo ser consumida no máximo em 24 horas.
4. Meio RPMI-1640 contendo HEPES e bicarbonato de sódio 2 g/l (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA).
  - A solução estéril, pronta para uso, se armazenada à temperatura de 2 a 8° C, pode ser consumida até um limite máximo de 5 dias. Se armazenada a -20°C, pode ser estocada por maior tempo (verificar esterilidade após o descongelamento).
5. L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml), gentamicina (50 µg/ml)- Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA).
  - As soluções contendo os antibióticos são preparadas, esterilizadas em filtro de 0,22 µm, e mantidas 10x concentradas -20° C até o momento do uso.
  - Após a adição dos antibióticos ao meio de cultura, em condições estéreis, a solução é filtrada em filtro de 0,22 µm, e sua vida útil é de 5 dias à temperatura de 2 a 8°C.
6. Solução de azul de Trypan 1% (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA).
  - Preparada a partir da solução estoque, utilizando como diluente o PBS 0,01M pH 7,2, e armazenada a temperatura ambiente.
7. Placas para culturas de células de 96 poços estéreis (Nunc, EUA).

Dosagem do IFN- $\gamma$  por ELISA (conforme descrição do fabricante):

“Kit” para dosagem de interferon-gama humano por ELISA Ready-SET-Go, eBioscience (Número do Catálogo: 88-7316).

O kit contém tampões, reagentes e diluentes necessários para realização do ELISA quantitativa, e foi especificamente desenvolvido para mensurações precisas de IFN- $\gamma$  humano em amostras de soro, plasma e sobrenadantes de culturas de células.

As alíquotas das Soluções Padrões de 20  $\mu$ l por frasco devem permanecer congeladas a -80° C até o momento do uso. Os demais reagentes devem devem devem ser armazenados a 4°C.

No primeiro passo da reação, a placa de 96 poços, foi sensibilizada com 100  $\mu$ l/cavidade do anticorpo de captura diluído em solução Tampão (*Coating Buffer*) e incubada a 4° C, por 16 a 18 horas. Em seguida, lavada três vezes com tampão PBS 0,01M, pH 7,2 (LABORCLIN, Brasil Ltda). No final da lavagem, a placa é invertida, e um papel absorvente é usado para remoção do tampão residual. Após esta etapa, foram adicionados, em cada poço, 200  $\mu$ l de solução bloqueadora (fornecida pelo fabricante), sendo a placa incubada durante 1 hora a temperatura ambiente (T.A.), e posteriormente, lavada como na etapa anterior.

As soluções-padrão (diluídas de segundo o fabricante) e as amostras foram pipetadas num volume de 100  $\mu$ l e incubadas por duas horas; em seguida, lavadas 5X com tampão PBS e adicionado 100  $\mu$ l do anticorpo de detecção. Após um período de incubação de 60 min./T.A., a placa foi lavada novamente com PBS; e posteriormente, acrescentado 100  $\mu$ l/cavidade de avidina-HRP, deixando 30 min./T.A. Na etapa seguinte de lavagem, como estabelecido pelo fabricante, foi necessário manter intervalos de 01 a 02 minutos antes de aspirar o PBS das cavidades; repetindo este procedimento por sete vezes. Ao término desta lavagem, foram adicionados 100  $\mu$ l da solução do substrato em cada cavidade, incubada por mais 15 min./T.A, e acrescentado a solução de bloqueio da reação. A leitura da placa (Leitora - Amersham-Biosciences, EUA) foi realizada num comprimento de onda de 450 nm, e os valores calculados descontando os valores dos poços apenas com diluente (branco). Os cálculos de

concentração de IFN- $\gamma$  são baseados na curva-padrão obtida com os valores dos soros-padrão, cuja concentração mínima é 4 pg/ml e a máxima de 500 pg/ml.

## ANEXO II Controle de Qualidade da cultura de células mononucleares do sangue periférico

### Reagentes:

1. Utilizar água deionizada estéril para o preparo de diluições requeridas no ensaio.
2. Ponteiros e pipetas devem ser novas e estéreis.
3. Antes de processarem as amostras, verificar a integridade do tubo de polipropileno, presença de coágulo, hemólise, fibrina e volume.
4. De acordo com a listagem dos casos e/ou contactantes, verificar a numeração, data e iniciais do nome identificado em cada tubo.
5. Após estas inspeções iniciais, processar as amostras imediatamente para obtenção de células mononucleares.
6. Realizar a pesquisa microbiológica nos reagentes utilizados na rotina de cultura de células:
  - Coletar 10 µl dos Meios RPMI, Ficoll-Hypaque, Solução de Hank's e do Meio PBMC, em seguida, pipetá-los em um meio de enriquecimento bacteriano e incubá-los por um período de 18 a 24 h a 37°C.
  - Após este tempo de incubação, semear as alíquotas em placas de ágar sangue, deixando-as incubadas por um mesmo período.
  - Em caso de crescimento bacteriano em quaisquer meios e reagentes pesquisados, interromper a incubação das PBMC, desprezar o meio contaminado e solicitar, se possível, nova coleta da amostra.

### Amostras:

- Observar a existência de proliferação celular em microscópio de luz invertida, com 24 e 120 horas.
- Observar a mudança de coloração do indicador de pH (vermelho fenol) presente no meio.

### Estufa de CO<sub>2</sub>:

1. Antes do uso, autoclavar as prateleiras da estufa, remover a umidade interna e lavar com água destilada e sabão. Após a lavagem, utilizando uma gaze estéril, retirar o excesso de água, e em seguida, descontaminar com solução álcool 70%.
2. Nunca utilizar água deionizada devido à reatividade com componentes de metais da estufa.

ANEXO III Informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos casos índices e respectivos contactantes.

COD.	Idade	Sexo	Consaguinidade	Cicatriz	Média IFN- $\gamma$ (pg/ml)	Classificação Clínica
1.1	27	M		Não	< 4	Dimorfa virchoviana
1.2	58	M	sim	Não	104,1	
1.3	54	F	sim	Não	53,0	
2.1	29	F		Não	74,3	Indeterminada
2-2	33	M	não	Sim	< 4	
2-3	26	M	sim	Sim	41,6	
3.1	17	M		Não	107,9	Tuberculóide
3.2	41	M	sim	Sim	61,1	
3.3	40	F	sim	Sim	< 4	
4.1	17	F		sim	195,4	Indeterminada
4.2	79	M	sim	sim	119,5	
4.3	36	F	sim	sim	< 4	
5.1	17	F		Não	4	Indeterminada
5.2	32	F	sim	Não	55,5	
5.3	34	F	sim	Sim	< 4	
6.1	23	M		Sim	< 4	Indeterminada
6.2	51	M	sim	Sim	173,8	
6.3	23	F	não	Sim	< 4	
7.1	84	M		Não	98,9	Dimorfa Tuberculóide
7.2	46	M	não	Sim	80,6	
7.3	44	F	não	Sim	38,4	
8.1	23	M		Sim	< 4	Tubercullóide
8.2	22	F	não	Sim	< 4	
8.3	42	M	Sim	Sim	79,6	
9.1	63	M		Sim	< 4	Virchoviana
9.2	29	F	não	Sim	38,3	
9.3	31	F	sim	sim	65,8	
10.1	33	M		Sim	200,2	Indeterminada
10.2	50	F	sim	Sim	59,3	
10.3	59	M	sim	Sim	27,2	
11.1	33	M		Sim	< 4	Indeterminada
11.2	26	F	sim	Sim	212,8	
11.3	62	F	sim	Não	< 4	

ANEXO III Informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos casos índices e respectivos contactantes (continuação).

COD.	Idade	Sexo	Consaguinidade	Cicatriz	Média IFN- $\gamma$ (pg/ml)	Classificação Clínica
12.1	15	F		Não	84,2	Dimorfa Tuberculóide
12.2	36	F	sim	Não	< 4	
12.3	27	F	não	sim	45,9	
13.1	70	M		Não	63,8	Tuberculóide
13.2	31	M	sim	sim	20,9	
13.3	53	F	não	sim	< 4	
14.1	36	F		Não	44,7	Tuberculóide
14.2	55	F	sim	Sim	< 4	
14.3	36	M	não	Sim	94,7	
15.1	67	M		Não	< 4	Virchoviana
15.2	72	F	não	Não	< 4	
15.3	34	M	sim	Não	77,4	
16.1	78	F		Não	< 4	Indeterminada
16.2	40	M	sim	Sim	< 4	
16.3	24	F	sim	Sim	36,1	
17.1	51	M		Não	< 4	Virchoviana
17.2	48	F	não	Sim	< 4	
17.3	24	M	sim	Sim	< 4	
18.1	28	M		Não	< 4	Indeterminada
18.2	60	F	não	sim	42,6	
18.3	62	M	sim	sim	< 4	
19.1	85	F		Não	102,1	Tuberculóide
19.2	86	F	sim	sim	43,8	
19.3	46	F	não	sim	< 4	
20.1	41	F		Não	114,1	Tuberculóide
20.2	16	F	sim	sim	< 4	
20.3	43	M	não	sim	46,2	
21.1	15	M		Sim	< 4	Tuberculóide
21.2	38	F	sim	Sim	< 4	
21.3	22	M	não	Sim	< 4	
22.1	79	M		Não	111,1	Virchoviana
22.2	68	F	não	Não	< 4	
22.3	30	M	sim	Sim	72,9	

ANEXO III Informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos casos índices e respectivos contactantes (continuação).

COD.	Idade	Sexo	Consaguinidade	Cicatriz	Média IFN- $\gamma$ (pg/ml)	Classificação Clínica
23.1	44	M		Não	< 4	Tuberculóide
23.2	45	F	não	Sim	< 4	
23.3	69	F	sim	Não	82,7	
24.1	55	M		Não	< 4	Virchoviana
24.2	19	M	sim	Não	72,6	
24.3	39	F	não	Sim	< 4	
25.1	58	M		Não	< 4	Dimorfa Virchoviana
25.2	57	F	não	Não	69,6	
25.3	17	F	sim	Não	< 4	
26.1	45	F		Não	< 4	Virchoviana
26.2	37	M	não	Sim	< 4	
26.3	82	F	não	Sim	< 4	
27.1	91	F		Não	< 4	Virchoviana
27.2	37	F	não	Não	64,9	
27.3	46	M	não	Não	160,2	
28.1	86	M		Sim	< 4	Virchoviana
28.2	85	F	não	Não	67,7	
28.3	21	F	sim	Sim	94,7	
29.1	44	M		Não	49,7	Virchoviana
29.2	36	F	não	Sim	156,1	
29.3	68	F	Sim	Não	29,9	
30.1	57	M		Sim	< 4	Virchoviana
30.2	52	F	não	Sim	42,5	
30.3	44	M	sim	Não	< 4	