



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

EMERSON RAMALHO FERREIRA

**A REVACINAÇÃO COM A BCG MODULA A PRODUÇÃO DE  
CITOCINAS FRENTE A ANTÍGENOS DO *Mycobacterium leprae*,  
EM CONTATOS MENORES DE 15 ANOS DE PACIENTES COM  
HANSENÍASE**

FORTALEZA-CE

2010

EMERSON RAMALHO FERREIRA

**A REVACINAÇÃO COM A BCG MODULA A PRODUÇÃO DE  
CITOCINAS FRENTE A ANTÍGENOS DO *Mycobacterium leprae*,  
EM CONTATOS MENORES DE 15 ANOS DE PACIENTES COM  
HANSENÍASE**

*DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA MÉDICA DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
MICROBIOLOGIA MÉDICA.*

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> LILIA MARIA CARNEIRO CÂMARA  
Orientadora  
Professora de Imunologia  
Departamento de Patologia e Medicina Legal-UFC

FORTALEZA-CE

2010

Ferreira, Emerson Ramalho.

A revacinação com a BCG modula a produção de citocinas frente aos antígenos do *Mycobacterium leprae*, em contatos menores de 15 anos de pacientes com hanseníase.

Emerson Ramalho Ferreira- Fortaleza, 2010.

**109f.**

Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza-CE, 2010.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lilia Maria Carneiro Câmara

Inclui bibliografia

1. Hanseníase, 2. BCG, 3. Citocinas I- Câmara, Lília Maria Carneiro (Orient.) II-Título

EMERSON RAMALHO FERREIRA

**A REVACINAÇÃO COM A BCG MODULA A PRODUÇÃO DE CITOCINAS  
FRENTE A ANTÍGENOS DO *Mycobacterium leprae*, EM CONTATOS  
MENORES DE 15 ANOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE**

*DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA.*

APROVADA EM: 13 de Maio de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA-UFC

---

Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira  
DEPARTAMENTO DE MICOBACTERIOSES- FIOCRUZ-RJ

---

Profa. Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ- FIOCRUZ-BA

---

Profa. Dra. Lilia Maria Carneiro Câmara (ORIENTADORA)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA-UFC

*A minha mãe, Erenita, à Família Dantas, a minha orientadora, Lilia Câmara e aos integrantes do Grupo de Extensão em Educação em saúde para prevenção da Hanseníase na grande Fortaleza da UFC.  
E, in memoriam, a Francisca Maria Imaculada de Almeida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, responsável por este trabalho, por me guiar frente a todas as dificuldades, e por colocar em minha vida todos aqueles que contribuíram com este trabalho para torná-lo realidade;

A todas as crianças e aos adolescentes que participaram deste projeto, e aos seus pais, meu muito obrigado;

A minha família, especialmente a minha mãe, Erenita, e minha madrinha, Fátima Antero, pelo apoio, motivação e compreensão nos momentos de ausência;

À professora Dra Lilia Maria Carneiro Câmara pela orientação, amizade, pela oportunidade de trabalhar na área de imunologia, por repassar um conhecimento sólido em pesquisa, sobre a importância do planejamento didático para a formação do aluno e pelas várias lições de vida;

Aos membros da família Dantas, em especial ao Sr Antônio Dantas, a Sra Zuíla Aguiar Dantas e Antônio Dantas Junior, pela confiança neste sonho;

À dedicação e ao amor à pesquisa dispensado pelos integrantes do projeto de extensão da UFC “Educação em saúde para prevenção da hanseníase”: Ana Carla Bonfim, Isadora Marques, Gizelly Castelo, Michele Maia, Lia Ricarte, Deborah Coelho, Emmilianny Reis, Isis Samya, Suelem Alves, Telma Leandro, Camila Freitas, Camila Fernandes, Cássia Fernandes, Manoel Austregésilo e Naya Castro, meu muito obrigado;

Às pesquisadoras Dra Márcia Valéria Brandão Martins e Dra Cristina Pessolani pela oportunidade de treinamento em cultura de células no laboratório da FIOCRUZ em Fortaleza, e por disponibilizarem os insumos necessários para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho, como Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, e pela aquisição dos insumos necessários ao seu término;

À pesquisadora Dra Aparecida Nagao-Dias, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC, e sua equipe, pelo apoio técnico e de insumos na sorologia para dosagem de anticorpos anti-PGL-1;

Às Profas Jânia Teixeira e Zirlane Castelo, pesquisadoras do Grupo de Leishmaniose da UFC, pela amizade, pelo apoio técnico e por possibilitarem a dosagem de IL-10;

À enfermeira Dra Maria Ferreira Sobrinho, do Centro de Dermatologia Dona Libânia, e sua equipe, por abraçar esse sonho, pelo treinamento e apoio técnico na área de imunobiológicos;

À equipe de enfermeiros do Centro de Dermatologia Dona Libânia, pelo treinamento na detecção dos pacientes com hanseníase e consulta de enfermagem aos contatos;

À Enfermeira Dra Ana Paula Arruda, pela amizade e abertura no município de Baturité;

À Secretária de Saúde do município de Baturité, Dra Maria Auxiliadora Bessa, pela abertura para formação do grupo controle deste trabalho;

Aos meus colegas mestrandos, Bruno Laranjeira, Anne Carolinne, Rafael Mendes, Jakelyne Marques e Markênia Alves, parceiros dessa árdua caminhada, obrigado amigos;

Aos meus amigos, Carla Carine de Farias, Charles Aguiar e Kelvia Lino, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência;

Ao corpo docente do Programa de pós-graduação em Microbiologia Médica;

A CAPES pelo fomento científico.

## RESUMO

Estudos em diferentes populações têm mostrado que a vacinação com a BCG concede proteção parcial contra a hanseníase. Entretanto, a necessidade da revacinação e seu impacto na resposta imune contra antígenos do *Mycobacterium leprae* é pouco compreendida, principalmente nas crianças que são contatos destes pacientes com hanseníase, e constituem uma população de risco para o adoecimento. Neste estudo, investigamos o papel da revacinação com a BCG na modulação da resposta imune em contatos menores de quinze anos de pacientes com hanseníase. Amostras de sangue periférico de vinte e cinco crianças, vacinadas com a BCG ao nascer, foram coletas antes e dois meses após a revacinação com a BCG. Suas células mononucleares (PBMC) foram estimuladas com proteínas e peptídeos do *M. leprae*, dosando-se as quantidades de IFN- $\gamma$  e IL-10 por ELISA. Anteriormente a revacinação, foram coletas amostras para dosagem de IgM e IgG anti-PGL-1 e realizado o teste tuberculínico (PPD) para avaliação da eficácia vacinal após a revacinação. Identificamos o potencial papel da BCG em estimular a produção de IFN- $\gamma$  e/ou IL-10 dependendo do antígeno e da idade do contato, sem relação com o PPD e sorologia anti-PGL-1. Estes resultados sugerem que a BCG modula a resposta imune dos contatos frente aos antígenos do *M. leprae*, com o frequente aumento nos níveis de IFN- $\gamma$ , frente ao MLT, nas crianças com idade entre 1 a 4 anos ( $4.203 \pm 539,2$  pg/mL pré-BCG x  $9.141 \pm 860,9$  pg/mL pós-BCG,  $p=0,001$ ). Já os contatos entre 5 a 9 anos mostram aumento na produção de IL-10 ( $210 \pm 39,4$  pg/mL pré-BCG x  $680 \pm 76,74$  pg/mL pós-BCG,  $p=0,001$ ) e IFN- $\gamma$  ( $4.912 \pm 1.065$  pg/mL x  $9.249 \pm 1.171$  pg/mL,  $p=0,024$ ). Estes achados são acompanhados com o aumento dos casos de hanseníase em crianças entre 5 a 9 anos na comunidade. Entretanto, nos contatos entre 10 a 15 anos a revacinação falha em induzir o aumento de IFN- $\gamma$  e IL-10. Os contatos de MB produziram, simultaneamente, altos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 em resposta ao MLT, enquanto que os contatos de PB somente produziram altos níveis de IFN- $\gamma$  após a revacinação. A produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 frente aos peptídeos sintéticos p38 e p69 indica que estes antígenos podem ser possíveis marcadores de infecção. Assim, a BCG pode ser protetora, sendo eficiente em induzir o aumento da resposta por IFN- $\gamma$  nestes contatos, frente aos antígenos do *M. leprae*.

Palavras chaves: Hanseníase, BCG, Citocinas.



## ABSTRACT

Studies in different populations have shown that vaccination with BCG provides partial protection against leprosy. However, need of boost BCG vaccination and your impact in response immune against antigens of *Mycobacterium leprae* is poorly understood, mainly in children who are contacts of these patients with leprosy, and constitute population of risk for illness. This study, we investigated the paper a second dose of BCG given to contacts of leprosy patients under the age of fifteen years in modulate the response imune. Blood samples of twenty five children, who received a first dose of BCG at birth, were collected immediately before and two months after BCG revaccination. Your peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by proteins and peptides of *M. leprae*, were measured IFN- $\gamma$  and IL-10 by an ELISA assay. Before revaccination the serum anti-PGL1 IgG and IgM isotypes were measured by ELISA assays performed with native PGL1- coated microplates, and PPD-skin reaction was measured 2 to 3 months after revaccination. The study was approved by the local Ethic Committee, number 006-08, May 7th, 2008. BCG revaccination can induces IFN-gamma and/or IL-10 production related to antigen and age, but did not correlated with PPD-skin reaction or anti-PGL1 levels. The PBMC's production of IFN-gamma against MLT (total *M. leprae* antigen) after BCG was higher on children under 4 years old (N= 8, 4203,0  $\pm$  539,2 pg/mL before BCG x 9141,0  $\pm$  860,9 pg/mL after BCG, p=0,015, Mann-Whitney's test). Children between 5 and 9 years old showed an increase either of IFN-gama levels (N=11, 4912  $\pm$  1065 pg/mL x 9249,0  $\pm$  1171 pg/mL, p=0,024, Mann-Whitney's test) or IL-10 levels (N=11, 210,6  $\pm$  39,4 pg/mL x 680,3  $\pm$  76,74 pg/mL, p=0, 0,001, Mann-Whitney's test). However children between 10 and 15 years old failed to increase the cytokines levels after BCG booster. Contacts of multibacillary patients produced higher IFN-gamma levels (N= 13, 4536,0  $\pm$  543,1 pg/mL x 9263,0  $\pm$  989,0 pg/mL, p=0,0012, Mann-Whitney's test) and IL-10 levels (N= 13, 235,9  $\pm$  46,5 pg/mL x 743,5  $\pm$  87,8, p=0,0012, Mann-Whitney's test) against MLT after BCG, but only IFN-gamma levels (N=12, 4975,0  $\pm$  995,8 pg/mL x 8126,0  $\pm$  788,6, p=0,0342, Mann-Whitney's test) increased after BCG on contacts of paucibacillary patients. The production of IFN-gamma and IL-10 against two synthetic peptides (p38 and p67), before and after BCG vaccine, were similar as seen with MLT antigen, but the absence of cytokine production against p69 help to identify this peptide as a effective diagnostic marker.

Says key: Leprosy, BCG, Cytokine

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Possível disseminação da hanseníase segundo os marcos teóricos da migração populacional durante os séculos e estudos do polimorfismo dos genes do <i>M. leprae</i> .	19
Figura 2. Detecção global de novos casos de hanseníase pela OMS no período de 1985 a 2006.	20
Figura 3. Evolução dos coeficientes de prevalência e detecção no Brasil, no período de 1994 a 2007.	23
Figura 4. Endemicidade da hanseníase, por município, no estado Ceará.	26
Figura 5. Coeficiente de detecção de novos casos em Fortaleza em maiores (linha azul) e menores de 15 anos (linha vermelha), no período de 1995 a 2007.	28
Figura 6. Modelo esquemático da parede celular do <i>M. leprae</i> .	30
Figura 7. Relação entre as classificações de Madri, Ridley & Joppling e operacional da OMS.	34
Figura 8. Modelo esquemático da resposta imune celular a micobactérias.	38
Figura 9. Modelo esquemático da resposta imune humoral contra o <i>M. leprae</i> .	39
Figura 10. Interrelação entre as classificações de Ridley & Joppling e da OMS, com a sorologia anti-PGL-1 e índice baciloscópico (IB).	43
Figura 11. Fluxograma da obtenção das amostras para ensaio de cultivo celular e ensaio sorológico de 25 contatos menores de 15 anos de pacientes com hanseníase.	54
Figura 12. Distribuição da casuística por bairros do município de Fortaleza e região metropolitana.	61
Figura 13. Produção de IFN- $\gamma$ pelos contatos de pacientes com hanseníase frente ao mitógeno e às proteínas do <i>M. leprae</i> , antes (pré-BCG) e após (pós-BCG) a revacinação com BCG.	66
Figura 14. Produção de IFN- $\gamma$ pelos contatos de pacientes com hanseníase frente aos peptídeos derivados do <i>M. leprae</i> , antes (pré-BCG) a após (pós-BCG) a revacinação	67

com a BCG.

- Figura 15. Produção de IL-10 pelos contatos de pacientes com hanseníase frente ao mitógeno e às proteínas do *M. leprae*, antes (pré-BCG) a após (pós-BCG) a revacinação com a BCG. 68
- Figura 16. Produção de IL-10 pelos contatos de pacientes com hanseníase frente aos peptídeos derivados do *M. leprae*, antes (pré-BCG) a após (pós-BCG) a revacinação com a BCG. 69
- Figura 17. Produção de IFN- $\gamma$ , dos contatos de pacientes, pré-BCG e pós-BCG, frente ao MLT nas diversas faixas etárias. 71
- Figura 18. Produção de IL-10, dos contatos de pacientes, pré-BCG e pós-BCG, frente ao MLT nas diversas faixas etárias. 71
- Figura 19. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 frente ao MLT dos contatos de pacientes, agrupados de acordo com a forma clínica do caso índice, MB-multibacilar e PB-paucibacilar, no pré-BCG e pós-BCG. 72
- Figura 20. Produção de IFN- $\gamma$ /IL-10 pelos contatos reatores (R) e não reatores (NR) ao PPD, frente ao MLT, antes (pré-BCG) e após (pós-BCG) a revacinação com a BCG. 73
- Figura 21. Análise da correlação entre os valores de IFN- $\gamma$ /IL-10 frente ao estímulo com o MLSA e com o MLT, pré-BCG. 74
- Figura 22. Análise da correlação entre os valores de IFN- $\gamma$ /IL-10 frente ao MLSA e com o MLT, pós-BCG. 75
- Figura 23. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 pelos contatos com a sorologia positiva para IgM anti-PGL-1 (IgM POS) e sorologia negativa (IgM NEG) frente ao MLT, pré-BCG e pós-BCG. 76

## LISTA DE TABELAS

	pág
Tabela 1. Evolução do coeficiente de detecção de casos novos no período de 2001 a 2007.	24
Tabela 2. Descrição das variáveis dos 25 contatos de pacientes com hanseníase conforme inquérito epidemiológico.	60
Tabela 3. Análise da resposta ao teste tuberculínico (PPD) e as variáveis idade, sexo e forma clínica do caso-índice de 47 contatos de pacientes com hanseníase.	63
Tabela 4. Análise da produção de citocinas de 25 contatos, pareados, antes da BCG (pré-BCG) e após a revacinação com a BCG (pós-BCG) frente aos mitógeno (SEB) e frente aos extratos protéicos derivados do <i>M. leprae</i> (MLT, MLSA e MLCwa).	65
Tabela 5. Análise dos níveis de IFN- $\gamma$ e IL-10 dos contatos, pareados, pré-BCG e pós-BCG, frente aos peptídeos p38, p67 e p69.	67
Tabela 6. Análise dos níveis de IFN- $\gamma$ e IL-10, frente ao estímulo com MLT dos contatos de pacientes com hanseníase de acordo com a faixa etária, classificação do caso índice e reação ao PPD, pré-BCG e pós-BCG.	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-PGL-1 Anticorpo específico contra o *Mycobacterium leprae*

APC – célula apresentadora de antígeno

BSA – soroalbumina bovina

CID- Classificação Internacional das doenças

CMSP/PBMC's- Células mononucleares do sangue periférico

DD- Dimorfo Dimorfo

DV- Dimorfo Virchowiano

DT - Dimorfo Tuberculóide

ELISA- Ensaio imunoenzimático ligado a enzima

I- Indeterminado

IB- Índice baciloscópico

IDH- Índice de Desenvolvimento Humano

IL-10- Interleucina 10

IL-12- Interleucina 12

IL-2- Interleucina 2

IFN- $\gamma$ - Interferon gama

MBL- Lectina ligante de manose

MLCwa- fração protéica derivada da parede celular do *M. leprae*

MLSA- fração protéica solúvel do *M. leprae*

MLT- fração protéica derivada do *M. leprae* total sonificado

*M. leprae*- *Mycobacterium leprae*

MS- Ministério da Saúde do Brasil

OMS- Organização Mundial de Saúde

P38- peptídeo derivado da fração protéica ML0008c do *M. leprae*

P67- peptídeo derivado da fração protéica ML1419c do *M. leprae*

P69- peptídeo derivado da fração protéica ML1419c do *M. leprae*

PBS – salina tamponada com fosfato

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PGL-1- Glicolípídeo fenólico 1

Pós-BCG – após a revacinação com a vacina BCG

Pré-BCG – antes da revacinação com a vacina BCG

PSF- Programa Saúde da Família

RNAm- Ácido ribonucleico mensageiro

SNP - Single Nucleotidic Polimorfism- Polimorfismo de um único nucleotídeo

TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral alfa

TT - Tuberculóide

VV- Virchowiano-Virchowiano

## SUMÁRIO

	pág
1. Introdução.	16
1.1. A origem da doença: A hanseníase através dos marcos históricos da humanidade.	16
1.1.1. Contribuição dos estudos moleculares no mapeamento da migração da hanseníase.	18
1.2. Epidemiologia da hanseníase.	19
1.2.1. Situação mundial da hanseníase.	19
1.2.2. Epidemiologia da hanseníase no Brasil.	23
1.2.3. Situação epidemiológica da hanseníase no Ceará.	25
1.2.4. Epidemiologia da hanseníase em Fortaleza.	27
1.3. Biologia do <i>Mycobacterium leprae</i> .	29
1.4. Mecanismos de transmissão e virulência do <i>M. leprae</i> .	31
1.5. Diagnóstico clínico e as classificações da hanseníase.	32
1.6. A resposta imunológica na infecção pelo <i>M. leprae</i> .	34
1.6.1. Os mecanismos da resposta imune inata na infecção pelo <i>M. leprae</i> .	34
1.6.2. A formação da resposta imune adaptativa contra o <i>M. leprae</i> e as formas clínicas polares da doença.	36
1.7. Estratégias para o controle e prevenção da hanseníase.	40
1.7.1. Os testes diagnósticos disponíveis para a hanseníase.	40
1.7.1.1. Teste de Mitsuda.	40
1.7.1.2. Baciloscopia.	41
1.7.1.3. Histopatológico.	42
1.7.1.4. Sorologia.	42
1.7.1.5. Testes baseados na estimulação de células T in vitro com proteínas e peptídeos do <i>M. leprae</i> .	45
1.7.1.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	46
1.7.2. Medidas de promoção e prevenção na hanseníase.	47
1.7.2.1. A proteção conferida pela administração da vacina BCG nos contatos dos pacientes com hanseníase.	47
2. Pergunta de partida.	51
3. Hipóteses.	51
4. Objetivos.	52
5. Materiais e métodos.	53
5.1. Tipo de estudo e casuística.	53

5.2. Delineamento experimental.	54
5.3. Aspectos éticos.	55
5.4. Administração da 2ª dose da BCG.	55
5.5. Visita domiciliária e administração do PPD RT 23.	55
5.6. Cultivo celular de mononucleares do sangue periférico com proteínas e peptídeos derivados do <i>M. leprae</i> .	56
5.7. Dosagem de IFN- $\gamma$ por ELISA.	56
5.8. Dosagem de IL-10 por ELISA.	57
5.9. Detecção de IgM e IgG sérica anti-PGL-1.	58
5.10. Análise estatística.	59
6. Resultados.	60
6.1. Caracterização da casuística e inquérito epidemiológico.	60
6.2. Visita domiciliária e administração do PPD.	63
6.3. Respostas dos contatos frente às proteínas do <i>M. leprae</i> .	64
6.3.1. A revacinação com a BCG modula a produção de IFN- $\gamma$ e de IL-10 frente ao estímulo com proteínas do <i>M. leprae</i> de forma específica, principalmente frente ao MLT (extrato bruto).	64
6.3.2. A revacinação com a BCG modula a produção de citocinas frente ao estímulo com o MLT, com padrões distintos entre as diferentes faixas etárias e forma clínica do caso índice.	69
6.3.3. A relação entre a produção de IFN- $\gamma$ e de IL-10, antes e após a BCG, mostra que o padrão de resposta de cada contato é semelhante frente aos vários estímulos.	73
6.3.4. Antes da revacinação com a BCG, a presença de sorologia positiva para anticorpos anti-PGL-1 não interfere na resposta de citocinas destes contatos ao estímulo com o MLT.	75
7. Discussão.	77
8. Conclusões.	85
9. Referências Bibliográficas	86
10. Anexos.	98



## 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa granulomatosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, manifestando-se clinicamente por lesões de pele e dano aos nervos periféricos (BRITTON & LOCKWOOD, 2004; SOUZA e cols., 2009).

É caracterizada por amplo espectro clínico relacionado à variação da resposta imunológica à infecção, com dois pólos de resposta: um pólo tuberculóide, um pólo virchowiano e com três formas intermediárias conforme a classificação de Ridley e Joppling de 1966 (LOCKWOOD; SARNO & SMITH, 2007).

Permanece como um importante problema de saúde pública em vários países. No Brasil, mantém-se em patamar de endemia, apesar dos esforços do Ministério da Saúde (MS) em erradicar a doença.

### 1.1.A ORIGEM DA DOENÇA: A HANSENÍASE ATRAVÉS DOS MARCOS HISTÓRICOS DA HUMANIDADE.

Com um histórico de milhares de anos junto à população humana, o *Mycobacterium leprae* somente foi descoberto como agente etiológico da lepra em 1873, pelo médico norueguês, Gerhardt Henrik Amauer Hansen (EIDT, 2004).

De possível origem asiática, segundo relatos da doença datados de 4.000 anos antes de Cristo (a.C.), por povos antigos na China, Índia e Japão, que já caracterizavam clinicamente a doença, apesar desses relatos incluírem outras patologias dermatológicas além da hanseníase. Textos datados de 600 a.C. descrevem a existência a lepra na China, Índia e Egito antigo com maior precisão de detalhes, assim como na bíblia, que refere, em suas passagens, a cura de vários indivíduos leprosos por Jesus Cristo (GARCIA, 2001; EIDT, 2004; MONOT e cols., 2005).

A Índia é apontada como o berço da doença, pois nos textos de 600 a.C., a doença é caracterizada por hipoestesia, anestesia, formigamento e incapacidades nos indivíduos acometidos. Os historiadores acreditam que tropas de Alexandre “O Grande”, em 300 a.C.,

tenham introduzido a doença no continente europeu após a frustrada campanha para a conquista da Índia. Na Grécia, em 150 a.C., referências feitas por Galeno, designam a hanseníase como elefantíase, referindo-se a semelhança entre a pele do doente e a pele espessada do elefante, consagrando o termo *facies leonina* referindo-se ao indivíduo com a face infiltrada, característico da forma lepromatosa da doença (EIDT, 2004). Esta forma de apresentação clínica passou a ser denominada de virchowiana, após a descrição das características histológicas da lesão pelo médico Rudolf Ludwig Karl Virchow, em 1859, quando de sua visita a Noruega, a fim de investigar uma epidemia de lepra. Também foram descritas as “células da lepra”, ou células de Virchow, descritas como macrófagos “espumosos” ([www.whonamedit.com/doctor.cfm/912.html](http://www.whonamedit.com/doctor.cfm/912.html)).

No ano de 583 d.C., a prevalência da doença na Europa atingia níveis preocupantes. A igreja católica, com sua influência política e social, interveio, estabelecendo medidas que considerava profiláticas. Dentre essas medidas, a criação dos leprosários ou lazaretos com o objetivo de segregar e isolar o indivíduo da sociedade para evitar a transmissão da doença. Em meados do século XIII, já existiam cerca de 20.000 leprosários na Europa. A partir do século XVII, com a melhoria das condições econômicas, sanitárias e sociais, houve um declínio da endemia, desaparecendo de quase todos os países europeus em meados de 1870 (GARCIA, 2001; EIDT, 2004).

Nas Américas, a hanseníase foi introduzida pelos colonizadores europeus nos séculos XVI e XVII, pois não há evidências que os indígenas americanos sofressem da moléstia, sendo o tráfico de escravos um dos fatores responsáveis pela expansão da doença pelas Américas (EIDT, 2004).

No Brasil, os primeiros casos notificados datam do ano de 1.600, na capitania do Rio de Janeiro, aonde mais tarde, surgiu o primeiro lazareto do país. A doença propagou-se, de acordo com a interiorização e campanhas para desbravamento e conquistas do interior do país, estendendo-se às capitanias de Pernambuco, produtor mundial de cana-de-açúcar, para as capitanias hoje referentes aos estados da Bahia, Pará, Ceará, Maranhão e Amazonas. Da capitania de São Paulo a infecção acompanhou os bandeirantes para Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás, mas muito pouco para o sul do país (EIDT, 2004).

Segundo Monteiro (1987), no século XVIII, a doença toma níveis epidêmicos em várias capitais do Brasil, com o surgimento de vários leprosários por iniciativa privada, nos quais os pacientes eram “depositados” sem assistência médica adequada.

Em meados de 1920, os médicos interessados pela hansenologia, dentre eles o Dr Emílio Ribas, debatiam a melhor maneira de barrar a epidemia e dar assistência aos doentes. Era unanimidade o discurso da necessidade do isolamento destes pacientes, partindo do Estado a iniciativa para a criação dos asilos-colônias, que abrigavam grandes quantidades de pacientes (MONTEIRO, 1987).

Com a introdução das sulfonamidas, na década de 1950, o controle da doença passa a ser ambulatorial, deixando de ser feito através do isolamento e da segregação do doente (EIDT, 2004).

Entretanto, o isolamento compulsório dos pacientes com lepra somente foi extinto em 1967, mas já havia contribuído para reforçar o medo, o preconceito e a marginalidade da doença perante a sociedade, estigmatizando os acometidos com esta patologia, mesmo com a ampla propaganda da cura pela poliquimioterapia (MONTEIRO, 1987).

Na tentativa de diminuir o estigma da doença, o professor Abrão Rotberg propõe a substituição da nomenclatura lepra pela terminologia hanseníase. O termo hanseníase seria uma homenagem ao médico norueguês Gerhardt Henrik Amauer Hansen, que identificou em 1873 o agente etiológico da lepra. Sua proposta foi difundida em decreto lei em 1975, tornando obrigatória a substituição, sendo padronizado seu uso pela classificação internacional das doenças (CID) em 1980 (OPRAMOLLA & MARTELLI, 2005).

#### 1.1.1. CONTRIBUIÇÃO DOS ESTUDOS MOLECULARES NO MAPEAMENTO DA MIGRAÇÃO DA HANSENÍASE

O genoma do *M. leprae* comparado ao genoma de outras micobactérias sofreu uma redução evolutiva importante, que causou mudanças no metabolismo celular, deixando-o cada vez mais adaptado ao hospedeiro humano (VISSA & BRENNAN, 2001).

Monot e cols, 2005, em seu estudo, rastream por SNP (Single Nucleotidic Polimorfism) regiões polimórficas no gene de 175 espécimes clínicas e laboratoriais do *M. leprae* provenientes de 21 países, incluindo sete diferentes cepas mundialmente distribuídas do *M. leprae*, duas cepas da Índia, uma da África, México, Brasil, Tailândia e Estados Unidos. Nesse estudo, somente quatro permutações nucleotídicas foram encontradas, concluindo que, apesar da perda evolutiva, o genoma do *M. leprae* foi excepcionalmente bem conservado durante milhares de anos, sendo, portanto altamente clonal. Foram identificados quatro SNPs, no qual o SNP tipo 1 englobou a maioria das cepas da região da Ásia, região do

Pacífico e leste africano, o SNP tipo 4 englobou as cepas do oeste africano e região caribenha, a cepa com SNP tipo 3 na Europa, norte da África e Américas e o com SNP tipo 2, englobando cepas do norte da Índia, da Etiópia, Malawi e Nepal.

A figura 1 ilustra a migração da hanseníase entre os continentes e sua possível disseminação, levando em consideração os achados moleculares e marcos históricos anteriores. Em seu estudo, a cepa com SNP tipo 2 aponta para uma possível origem da doença em regiões do leste da África e disseminando-se para a Ásia, procedendo a com SNP tipo 1 que migrou para o oriente, sendo encontrada principalmente na Tailândia e Korea, dando origem a cepa com o SNP tipo 3, que se disseminou para o ocidente, no Brasil, Estados Unidos, México e Venezuela, antes das cepas com o SNP tipo 4, mais difundido por Guinéa, Senegal, Marrocos, oeste da França e Brasil (MONOT e cols, 2005).

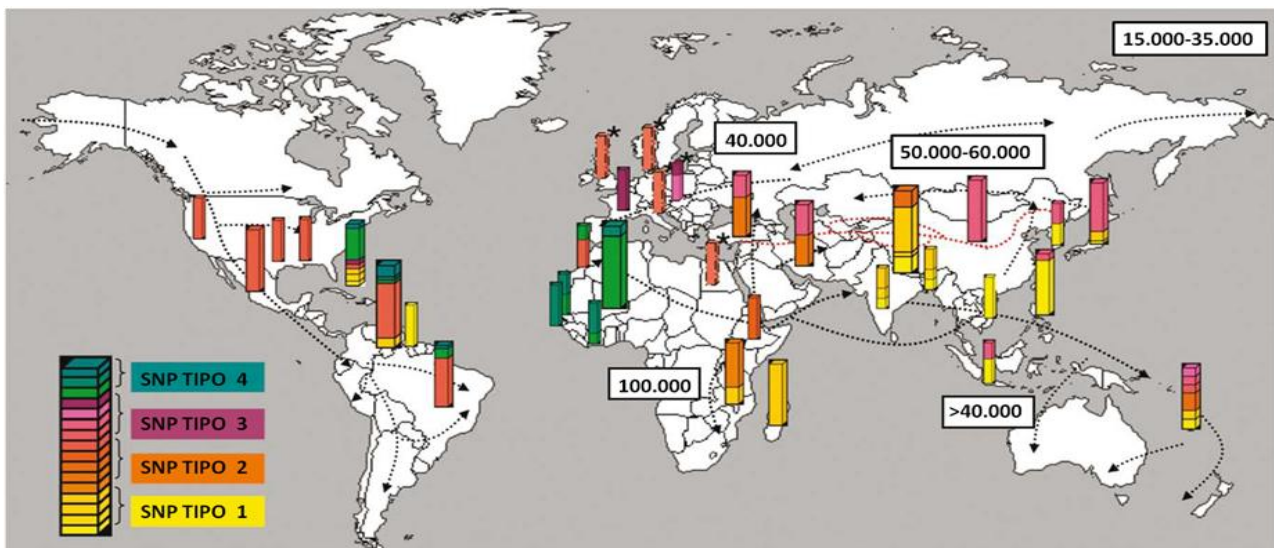


Figura 1. Possível disseminação da hanseníase segundo os marcos teóricos da migração populacional durante os séculos e estudos do polimorfismo dos genes do *m. leprae* (SNP). Fonte: Monot e cols, 2005.

## 1.2.EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE

### 1.2.1. SITUAÇÃO MUNDIAL DA HANSENÍASE

Com o apoio da Organização Mundial da Saúde (OMS), os países, onde a hanseníase é endêmica, têm articulado políticas públicas para a contenção da doença, traçando metas de

eliminação, sendo a situação da doença monitorada pelos Ministérios da Saúde (MS) de cada nação/país e acompanhada pela OMS, anualmente, através dos relatórios de casos novos detectados, entre outros parâmetros de morbidade.

A fase de pós-eliminação da hanseníase, determinada pela OMS, será atingida quando todos os países obtiverem a proporção máxima de 10 casos confirmados da doença por 100.000 habitantes. Essa realidade encontra-se distante para três regiões mundiais: no sudeste asiático, no continente sulamericano e no continente africano (WHO, 2006).

A região do sudeste da Ásia sempre apresentou números alarmantes na detecção de novos casos de hanseníase, desde o início dos levantamentos pela OMS, mostrando a gravidade da doença nessa região.

Cerca de 70% da detecção global de novos casos ocorreram na Ásia, sendo 80% desses casos provenientes da Índia, país que ocupa atualmente o primeiro lugar em casos da doença. No continente africano, a doença sofreu oscilação entre 40.000 a 55.000 casos detectados no período de 1991 até 2001, percebendo-se uma tendência à diminuição a partir de 2005. Diferentemente dos demais casos, no continente americano, houve aumento anual dos casos de hanseníase, de 30.532 casos em 1991 para 47.612 casos em 2006. Nas Américas, o Brasil possui 93% dos casos registrados (WHO, 2006).

A introdução efetiva e distribuição gratuita da poliquimioterapia (PQT), a partir de 1995 (CURTO & PASCHOAL, 2005), dentre outras medidas, resultaram na diminuição global da doença, com reflexo na detecção de novos casos. O advento da PQT quebra a cadeia epidemiológica da doença, reduzindo a carga bacilar do indivíduo, diminuindo a exposição dos indivíduos contatos deste paciente ao *M. leprae* (Figura 1).

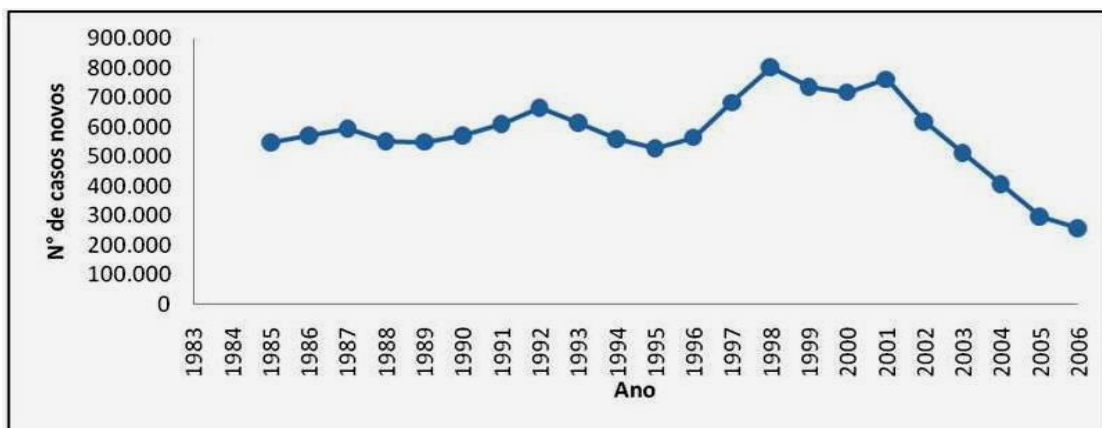


Figura 2. Detecção global de novos casos de hanseníase pela OMS no período de 1985 a 2006. O número de países repassando os dados variou durante os anos. Fonte: WHO, 2006.

A OMS tem dado suporte aqueles países no esforço de integrar as atividades de controle, facilitando o acesso dos doentes aos serviços de saúde das localidades acometidas, disponibilizando tratamento gratuito, treinamento das equipes, com ênfase nos modelos de qualidade diagnóstica e prestação de serviços.

Em 1985, dos 122 países onde a hanseníase era endêmica, 107 países conseguiram atingir a meta de eliminação. Os quinze países que permanecem, com índices de prevalência superiores a 10 casos por 100.000 habitantes, têm a atenção especial da OMS, principalmente seis desses países, que concentram juntos 83% dos casos registrados da doença e são eles: Índia, Brasil, Mianmar, Indonésia, Madagascar e Nepal (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

Os dados demonstram claramente a relação entre má distribuição de renda e fatores demográficos como razões para a manutenção da endemia nesses países, todos subdesenvolvidos e com graves problemas sociais e econômicos.

A partir das realidades de cada país, criou-se um plano estratégico para o controle e eliminação da doença (período de 2000 a 2005), com a elaboração de programas nacionais, levando-se em conta características e contrastes regionais peculiares. A avaliação no ano de 2005 mostrou que os países não conseguiram atingir a meta de eliminação, mas apresentaram decréscimo nos coeficientes de detecção e de prevalência da doença. Foi percebido que um percentual significativo desses casos-índice passou a ser composto por crianças, mostrando urgência em políticas públicas para essa faixa etária/grupo (WHO, 2006).

Alterações nos cálculos dos indicadores de morbidade na hanseníase foram realizadas para facilitar o acompanhamento epidemiológico da doença. Em 2004, o coeficiente de prevalência passou a ser pontual e não de registro ativo, integrando na prevalência os casos-índice diagnosticados e em tratamento com PQT, ocorrendo sua retirada dos indicadores após o término do tratamento. Uma nova revisão, em 2008, alterou a apresentação dos dados referentes à detecção de novos casos, sendo expostos por 100.000 habitantes, para facilitar a comparação com outros índices avaliativos (BRASIL, 2006; WHO, 2006; BRASIL, 2008).

Com a percepção de aumento na detecção de novos casos em alguns países, o programa de metas de eliminação da OMS foi prorrogado até o ano de 2010 (2006-2010). O programa enfatiza a necessidade de descentralização das ações, da melhoria na qualidade diagnóstica, da atenção ao diagnóstico em menores de 15 anos e incentivos nas ações de prevenção e controle da hanseníase (BRASIL, 2006)

A OMS, em nota prévia, faltando menos de um ano para a avaliação do plano 2006-2010, divulgou que os países envolvidos não irão conseguir reduzir os índices de detecção e

prevalência da doença a ponto de atingir a meta de eliminação. Dentre esses países, está o Brasil, que possui regiões hiperendêmicas e com distribuição ativa da doença.

### 1.2.2. EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE NO BRASIL

A hanseníase representa um problema de saúde pública relevante para as autoridades do país e as ações realizadas têm refletido positivamente nos índices de morbidade da doença (BRASIL, 2008; WHO, 2006).

Em 2007, o coeficiente de detecção de novos casos alcançou o valor de 21,08 casos por 100.000 habitantes e o coeficiente de prevalência 21,94 casos por 100.000 habitantes, valores mais baixos detectados na série histórica da doença no país (BRASIL, 2008).

Os coeficientes de detecção e de prevalência da hanseníase sofreram reduções significativas desde o início das intervenções governamentais, introdução da PQT e o advento do Programa Saúde da Família (PSF), como está ilustrado na Figura 2.

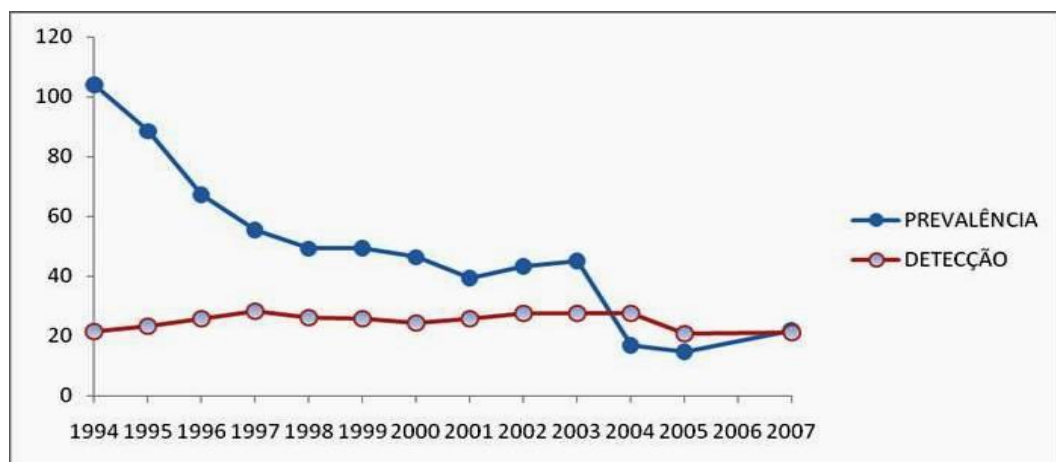


Figura 3. Evolução dos coeficientes de prevalência e detecção no Brasil, no período de 1994 a 2007. De 2004 a 2007: coeficiente de prevalência de ponto Fonte: Brasil, 2008.

A manutenção nos índices de detecção de novos casos pode estar relacionada ao aumento da cobertura territorial das equipes do PSF nas comunidades, que passam a ser assistidas e os doentes identificados. Apesar do decréscimo nacional, por região, os níveis demonstram a necessidade de manutenção das atividades de detecção, pois a doença persiste em certas regiões e ainda é grande a frequência da doença em crianças.

A tabela 1 exibe a evolução do coeficiente de detecção de casos novos por regiões brasileiras, mostrando valores mais altos e mais baixos obtidos e o período correspondente. As regiões Centro-Oeste e Norte apresentam-se hiperendêmicas e a região Nordeste mostra



valores considerados muito altos para a doença. O ano de 2007 mostrou os menores valores na série histórica da doença.

TABELA 1. Evolução do coeficiente de detecção de casos novos no período de 2001 a 2007. Os valores referem-se a detecção de casos novos por 100.000 habitantes.

REGIÃO	COEF. MÉDIO	MAIS ALTO (ANO)	MAIS BAIXO (ANO)
<b>NORTE</b>	69,40	78,01 (2003)	54,25 (2007)
<b>NORDESTE</b>	35,48	38,75 (2004)	31,53 (2007)
<b>CENTRO-OESTE</b>	60,77	68,69 (2003)	40,65 (2007)
<b>SUDESTE</b>	14,06	15,32 (2002)	9,75 (2007)
<b>SUL</b>	7,44	8,50 (2002)	6,45 (2007)
<b>BRASIL</b>	26,26	29,34 (2003)	21,08 (2007)

Fonte: Brasil, 2008

Dentre os estados da federação, a situação mais preocupante para as autoridades brasileiras são os estados relacionados à Amazônia Legal. A magnitude da doença nessa região é relevante, uma vez que os maiores coeficientes de detecção de casos novos do país estão nos estados de Mato Grosso, Tocantins, Rondônia, Maranhão, Pará, Roraima e Acre, todos integrantes do complexo da Amazônia Legal (BRASIL, 2008).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), os níveis hiperendêmicos na região da Amazônia Legal são o resultado das dificuldades físicas e sociais encontradas pela população no acesso aos serviços de saúde.

Outra prioridade para o programa de controle da hanseníase tem sido a redução da doença entre menores de 15 anos. O aparecimento de casos de hanseníase nessa faixa etária da população tem relação direta com focos de transmissão ativos, e seu acompanhamento passou a ser relevante para o programa da hanseníase.

Em 2007, o coeficiente de detecção em menores de 15 anos foi de 5,32 casos por 100.000 habitantes, com tendência a queda em várias regiões do país (BRASIL, 2008).

Em alguns estados da federação, os índices chegam a ser tão altos quanto os da população adulta. Novamente, os estados da Amazônia Legal possuem os maiores índices do país, com o estado do Tocantins ocupando a primeira posição, com coeficiente de 23,68 casos por 100.000 habitantes na população menor de 15 anos.

No Brasil, as estratégias utilizadas para o controle da doença envolvem ações para sua detecção precoce, o tratamento de todos os casos diagnosticados com a poliquimioterapia e o

exame físico seguido da vacinação com a BCG nos contatos destes pacientes (SOUZA e cols. 2009).

É fato que, os contatos de pacientes com hanseníase constituem um grupo de alto risco para o desenvolvimento da doença (GOULART e cols. 2008).

Em estudo retrospectivo realizado por Shen e cols. (2009), com 1.998 pacientes diagnosticados com hanseníase na China, entre o ano de 1996 a 2005, 22% destes pacientes eram contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase.

Já no estudo realizado, no Brasil, por Goulart e cols. (2008), foram acompanhados por um período de cinco anos, 1.396 contatos de pacientes com hanseníase, sendo administrada a 2ª dose da BCG conforme protocolo nacional. Foram identificados 2 % de doentes nesses contatos, com 75% dos casos registrados no primeiro ano de acompanhamento. Os contatos de pacientes com a forma multibacilar apresentaram quatro vezes maior risco de adoecer.

No Brasil, a assistência aos contatos de pacientes com hanseníase, através do exame clínico e a administração da vacina BCG, ainda é insuficiente, com uma média nacional de cobertura de 50% (BRASIL, 2008).

### 1.2.3. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA HANSENÍASE NO CEARÁ

Localizado na região nordeste do país, o Ceará é composto por 184 municípios e destaca-se economicamente como a segunda maior economia do nordeste (CEARÁ, 2009).

Apesar do ótimo desempenho no cenário econômico nacional, o Ceará ainda possui um nível de desenvolvimento que não atinge a maioria dos habitantes do estado, com alta concentração de renda, sendo o 19º estado no ranking do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) (OPOVO, 2003). A realidade da hanseníase no estado não difere dos outros estados da federação, cujas desigualdades sociais e pobreza são uma constante entre a população.

De acordo com o governo do Ceará (2010), foram notificados em 2009, 1.952 casos novos de hanseníase, correspondendo a uma taxa de detecção de 22,8 casos por 100.000 habitantes, sendo esta taxa considerada muito alta de acordo com os parâmetros nacionais.

Em 2009, 62% dos casos detectados no estado foram classificados como multibacilares e 38% foram classificados como paucibacilares, com 5,7% destes pacientes sendo indivíduos menores de 15 anos de idade (CEARÁ, 2010).

O coeficiente de detecção em menores de 15 anos no estado, em 2009, foi de cinco casos para 100.000 habitantes. O município de Barroquinha encontra-se em situação preocupante, com coeficiente de detecção de 55,9 casos por 100.000 habitantes (CEARÁ, 2010).

A figura 3 mostra os municípios do estado classificados de acordo com a endemicidade. Verifica-se uma concentração de regiões hiperendêmicas ou com taxas muito altas na região sul do estado.

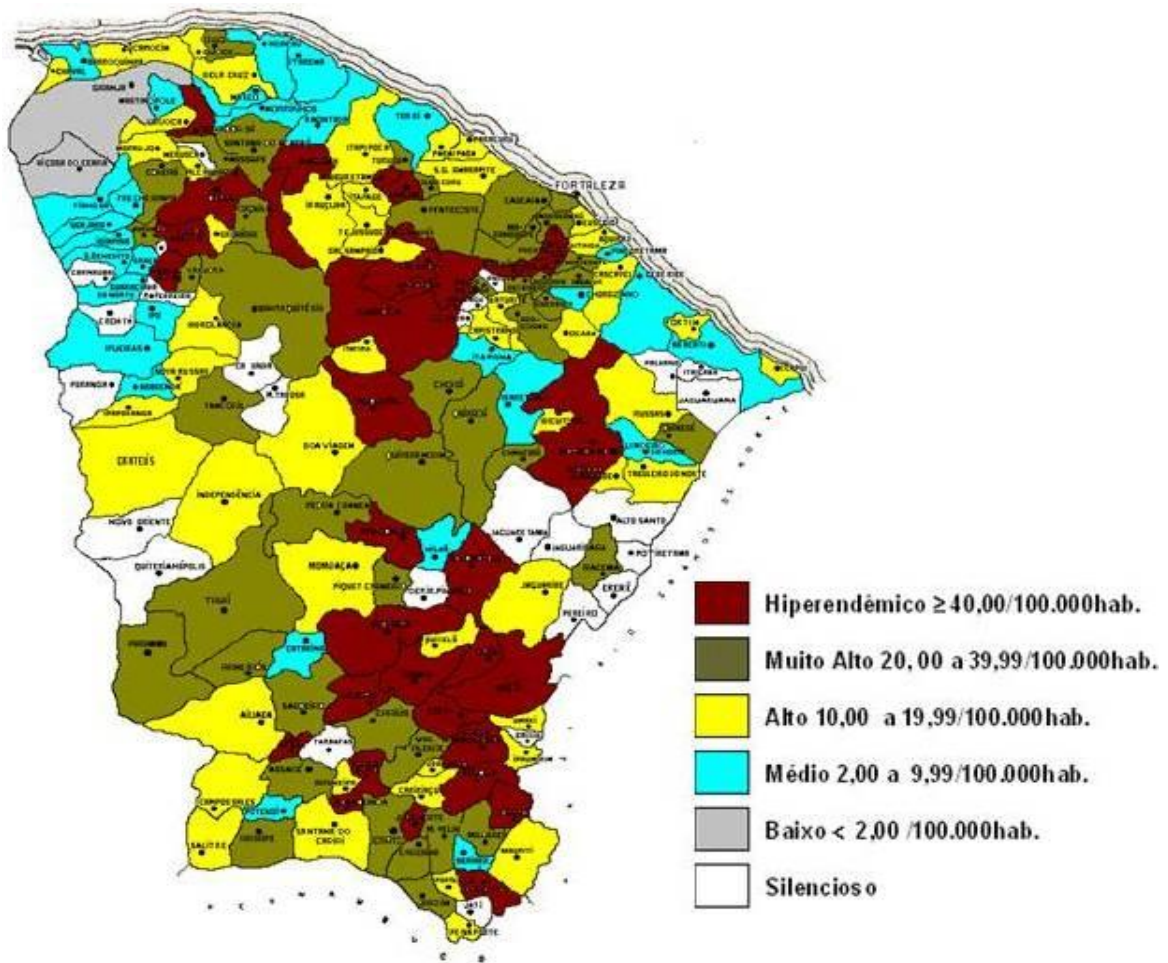


Figura 4. Endemicidade da hanseníase por município no estado do Ceará. Fonte: Ceará, 2009.

As principais áreas de importância epidemiológica foram mapeadas no estado, sendo identificados “clusters”. Os “clusters” definem áreas de maior concentração de casos e maior risco, sendo relevante para as políticas dirigidas contra a endemia (BRASIL, 2008).

Um “cluster” composto por 41 municípios foi identificado ao sul do estado e 21 municípios foram considerados prioritários para políticas de intervenção, pois possuem juntos

66% da ocorrência de casos da doença. Dentre esses municípios prioritários merece destaque a capital do estado, Fortaleza (CEARÁ, 2009).

#### 1.2.4. EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE EM FORTALEZA

Os parâmetros epidemiológicos mostram que, no município de Fortaleza, a hanseníase encontra-se em um patamar alarmante. Na série histórica dos últimos 15 anos, a detecção de novos casos mantém uma tendência de aumento, com uma média de 900 casos/ano (FORTALEZA, 2008).

A figura 4 mostra a evolução do coeficiente de detecção na série histórica de 1995 até julho de 2008. O coeficiente médio no período foi de 37,4 casos (variando de 31,4 a 42,1) por 100.000 habitantes.

Em menores de 15 anos, em 2007, o coeficiente foi de 10,5 casos por 100.000 habitantes, dos quais 53% dos pacientes menores de 15 anos foram classificados operacionalmente como multibacilares e 47% foram classificados como paucibacilares. Entretanto, na série histórica da doença no município de Fortaleza, no período de 2002 até o ano de 2006 prevaleceu os paucibacilares, com 67,1% no ano de 2006. Clinicamente a forma dimorfa (35,2%) foi a mais prevalente no ano de 2007, seguida da forma tuberculóide (26,4%) e da forma virchowiana (14,7%). (ALENCAR e cols. 2008)

De acordo com a Secretária de Saúde do estado do Ceará (2010), o coeficiente de detecção no ano de 2009 foi de 27,9 casos por 100.000 habitantes, sendo considerado muito alto.

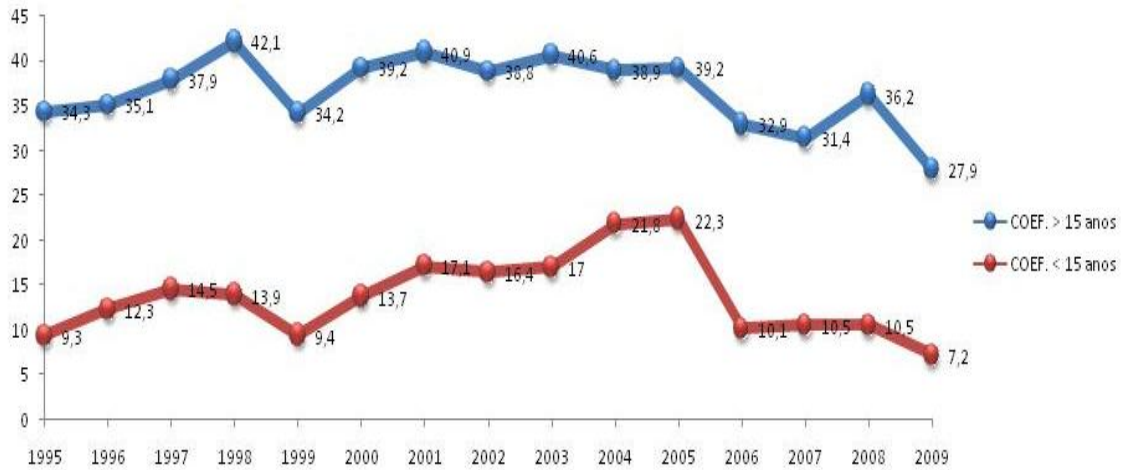


Figura 5. Coeficientes de detecção de novos casos em Fortaleza em maiores (linha azul) e menores de 15 anos (linha vermelha), no período de 1995 a 2007. Fonte: Fortaleza, 2008.

O diagnóstico e o tratamento dos pacientes são realizados de forma centralizada, através do centro de referência em dermatologia do estado (CDEM Dona Libânia). Façanha e cols. (2006), neste centro de referência, identificaram uma taxa de subnotificação de 14,9% do total de casos, mostrando que os indicadores ainda não refletem a verdadeira realidade da doença no município.

A situação sócio-demográfica mostrou, em 2007, que os grupos socialmente excluídos são os mais acometidos pela doença, com uma predominância de casos do sexo masculino, com escolaridade até a 5ª série do ensino fundamental. Considerando-se a escolaridade como variável da situação econômica e social dos casos, evidencia-se maior concentração de casos na população economicamente desfavorecida (FORTALEZA, 2008).

A proporção de casos menores de 15 anos foi superior a 8% do total de casos registrados em 2007. Esses valores demonstram uma necessidade direta de intervenções nesse grupo de idade, já que pela história natural da doença, crianças só adoeceriam devido à exposição prolongada junto a pessoas sem tratamento.

### 1.3. BIOLOGIA DO *Mycobacterium leprae*.

O *Mycobacterium leprae* consiste em bastonete imóvel, reto, e as vezes, apresenta-se curvo, não esporulado, de crescimento lento, microaerofílico, resistente à descoloração por ácidos (SCOLLARD e cols. 2006).

É uma bactéria intracelular obrigatória, com tropismo por macrófagos e células de Schwann, e preferência por regiões frias do corpo.

O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) é o lipídeo dominante na parede celular do *Mycobacterium leprae*, é espécie específico e possui imunogenicidade.

Estudos realizados por Vincent e cols. (2000), demonstraram que o PGL-1 é responsável pela interação da bactéria com o nervo periférico através de sua ligação ao domínio G da laminina-2, presente na membrana basal do axônio.

Fukutomi e cols. (2009) demonstraram, *in vitro*, que a predileção pelas regiões frias do corpo pode estar relacionada à necessidade de uma temperatura ótima para a manutenção e crescimento do *M. leprae*. Valores em torno de 35°C conseguiram manter a bactéria viável em macrófagos por quatro semanas, com perda da viabilidade quando a cultura foi mantida a 37°C.

A impossibilidade de cultivo *in vitro* não limitou os estudos microbiológicos sobre os mais diversos aspectos do metabolismo, da genética e da resistência a fármacos. Esses estudos são realizados utilizando-se do *M. leprae* replicado obtido da inoculação em modelos animais, como no tatu da espécie *Dasypus novemcinctus*, e em camundongos “knockout” para produção de citocinas ou camundongos atímicos (SCOLLARD e cols. 2006; DEPS e cols. 2008).

As micobactérias possuem uma parede celular estruturalmente complexa e rica em lipídeos, sendo responsável pelas principais características destas bactérias, como resistência a ácidos, crescimento lento, resistência a detergentes e antigenicidade (SCOLLARD e cols, 2006).

O *M. leprae* possui a estrutura básica da parede celular semelhante a outras micobactérias (Figura 5).

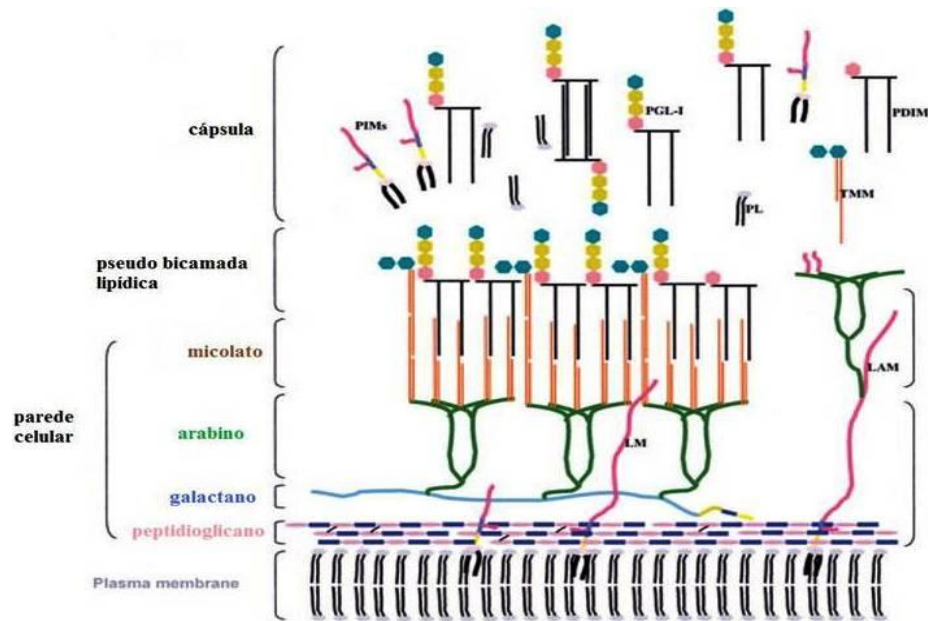


Figura 6. Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae*. Adaptado de: SCOLLARD e cols., 2006.

A parte central da parede celular consiste de uma camada de peptideoglicano, composto de cadeias alternadas de *N*-acetilglucosamina e *N*-glicosilmuramato, covalentemente ligada a uma unidade de arabinogalactano. Na porção final das cadeias de arabino ligam-se os ácidos micólicos, formando uma pseudocamada lipídica. A parte mais externa é composta de monomicolatos de trealose (TMN) e ácidos micoseróicos de dimecoserosatos de fitiocerol (PDIMs) e glicolípídeos (PGL). Muitas dessas moléculas, como o PGL-1, são liberadas da parede celular após sua síntese, formando uma camada ao redor do *M. leprae* (SCOLLARD e cols. 2006).

O glicolípídeo fenólico 1 (PGL-1) induz à produção de anticorpos séricos e secretores, que podem servir como marcadores da presença de infecção.

Comparado a outras micobactérias, o genoma do *M. leprae* sofreu uma redução evolutiva extrema, que pode ter afetado vias metabólicas específicas, deixando a infecção pela bactéria limitada a poucos nichos animais, como ao homem, e possivelmente contribuindo para a dificuldade de seu cultivo *in vitro* (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

A seqüência completa de genes do *M. leprae* corresponde a 3.268.203 pares de bases (pb). Valores inferiores aos relatados para o *Mycobacterium tuberculosis* e de outras micobactérias, que giram em torno de 4,4 milhões de pb. O *M. leprae* possui genes codificadores de 1.604 proteínas e o restante engloba pseudogenes (1.116 pseudogenes). Esses pseudogenes representariam 40% do potencial de genes do *M. leprae* (COLE e cols. 2001).

Esta perda evolutiva de genes, mais de 2.000, relaciona-se a dependência bacteriana aos produtos do metabolismo do hospedeiro, dificultando seu crescimento nos meios de cultura hoje disponibilizados (COLE e cols. 2001).

#### 1.4.MECANISMOS DE TRANSMISSÃO E VIRULÊNCIA DO *M. leprae*.

A compreensão da epidemiologia da hanseníase é um pré-requisito para o controle efetivo da doença.

Ainda que não completamente estabelecido, acredita-se que seu principal meio de transmissão ocorra por aerossóis liberados pelas vias aéreas superiores de indivíduos infectados, como ocorre a exemplo do *M. tuberculosis*.

Especulações sobre o possível papel do ambiente na dinâmica da transmissão da doença são destaques na literatura, mostrando que outros fatores de risco para a transmissão ou adoecimento pelo *M. leprae* podem estar relacionados.

Deps e cols. (2008) sugerem uma relação direta entre a doença e a exposição a tatus infectados pelo *M. leprae*. O seu estudo, realizado no sudeste do Brasil, do tipo caso-controle, mostrou que 68% dos indivíduos com hanseníase possuíam contato direto e frequente com tatus.

De acordo com Lavania e cols. (2008), o solo poderia ser a fonte de infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Usando métodos de biologia molecular, esses autores identificaram a bactéria viável em amostras de solo de áreas endêmicas para a doença.

Segundo Lahiri & Krahenbukl (2008), a água e o solo também poderiam ser fontes de infecção. Eles demonstraram que a micobactéria poderia sobreviver na *Acanthamoeba castellanii*. Trata-se de uma ameba de vida livre que habita nos lagos e no solo, infectando, de forma oportunista, o homem. Em seus experimentos, Lariri & Krahenbukl (2008) mostraram que o *M. leprae* se mantém viável por mais de 72 horas quando endocitado pela *A.castellanii*.

A patogênese da hanseníase é uma consequência da resposta imune do indivíduo ao *Mycobacterium leprae*, e de sua capacidade de se manter viável dentro de macrófagos, células dendríticas e células de Schwann, como resultado direto da ação de seus fatores de virulência.

De acordo com o Schlesinger & Hortwitz (1991), a proteína C1q liga-se avidamente ao PGL-1 micobacteriano, ativando a via clássica do complemento. Esses autores detectaram



que tanto o C3 como o C3bi ligam-se ao PGL-1. A fixação do C3 e de suas frações na parede micobacteriana, ajudaria na ancoragem do *M. leprae* e sua internalização pelo fagócito.

Em estudo realizado por Gomes e cols. (2008) com 132 indivíduos, entre pacientes com hanseníase e controles, verificaram que a via clássica está envolvida na ativação do sistema complemento nos pacientes com a forma virchowiana, com correlação entre os altos níveis de imunocomplexos circulantes e os altos títulos da lectina ligadora de manose (MBL).

Em trabalho realizado por Williams e cols. (2004), foram identificados genes expressos pelo *M. leprae* relacionados à virulência, sendo os produtos transcritos, responsáveis pela sua manutenção no ambiente intracelular. A partir da extração de RNA de biópsias de pacientes multibacilares e de camundongos atímicos infectados pelo *M. leprae*, foram identificados os genes transcritos pela micobacteria durante a infecção. No fagócito, durante o pico oxidativo, foram identificados, na micobacteria, os transcritos para a enzima superóxido dismutase (genes *sodA* e *sodC*), seguindo-se da transcrição da enzima alquil hidroperóxido redutase (gene *ahpC*), sendo responsável, respectivamente, por dismutar o ânion superóxido ( $O^-$ ), presente no fagolissomo, em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), seguindo-se pela oxidação desse peróxido de hidrogênio em água e no oxigênio molecular. Assim, a micobacteria conseguiria escapar dos radicais do oxigênio reativo produzidos pelo fagócito e proliferar no fagossomo.

## 1.5. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E AS CLASSIFICAÇÕES DA HANSENÍASE

O diagnóstico da hanseníase é baseado em alguns sinais cardinais, sendo considerado caso-índice aquele indivíduo que possui lesões de pele com anestesia ou alteração da sensibilidade, espessamento de nervos periféricos ou a presença do *M. leprae* em esfregaços de linfa e em cortes histológicos de tecidos (SOUZA, 1997; BRASIL, 2002).

As lesões podem se apresentar como manchas, placas, infiltrações e nódulos, em quaisquer regiões do corpo. Geralmente, acometem face, orelhas, nádegas, braços, pernas e costas, com relatos de acometimento de mucosa oral e nasal (BRASIL, 2007).

A identificação dos diferentes espectros da doença e a íntima relação entre a clínica e a resposta do sistema imune fez com que, ao longo do tempo, diferentes classificações fossem propostas, no sentido de embasar o manejo e o tratamento dos pacientes diagnosticados.

O primeiro sistema de classificação de pacientes com hanseníase foi proposto em uma convenção internacional em Manila em 1931. A partir desta, surgiram outras propostas de classificação, Cairo em 1938, Rio de Janeiro em 1946, Havana em 1948 e Madrid em 1956 (LOCKWOOD e cols. 2007).

A classificação utilizada em estudos experimentais e que representam o padrão de resposta imunológica do indivíduo ao *M. leprae* é a classificação de Ridley & Joppling (1966). Essa classificação baseia-se em parâmetros imunológicos, histopatológicos, e microbiológicos. Eles classificaram os pacientes com hanseníase em um grupo de resposta inicial (indeterminado), em grupos polares (tuberculóide e virchowiano) e em subgrupos intermediários (dimorfo-tuberculóide, dimorfo-dimorfo e dimorfo-virchowiano).

No pólo tuberculóide é encontrado uma forte resposta imune mediada por células contra a infecção, enquanto que no pólo virchowiano encontra-se a forma anérgica da doença (SOUZA, 1997; PARKASH, 2009), nas formas intermediárias encontram-se uma mistura das formas polares.

De acordo com Spencer e cols. (2005) os pacientes classificados no pólo tuberculóide, respondem com a produção de altos níveis de IFN- $\gamma$ , quando estimulados, *in vitro*, com proteínas derivadas do *M. leprae*. Os anticorpos anti-PGL-1 não foram detectados nesses pacientes. Já no pólo virchowiano, verificaram a ausência de produção de IFN- $\gamma$  associada à detecção de altos títulos de anticorpos anti-PGL-1.

Com a finalidade de auxiliar na escolha do tratamento medicamentoso, a classificação operacional foi proposta pela OMS em 1982. Para tal finalidade, os pacientes deveriam ser classificados em dois grupos: multibacilares (MB) e paucibacilares (PB) (WHO, 2006).

Atualmente, a classificação de pacientes com hanseníase é realizada pelo sistema da contagem das lesões, sendo classificado como PB aquele paciente com até cinco lesões de pele e como MB aqueles casos com mais de cinco lesões de pele (BRASIL, 2002).

De acordo com Souza e cols. (2009), o guia do programa brasileiro de controle da hanseníase utiliza para a classificação de casos-índice a contagem das lesões (PB < 5 lesões e MB  $\geq$  5 lesões), e/ou o resultado da baciloscopia (negativo = PB e positivo = MB) e/ou o número de nervos comprometidos (sem comprometimento = PB e com comprometimento de troncos nervosos = MB).

A figura 6 mostra a relação entre as classificações utilizadas no diagnóstico do paciente com hanseníase. São destacadas as classificações de Madrid (1953), Ridley & Joppling (1966) e operacional da OMS.

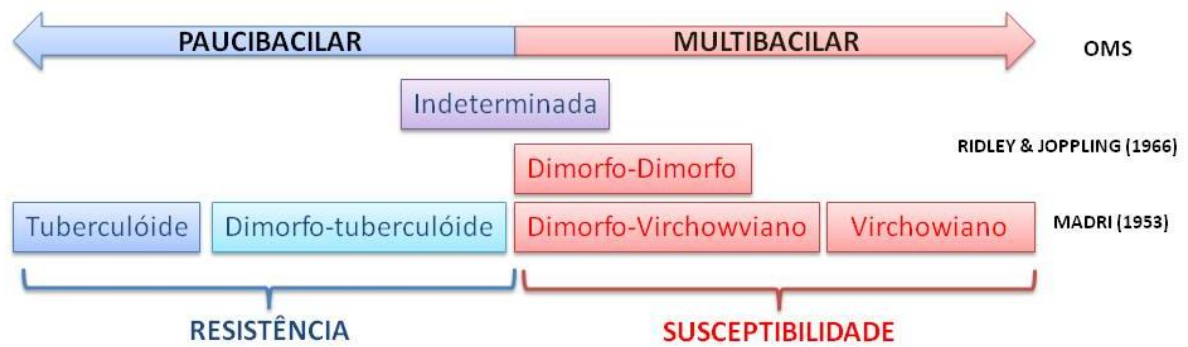


Figura 7. Relação entre as classificações de Madri, Ridley & Joppling e operacional da OMS. As classificações de Ridley & Joppling e de Madri complementam-se. Em chaves estão representadas as formas de resistência ou susceptibilidade a infecção pelo *M. leprae*. Na classificação de Madri não considera-se as subnotificações da forma dimorfo, aparecendo apenas na classificação de Ridley & Joppling. Adaptado de: LOCKWOOD e cols., 2007; BRASIL, 2007 e PARKASH, 2009.

## 1.6. A RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO PELO *M. leprae*.

A variação das formas clínicas na hanseníase é determinada pela resposta imune do indivíduo ao *M. leprae*.

A doença manifesta-se inicialmente na forma clínica indeterminada, onde a resposta imune do indivíduo ainda não permite classificá-la em um dos pólos da doença. Segundo Goulart e cols. (2002), a resposta imune elaborada pelo indivíduo pode levar à cura espontânea ou evoluir clinicamente para um dos pólos, de resistência ao bacilo (Tuberculóide-TT) ou de susceptibilidade ao *M. leprae* (Virchowiano-VV), existindo formas de instabilidade imunológica celular e/ou humoral (Dimorfo Tuberculóide- DT; Dimorfo Dimorfo- DD e Dimorfo Virchowiano- DV).

### 1.6.1. OS MECANISMOS DA RESPOSTA IMUNE INATA NA INFECÇÃO PELO *Mycobacterium leprae*.

A entrada do *M. leprae* pode ocorrer pelas vias aéreas superiores ou pela pele não íntegra. Tratando-se de uma bactéria intracelular obrigatória, o *M. leprae* tem tropismo por

macrófagos e células de Schwann, e utiliza-se de mecanismos ainda não totalmente elucidados para sobreviver e proliferar dentro destas células.

Na mucosa do trato respiratório, as células dendríticas e macrófagos residentes podem ser as primeiras células a encontrarem o bacilo, na ausência de uma resposta imune adaptativa (SCOLLARD e cols. 2006).

Essa interação inicial entre o *M. leprae* e macrófagos/células dendríticas pode ocorrer via os receptores toll-like (TLRs).

Os TLRs constituem-se de proteínas transmembrânicas, que possuem um papel chave na ativação celular, pois reconhecem no patógeno padrões moleculares expressos por ele, cuja ligação induz à transdução de sinais para produção de mediadores inflamatórios (BOCHUD e cols. 2009).

Os TLR-1, TLR-2 e TLR-4 estão envolvidos no reconhecimento de estruturas na parede das micobactérias, como lipopolissacarídeos e lipopeptídeos, e sendo ativados na infecção pelo *M. leprae* (SCOLLARD e cols. 2006).

Estudos demonstraram a participação de fatores genéticos, imunológicos e ligados ao *M. leprae* que induziriam o padrão de susceptibilidade encontrado no pólo virchowiano. Os polimorfismos dos TLRs seriam a evidência que disfunções de origem genéticas estariam relacionadas à susceptibilidade à infecção. A resposta formulada inicialmente à micobactéria seria a chave para o sucesso ou não da resposta imune adaptativa contra o *M. leprae*.

O estudo de Kang e cols. (2004), na Korea, com 15 pacientes com hanseníase, mostrou que o polimorfismo no TLR-2 confere susceptibilidade à infecção pelo *M. leprae*. Pacientes com a mutação do TLR 2 (Arg677Trp) produziram mais IL-10 e menos IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pelos mononucleares de sangue periférico (CMSP) em relação aos controles.

Na população da Etiópia, de acordo com Bochud e cols.(2009), o *M. leprae* regula negativamente a produção de citocinas em monócitos ativados via TLR-4, existindo dois SNPs do TLR-4 relacionados à proteção contra o bacilo. Em estudo anterior, conduzido por Bochud e cols (2008), o polimorfismo no TLR-2 foi associado com susceptibilidade à infecção e ao desenvolvimento das formas mais graves da doença.

Em estudo feito na cidade de Fortaleza-Ceará, por Rodrigues e cols. (2008), em 87 pacientes com hanseníase, independente da forma clínica, havia o mesmo perfil de heterozigose na posição C2029T da sequência de nucleotídeos do TLR-2.

Outros tipos de regulação na expressão de receptores foram identificados durante os momentos iniciais da infecção. De acordo com Hashimoto e cols. (2002), o bacilo regula

negativamente a expressão das moléculas do MHC de classe I, MHC de classe II e CD86 nas células dendríticas derivadas de monócitos ( $CD1a^+ CD83^+$ ). A regulação negativa dessas moléculas inibiria a interação da célula dendrítica com o linfócito T, impedindo a apresentação de antígenos derivados do *M. leprae* e a formação de uma resposta imune adaptativa.

A liberação do PGL-1 micobacteriano durante a interação do *M. leprae* com a célula dendrítica teria função imunossupressora da resposta imune celular (Tipo 1), com a indução da produção de citocinas do tipo 2, como a IL-4 e a IL-10, ativação de células B produtoras de anticorpos específicos contra este glicolípide, e consequente inativação macrófagica e manutenção da proliferação bacilar (HASHIMOTO e cols. 2002).

Durante a ativação linfocitária, a depender das populações celulares estimuladas e do padrão de citocinas predominante nos eventos iniciais da infecção, o desfecho pode ser favorável ao bacilo ou ao indivíduo infectado (ROMAGNANI, 2006). Na hanseníase, a estimulação linfocitária poderá determinar a cura, resistência ou adoecimento à infecção pelo *M. leprae*.

#### 1.6.2. A FORMAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA CONTRA O *M. leprae* E AS FORMAS CLÍNICAS POLARES DA DOENÇA.

De acordo com Scollard e cols. (2006), é estimado que 95% das pessoas sejam resistentes à exposição e infecção pelo *M. leprae*, respondendo previamente e com sucesso aos estímulos antigênicos do bacilo.

A geração de uma resposta imune adaptativa ao *M. leprae* pode ter início na mucosa do trato respiratório, pois seria o sítio de entrada da micobactéria no organismo.

Na mucosa, uma resposta específica contra o *M. leprae* pode ser relevante, uma vez que a produção de IgA secretória pode impedir o acesso deste microorganismo ao meio interno.

Em seu trabalho, Nagao-Dias e cols. (2007) identificaram a produção de IgA salivar anti-PGL-1 em pacientes com hanseníase, correlacionando com a presença de IgM salivar anti-PGL-1. A detecção de tais anticorpos poderia demonstrar a presença de infecção ativa, antes da produção de anticorpos séricos anti-PGL-1.

Após fagocitar o *M. leprae* e formar-se o fagossomo, o macrófago inicia a produção de intermediários do oxigênio reativo, como peróxido de hidrogênio, radical hidróxi e ânion superóxido, que irão compor o fagolisossomo. Estes produtos são importantes na defesa contra microorganismos, mas o *M. leprae* pode regular negativamente a produção desses radicais, justificando sua sobrevivência dentro do macrófago (BRITTON & LOCKWOOD, 2004; ROMAGNANI, 2006).

No pólo tuberculóide (TT) a doença é caracterizada por uma resposta imune celular (do tipo 1) à micobactéria. Essa resposta celular relaciona-se a resistência do indivíduo à infecção pelo *M. leprae*, cuja representação clínica é um indivíduo com poucas lesões na pele, sem o acometimento de troncos nervosos, e a baciloscopia negativa ou próxima a zero (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

Acredita-se que nesse pólo da doença, as APCs liberam IL-12 que favorece a diferenciação do linfócito Th0 em Th1, que produz citocinas com capacidade de ativação macrofágica. Os linfócitos Th1 estimulam o processo inflamatório e são caracterizados pela produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e TNF- $\beta$  (WEAVER e cols. 2007)

Os clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup> isolados de biópsias de pacientes TT produzem predominantemente IFN- $\gamma$ , sendo detectada a presença de RNAm para diversas citocinas nas células que infiltraram a lesão. Esses estudos mostraram o predomínio da produção de IL-12 e IL-18 pelos linfócitos nas lesões. Estas citocinas são importantes para a diferenciação de linfócitos Th0 em Th1 (SCOLLARD e cols. 2006).

A resistência do indivíduo TT à infecção pelo *M. leprae* consiste na produção de lisossomos ricos em intermediários do óxido nítrico. Essa indução ocorre devido ao IFN- $\gamma$  produzido pelos linfócitos Th1, linfócitos NK e linfócitos citotóxicos, que ativam o macrófago, induzindo o fator de transcrição para a enzima óxido nítrico sintetase (Figura 7). A produção desses intermediários do óxido nítrico mostrou-se capaz de inibir o crescimento e causar morte do *M. leprae* (FOOTE, 1999).

A resposta imune no paciente TT organiza-se para a formação de um granuloma, bem definido ao redor das lesões e nervos acometidos, com presença de infiltrado de células T secretoras de IFN- $\gamma$ , células epitelióides e células gigantes multinucleadas. Poucos bacilos são encontrados nestas lesões e testes intradérmicos, como o teste de Mitsuda (teste intradérmico com *Mycobacterium leprae* morto), confirmam a formação de uma forte resposta celular contra o *M. leprae* pelos pacientes TT (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

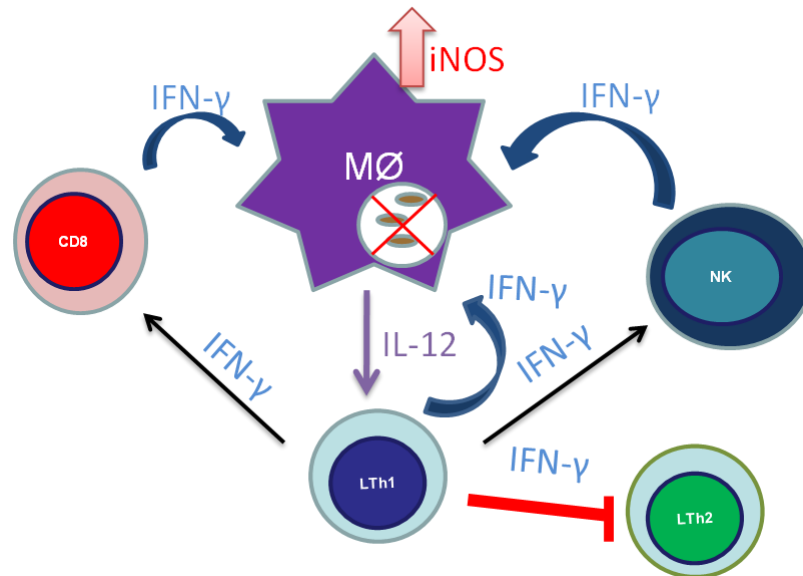


Figura 8. Modelo esquemático da resposta imune celular a micobactérias. Adaptado de: FOOTE, S. 1999.

No outro pólo, temos a hanseníase virchowiana (VV). Considerado um pólo de susceptibilidade à doença, é caracterizado pela ausência de resposta imune celular específica contra o *M. leprae* e estímulo a uma resposta humoral com anticorpos anti-PGL-1, secundária a diferenciação de linfócitos Th0 em linfócitos Th2, cujo padrão de citocinas produzido (IL-10, IL-4, IL-5, IL-13, TGF- $\beta$ ) leva à desativação macrofágica e o estímulo a proliferação de linfócitos B. Clinicamente, encontram-se lesões que envolvem grandes áreas do tegumento, com infiltrado e dano aos nervos acometidos, com a presença de bacilos ao exame baciloscópico (BRITTON & LOCKWOOD, 2004; ROMAGNANI, 2006).

De acordo com Murray e cols. (2007), em paciente virchowianos, as células dendríticas imaturas (CDi) são suprimidas após fagocitar o *M. leprae*. Essas células não apresentaram os marcadores referentes à maturação (CD80, CD86, CD83 e CD40) ou sofreram uma maturação incompleta, após estímulo com o *M. leprae*. Essa ativação incompleta das CDi na hanseníase virchowiana pode estar relacionada à polarização de linfócitos Th2 encontrada nesse espectro da doença.

Nas lesões dérmicas, detecta-se um infiltrado celular, contendo macrófagos “espumosos”, ou células de Virchow, e ao seu redor, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e plasmócitos secretores de anticorpos anti-PGL-1, além de antígenos protéicos solúveis (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

De acordo com Scollard e cols. (2006), a análise das biópsias de pacientes VV mostraram a predominância de RNAm para a IL-4 em relação aos de IFN- $\gamma$ . A produção destas citocinas foi verificada, *in vitro*, no isolamento de clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T





## 1.7. ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE E PREVENÇÃO DA HANSENÍASE

As principais medidas utilizadas para o controle da hanseníase consistem no uso de testes laboratoriais para auxiliar no diagnóstico clínico, na disponibilidade da poliquimioterapia aos doentes, no exame físico dos contatos e na administração da vacina BCG nos contatos hígidos destes pacientes.

### 1.7.1. OS TESTES DIAGNÓSTICOS DISPONÍVEIS PARA A HANSENÍASE

O grande impasse no uso de testes diagnósticos na hanseníase consiste na falta de um teste com especificidade e sensibilidade suficientes para distinguir as diferentes formas do espectro da doença. Além disso, o teste deve ser de baixo custo e fácil manuseio, para ser utilizado pelos profissionais nas diversas áreas endêmicas.

Outro entrave refere-se ao diagnóstico de indivíduos assintomáticos, pois por se tratar de uma bactéria com longo período de incubação, o controle da doença nesses casos, quebraria a cadeia epidemiológica e conseqüentemente controlaria a transmissão do *M. leprae* na comunidade (STEFANI, 2008).

#### 1.7.1.1. TESTE DE MITSUDA

Composto de uma solução contendo o *M. leprae* morto, o antígeno de Mitsuda é utilizado para auxiliar na classificação dos pacientes com hanseníase, avaliando de forma indireta a presença ou ausência de resposta imune celular após a sua inoculação por via intradérmica, cuja leitura é feita entre o 21° e 28° dia. Segundo Goulart e cols. (2002), o teste de Mitsuda é positivo em pacientes com a forma clínica tuberculóide, que apresentam uma vigorosa resposta celular, e o teste é negativo nos pacientes da forma clínica virchowiana, nos quais a resposta imune celular está suprimida. Nos pacientes com a forma dimorfa, existe uma

progressiva redução da resposta imune celular à medida que o padrão de resposta imune aproxima-se do pólo virchowiano.

Entretanto, o teste de Mitsuda pode apresentar-se positivo frente a exposição a outras micobactérias em indivíduos saudáveis, não expostos ao *M. leprae*. De acordo com Noordeen (2000) existe a sensibilização cruzada entre a vacinação com a BCG e a conversão do teste de Mitsuda em indivíduos anteriormente não reativos, trazendo a especulação que esse evento pode ser mediado por outras micobactérias, como o *M. tuberculosis*.

### 1.7.1.2.BACILOSCOPIA

Usada rotineiramente para o diagnóstico da hanseníase, a baciloscopia consiste na detecção do *M. leprae* em esfregaços dérmicos ou de linfa após a coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (CEARÁ, 2004).

A leitura é realizada em microscópio óptico e seu resultado é apresentado em forma de índice baciloscópico (IB). Proposto por Ridley em 1964, o IB é uma média dos índices de cada esfregaço presente na lâmina. Esse índice é o resultado de uma escala logarítmica, variando de zero até seis (CEARÁ, 2004).

Seu resultado auxilia na classificação e manejo dos pacientes. A baciloscopia positiva é pré-requisito para a classificação operacional dos pacientes no grupo MB, sendo negativa nos pacientes PB (BRASIL, 2002). Na classificação de Ridley & Joppling, a presença dos bacilos é mais frequente nas formas onde a resposta imune celular está diminuída ou ausente, principalmente nas formas DD, DV e VV, e raramente DT. A ausência de bacilos neste exame é característico na forma TT e I (SOUZA, 1997).

De acordo com Bushan e cols. (2008), a especificidade da baciloscopia é de quase 100%, enquanto que a sua sensibilidade pode variar entre 10% a 50%. Nesse estudo, com 76 pacientes classificados como VV, por biópsia da lesão, a baciloscopia apresentou sensibilidade de 56 a 58%.

As desvantagens do uso da baciloscopia estão na dificuldade de sua execução e na possibilidade de erros de interpretação (PARKASH, 2009). De acordo com Torres e cols. (2003), as técnicas tintoriais utilizadas para os bacilos álcool-ácidos resistentes requerem no

mínimo a presença de  $10^4$  bacilos por grama de tecido para serem detectados ao exame microscópico.

### 1.7.1.3.HISTOPATOLÓGICO

O exame histopatológico das lesões de pele e de troncos nervosos acometidos pelo *M. leprae* é considerado o teste “padrão ouro” para o diagnóstico da hanseníase (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

Segundo Goulart e cols. (2002), na forma clínica TT identifica-se a formação de um granuloma, constituído de agregado de células fagocíticas mononucleares com diferenciação epitelióide e multinucleadas no centro da lesão. Já na forma clínica VV a lesão mostra um extenso infiltrado celular composto de histiócitos com citoplasma rico em bacilos, formando as células espumosas. A classificação histopatológica das formas dimorfas baseia-se na indiferenciação progressiva do macrófago, na diminuição no número de linfócitos e no aumento do número de bacilos, com a forma DT apresentando raros bacilos e a forma DV com inúmeros bacilos.

### 1.7.1.4.SOROLOGIA.

A partir da purificação do PGL-1 por Hunter & Brennan em 1981, e da descoberta de sua capacidade em induzir a produção de anticorpos, este fosfolípido glicofenólico vem sendo utilizado em ensaios sorológicos para diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento em indivíduos clinicamente doentes, bem como em inquéritos soro epidemiológicos com o objetivo de identificar grupos de risco para o desenvolvimento da hanseníase. Vários testes foram padronizados utilizando o antígeno PGL-1, nos mais diversos formatos, como ensaios de aglutinação, imunoenzimáticos em placa (ELISA) ou imunocromatográficos (ML flow) (MOURA e cols. 2008).

Devido à imunogenicidade da molécula estar relacionada à sua porção glicídica, e a hidrofobicidade da porção lipídica dificultar o seu uso em alguns métodos sorológicos, foram desenvolvidos compostos análogos: o monossacarídeo-octil-BSA (M-O-BSA), o dissacarídeo-

BSA (D-BSA), o natural dissacarídeo-octil-BSA (ND-O-BSA), o natural trissacarídeo-fenil-BSA (NT-P-BSA), e o natural dissacarídeo-octil-albumina sérica humana (ND-O-HAS). Os anticorpos produzidos frente a esses antígenos são predominantemente da classe IgM (OSKAM & BUHRER-SÉKULA, 2004; STEFANI, 2008).

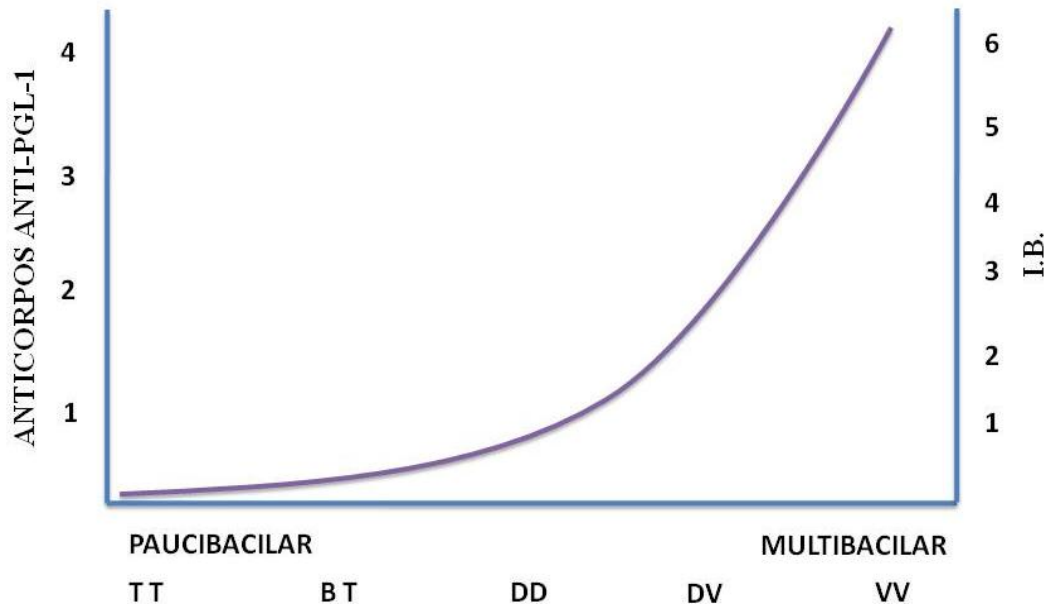


Figura 10. Interrelação entre as classificações de Ridley & Joppling e operacional da OMS com a Sorologia anti-PGL-1 e índice baciloscópico (IB). Adaptado de: GOULART, 2002; LOCKWOOD e cols. 2007 e PARKASH, 2009.

A presença de anticorpos IgM anti-PGL-1, ou contra seus análogos, correlaciona-se com a carga bacilar, índice baciloscópico e as formas clínicas disseminadas da hanseníase (Figura 9). Esses anticorpos estão presentes entre 51,2% a 97,4% dos pacientes MB, e em 6,9% a 57,3% em pacientes PB (OSKAM e cols. 2003; BRITTON & LOCKWOOD, 2004; MOURA e cols. 2008).

Em trabalho realizado por Nagao-Dias e cols. (2007), anticorpos salivares IgM e IgA anti-PGL-1 foram detectados por ELISA em pacientes com hanseníase e seus contatos, além da dosagem de anticorpos IgG séricos e da medida de sua avidéz. Os anticorpos salivares foram detectados em títulos mais altos em pacientes MB, e ocorre um aumento da avidéz dos anticorpos IgG ao longo do tratamento.

De acordo com Torres e cols. (2003), os estudos sorológicos, utilizando separadamente os dois antígenos, PGL-1 e D-BSA, no ensaio imunoenzimático, mostraram boa correlação ( $r = 0.926$ ) com sensibilidade e especificidade similares.

Já o ML-flow trata-se de um teste sorológico imunocromatográfico, cuja proposta é ser utilizável em campo, pois pode ser executado a partir de uma gota de sangue capilar. O ensaio consiste na detecção qualitativa (positivo ou negativo) e semi-quantitativo (1+ a 4+) de anticorpos IgM que reagem com o antígeno ND-O-BSA ou NT-P-BSA (BÜHRER-SÉKULA e cols. 2003).

De acordo com Lyon e cols. (2008), devido a sua correlação com a baciloscopia, o ML-flow pode ser utilizado como alternativa na classificação de indivíduos MB. Bühner-Sékula e cols. (2009) recomendam o uso do ML-flow juntamente ao sistema de contagem de lesões para classificar pacientes MB. Em seu estudo com 202 pacientes não tratados, a sensibilidade do ML-flow nos pacientes MB com IB positivo foi de 87%. Entretanto, nos pacientes PB o teste apresentou uma sensibilidade de apenas 23%.

Segundo a revisão de Oskam e cols. (2003), os títulos dos anticorpos IgM anti-análogos do PGL-1 detectados em pacientes MB caem de 25% a 50% em um ano de tratamento, contudo podem não ser detectados nas formas reacionais e são detectados em metade das formas neurais puras. Quando utilizados em inquéritos soro-epidemiológicos, esses testes mostraram positividade que variaram entre 1,7% a 31% na população saudável de área endêmica.

Em um estudo prospectivo realizado nas Filipinas, por Douglas e cols. (2004), em 559 indivíduos maiores de 14 anos, contatos de pacientes MB, acompanhados por seis anos, 7,2% eram sorologicamente positivos. Esses autores observaram que os contatos sorologicamente positivos apresentavam 7,65 vezes mais chance de adoecerem que os contatos negativos, e o risco relativo desses contatos soropositivos de desenvolver a forma MB foi de 34,4, contra 3,52 de desenvolverem a forma PB.

Bühner-Sékula e cols. (2008), utilizando dois métodos diferentes, mas com o mesmo antígeno (ND-O-BSA), pesquisaram a soropositividade em 7.073 escolares, entre 10 a 14 anos, em regiões brasileiras com diferentes taxas de detecção para hanseníase, e encontraram percentuais de positividade que variaram de 8,5% a 24%, sem diferenças segundo o teste empregado e sem correlação com a taxa de detecção da hanseníase da localidade.

Frota e cols. (2009), estudando a soropositividade (IgM) para o análogo D-BSA por ELISA, em 380 adultos contatos de pacientes, 317 indivíduos de região endêmica e 87 indivíduos de região não-endêmica, no Ceará-Brasil, encontraram índices de positividade semelhantes entre as populações estudadas. Demonstrando a baixa sensibilidade daquele testes para avaliar a possibilidade de infecção em contatos.

#### 1.7.1.5. TESTES BASEADOS NA ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS T *in vitro* COM AS FRAÇÕES PROTÉICAS E PEPTÍDEOS DO *M. leprae*.

Após entrar em contato com o *M. leprae*, uma parte dos indivíduos desenvolve uma forte resposta imune celular contra a micobactéria e esta resposta está relacionada aos padrões I, TT e DT da classificação de Ridley & Joppling e aos paucibacilares da classificação da OMS (BRITTON & LOCKWOOD, 2004).

A produção de IFN- $\gamma$ , indicativa de uma resposta imune celular, pode ser mediada a partir de ensaios de linfoproliferação utilizando células mononucleares do sangue periférico (CMSP) *in vitro* estimuladas com proteínas e peptídeos obtidos do *M. leprae*.

De acordo com Sridevi e cols. (2004), o antígeno protéico derivado da parede do *Mycobacterium leprae* (MLCwa) estimulou as CMSP de pacientes TT, DT e em indivíduos saudáveis, regulando positivamente a expressão das moléculas coestimulatórias CD80, CD86 e CD28 nos pacientes TT e DT, enquanto que nos pacientes DD, DV e VV houve uma diminuição da expressão dessas moléculas.

No trabalho realizado por Black e cols. (2003), com 604 moradores da cidade de Malawi (área endêmica) e controles do Reino Unido (controle de área não-endêmica), a exposição à micobactérias ambientais estimulou a produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* em resposta às proteínas de 35 kDa e 18 kDa.

Dockrell e cols. (2000) estimularam as CMSP de pacientes TT e DT frente a 10 peptídeos específicos para o *M. leprae* e dosaram o IFN- $\gamma$  produzido. Dos 10 peptídeos testados, a especificidade variou entre 45% a 100%, mas a sensibilidade foi baixa (19% a 47%), não conseguindo distinção entre a população doente e dos contatos.

Spencer e cols. (2005) realizaram uma triagem com quatro proteínas (ML0008, ML0126, ML1057 e ML 2567) e 58 peptídeos para formulação dos possíveis constituintes para um teste diagnóstico para a hanseníase. Alguns destes peptídeos tiveram respostas distintas em relação aos grupos controle, com a produção de IFN- $\gamma$ , como frente ao p69 cuja produção foi significativamente mais alta nos contatos domiciliares e nos pacientes paucibacilares, que nos outros grupos analisados.

De acordo com Lima e cols. (2000), os contatos intradomiciliares expostos ao *Mycobacterium leprae* apresentam padrões heterogêneos de produção de citocinas, sendo verificado *in vitro* quando as CMSP são estimuladas com o MLT e com antígenos de 10 kDa

e 35 kDa. Os pacientes VV produzem altos níveis de IL-10 em resposta ao MLT, enquanto os pacientes TT produzem simultaneamente altos títulos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

#### 1.7.1.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

As técnicas de biologia molecular para detecção do *M. leprae* não são utilizadas rotineiramente por conta de seu alto custo, mas apresentam-se promissoras pela melhora na sensibilidade e alta especificidade quando comparadas aos outros testes disponíveis.

A detecção de seqüências nucleotídicas espécie-específicas para o *M. leprae* possibilitou o diagnóstico a partir de diferentes amostras, como biópsia, sangue total e swab nasal. A PCR para detecção do *M. leprae* possui alta especificidade, mas sua sensibilidade é baixa na detecção do DNA em indivíduos com a forma PB da doença, nas diferentes amostras clínicas testadas.

O trabalho de Torres e cols. (2003) demonstrou a baixa sensibilidade da técnica da PCR na detecção do DNA do *M. leprae* em amostras de 60 pacientes, 10 PB e 50 MB (20 com IB positivo e 30 com IB negativo). Na análise de amostras de DNA processadas a partir dos pacientes MB com baciloscopia positiva, a sensibilidade para a PCR foi 100% nas amostras de biópsia, seguido do esfregaço da lesão (80% de sensibilidade) e do “swab” nasal (65% de sensibilidade). Entretanto, quando analisadas as amostras provenientes de pacientes MB com baciloscopia negativa, a sensibilidade foi de 10% nas amostras de biópsias, de 3,3% nos esfregaços da lesão e não foi amplificado produto de DNA no swab nasal. Entre os pacientes PB, a PCR não amplificou o DNA do *M. leprae* em nenhuma das amostras testadas.

Já no uso do nested PCR por Bang e cols. (2009), houve uma melhora na sensibilidade da PCR na detecção do DNA da micobactéria nos pacientes PB. Em amostras de biópsias de 37 pacientes MB e 32 pacientes PB, a sensibilidade foi de 100% para MB e 50% para PB, com especificidade de 100%.

### 1.7.2. MEDIDAS DE PROMOÇÃO E PREVENÇÃO NA HANSENÍASE.

Os contatos de pacientes com hanseníase, principalmente das formas bacilíferas, possuem risco aumentado de adoecer. A principal medida de prevenção está na busca ativa, detecção e tratamento precoce do caso-índice. O exame clínico, a vacinação com a BCG e a mobilização social através das ações de educação em saúde têm tido efeito positivo nos índices de morbidade da doença (BRASIL, 2007).

#### 1.7.2.1.A PROTEÇÃO CONFERIDA PELA ADMINISTRAÇÃO DA VACINA BCG NOS CONTATOS DOS PACIENTES COM HANSENÍASE.

Idealizada por Albert Calmette e Camille Guérin em 1921, a vacinação com o bacilo de Calmette-Guérin ou BCG foi iniciada no Brasil a partir de 1927. Produzida a partir da cepa atenuada do *Mycobacterium bovis*, a vacina BCG, durante os anos seguintes da sua utilização, serviu para a proteção contra as formas graves de tuberculose (meningite e miliar) cuja mortalidade em crianças era expressiva, sendo administrada nos neonatos conforme protocolo da Organização Mundial da Saúde (BARRETO e cols. 2006).

Segundo Noordeen (2000) e Zodpey (2007), o trabalho realizado por Fernandez em 1939 na Argentina, abriu precedentes para o possível papel protetor da BCG na infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Os primeiros indícios da possível proteção da BCG contra a hanseníase foram a partir das observações que, crianças não-reatoras ao teste intradérmico de Mitsuda, apresentaram conversão para a reatividade ao teste após a administração da BCG.

A partir da década de 1970, o Ministério da Saúde passou a indicar a vacinação com a BCG aos contatos de pacientes com hanseníase, sendo esta recomendação tornada política de saúde pública em 1991 (DÜPRE e cols. 2008).

De acordo com o Ministério da Saúde (2007), todos os contatos de pacientes com hanseníase precisam ser examinados e quando hígidos, devem receber uma dose da vacina BCG, na presença ou ausência de escara, à exceção das gestantes, cuja recomendação constante no Programa Nacional de Imunização (PNI) é de não vaciná-las. Os contatos que



possuem comprovação de duas administrações ou a presença de duas escaras pela BCG, são dispensados da administração de uma nova dose.

No estudo realizado por Botasso e cols. (1998), com 670 adultos residentes em áreas endêmicas para a hanseníase na Argentina, a vacinação com a BCG ou com a BCG *plus* (BCG + *Mycobacterium vaccae*) foi capaz de converter os testes intradérmicos de Mitsuda, com a Tuberculina e com o PPD de *M. vaccae*, em indivíduos anteriormente não-responsivos. Houve diminuição da positividade à tuberculina nos contatos de indivíduos MB.

Na meta-análise realizada por Velema e cols. (2007), foram encontrados diferentes valores na proteção conferida pela BCG dada ao nascer. Analisando os estudos observacionais publicados na década de 90, a proteção média conferida pela BCG administrada ao nascer foi de 63% (variação de 20% a 90%) em 12 estudos do tipo caso-controle. Destes estudos, dois foram conduzidos no Brasil e um foi realizado na Indonésia, e envolveram o acompanhamento dos sujeitos até a idade de 16 anos, cuja proteção conferida foi de 81% a 90% no Brasil e 76% na Indonésia.

Os estudos mostraram que a proteção pela BCG nos contatos domiciliares de pacientes multibacilares é maior quando comparados aos contatos de paucibacilares ou quando comparados com outros tipos de contatos, como os ocupacionais.

No estudo realizado pelo Karonga Group (1996), com 66.155 habitantes da cidade de Malawi, nos indivíduos com a escara pela BCG, a revacinação elevou em 50% a proteção contra a hanseníase, comparado aos não revacinados. Entre os indivíduos menores de 15 anos, o efeito protetor desta revacinação foi maior que nos outros grupos de idade.

Os estudos realizados no Brasil também demonstraram diferentes taxas de proteção conferidas pela vacinação com a BCG.

Em estudo do tipo coorte conduzido por Düppre e cols. (2008) na cidade do Rio de Janeiro, foram analisados 5.346 contatos de indivíduos com hanseníase, e observou-se que a proteção conferida pela 2ª dose de BCG foi de 56%, não sendo afetada pela vacinação prévia. A proteção foi de 85% para as formas MB (DD, DV e VV), de 83% para a forma indeterminada e de 26% para as formas DT e TT.

Em estudo do tipo coorte conduzido por Velema e cols. (2007), envolvendo escolares menores de 15 anos, no estado do Amazonas, identificou-se que a proteção conferida pela vacina BCG ao nascer foi de 74% contra as diversas formas de hanseníase e de 93% de proteção contra a forma MB, não havendo diminuição desta proteção com a idade. A duração da proteção conferida pela vacinação foi em média de 15 anos.

Com achados semelhantes, o estudo do tipo caso-controle realizado por Rodrigues e cols. (2007), identificou que a proteção conferida pela vacinação com a BCG ao nascer, medida pela presença da escara, foi de 86% no grupo de idade entre 18 a 29 anos. O estudo conduzido no estado do Ceará mostrou que a proteção pela BCG pode durar longos períodos, com 32% de proteção no grupo com idade superior a 40 anos.

De acordo com Fine (1995), a diversidade na proteção conferida pela BCG nos diferentes estudos pode estar relacionada às variações nas cepas constituintes da vacina BCG ou decorrentes de fatores genéticos, nutricionais e à exposição às micobactérias ambientais pelo indivíduo.

Apesar dos estudos observacionais anteriores mostrarem que a vacinação com a BCG protege contra a hanseníase, sendo essa proteção variável e de longa duração, é fato que, nos diversos países endêmicos para a hanseníase, a detecção de novos casos em crianças e adolescentes até 15 anos têm aumentado ou manteve-se estável, independente da diminuição geral de novos casos.

A baixa cobertura vacinal ao nascer poderia justificar o aumento no número de casos nessa população, pois por não estarem vacinadas e expostas a indivíduos com hanseníase, estariam mais susceptíveis a desenvolver a doença. Entretanto, o Brasil possui uma alta cobertura vacinal com a BCG ao nascer, e nas capitais, como Fortaleza, foi registrado 100% de cobertura vacinal. Entretanto, mesmo com a alta cobertura vacinal, a proporção de novos casos de hanseníase em menores de 15 anos não sofreu redução (BRASIL, 2009).

Por outro lado, estudos têm demonstrado que a vacinação com a BCG em contatos já infectados pelo *M. leprae* seria o “gatilho” para o desenvolvimento de uma resposta imune ineficaz contra a micobactéria. De acordo com Karonga (1996), durante o primeiro ano de vacinação, a proteção conferida pela vacinação com a BCG é baixa, mesmo com a revacinação. Suspeita-se que em indivíduos previamente infectados pelo *M. leprae* e vacinados em seguida com a BCG desenvolveriam os sinais clínicos da doença com um período menor de incubação.

No estudo de Düpre e cols. (2008), no grupo de indivíduos que não tinham escara da BCG e eram contatos de pacientes, a incidência de hanseníase foi maior (2.13/1000 pessoas-ano) nos que receberam a 2ª dose, quando comparados aos que não a receberam (0.38/1000 pessoas-ano). Dentre os diagnosticados, 64% desenvolveram as formas mais brandas da doença (TT e DT).

No estudo realizado por Barbosa e cols. (2003), foi observada uma regulação positiva na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em escolares revacinados com a BCG. Na cidade de Salvador, foram analisadas a produção de citocinas por cultura de células mononucleares de sangue periférico de 694 escolares, na faixa etária de 7 a 15 anos, antes e 60 dias após a revacinação com a BCG, encontrando o aumento significativo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  após a revacinação, sem relação com o teste tuberculínico.

A imunização de camundongos com a BCG e a formulação BCG/85A (BCG recombinante que libera o antígeno de 85kD do *M. leprae*) foi capaz de reduzir significativamente a infecção pelo *M. leprae* nesses animais quando comparado com o grupo controle (OHARA e cols. 2000).

De acordo com Lima e cols. (2000), a administração da BCG em contatos de pacientes com hanseníase mostra variações. Em seu estudo, a produção de citocinas em cinco contatos de pacientes foi avaliada *in vitro*, por cultivo de células mononucleares de sangue periférico, antes e quinze dias após a revacinação com a BCG. Houve contatos que responderam com alta produção de IL-10, enquanto outros responderam com alta produção de IFN- $\gamma$  frente ao antígeno de 35 kDa derivado do MMP-1.

Em nosso laboratório, Jesus (2007) mostrou que o IFN- $\gamma$  produzido por mononucleares de sangue periférico frente ao antígeno sonicado de *M. leprae* (MLT) é significativamente mais elevado nos indivíduos paucibacilares em comparação aos multibacilares, sem diferenças entre os contatos domiciliares, maiores de 18 anos, de ambos os grupos e sem correlação com a presença de cicatriz vacinal de BCG.

Dentre a população doente, uma percentagem importante corresponde aos contatos menores de 15 anos, que adoeceram pela exposição ao *M. leprae*, e que, epidemiologicamente, estariam protegidos pela BCG dada ao nascer ou pelo seu reforço. A literatura carece de estudos experimentais que identifiquem o papel da vacinação e da revacinação com a BCG na modulação da resposta imune à exposição ou infecção subclínica, e como essa modulação poderia interferir na resposta imune do indivíduo levando-o para a resistência ou susceptibilidade à infecção pelo *M. leprae*.

## 2. PERGUNTA DE PARTIDA

A resposta imunológica de indivíduos menores de 15 anos, que são contatos de pacientes com hanseníase, frente aos antígenos de *M. leprae* e ao teste de PPD é influenciada pela revacinação com a BCG e pela forma clínica do caso-índice?

## 3. HIPÓTESES

1. A vacinação com a BCG, nos contatos de indivíduos com hanseníase, protege, independentemente da forma clínica do caso índice, modulando positivamente a produção de IFN- $\gamma$  e negativamente a produção de IL-10;
2. Contatos de indivíduos com hanseníase apresentarão positividade na dosagem de anticorpos séricos IgM e IgG anti-PGL-1;
3. A reatividade à tuberculina estará presente nos indivíduos vacinados com a BCG com altos títulos de IFN- $\gamma$  em resposta aos antígenos do *M. leprae*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1.GERAL:

Analisar o perfil da resposta imunológica, antes e após a revacinação com a BCG em contatos menores de 15 anos de pacientes com hanseníase.

### 4.2.ESPECÍFICOS:

1 Correlacionar a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 por células mononucleares do sangue periférico frente aos antígenos do *M. leprae*, antes e após a revacinação com a BCG, com os parâmetros do inquérito epidemiológico.

2, Correlacionar a dosagem sérica de IgM e IgG anti-PGL-1 com a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 por mononucleares do sangue periférico frente aos antígenos do *M. leprae*, antes da revacinação com BCG;

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. TIPO DE ESTUDO E CASUÍSTICA.

Pesquisa de natureza básica, experimental, explicativa e de abordagem quantitativa.

O estudo foi realizado com vinte e cinco contatos de pacientes com hanseníase, no período de setembro de 2008 a dezembro de 2008. O estudo envolveu crianças e adolescentes até a idade de 15 anos, moradores dos municípios que compõem a Grande Fortaleza (Fortaleza e região Metropolitana).

Os indivíduos participantes da pesquisa foram selecionados a partir dos pacientes que recebem atendimento no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia, unidade estadual de referência no atendimento de pacientes com hanseníase no estado do Ceará.

**Critérios de inclusão:** Contatos com idade inferior a quinze anos, sem sinais clínicos de quaisquer patologias, com presença de cicatriz vacinal pela BCG e/ou registro da mesma em cartão de vacinação.

Foram identificados seus responsáveis, sendo esclarecidos os aspectos sobre a pesquisa e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foi agendada a vinda do contato à unidade de saúde, sendo o mesmo examinado pelos profissionais de saúde da unidade (enfermeiros e médicos) à procura de sinais clínicos que caracterizassem a hanseníase, preenchida uma ficha epidemiológica e quando caracterizado como sadio, encaminhado para a administração da BCG e participação no estudo.

## 5.2.DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

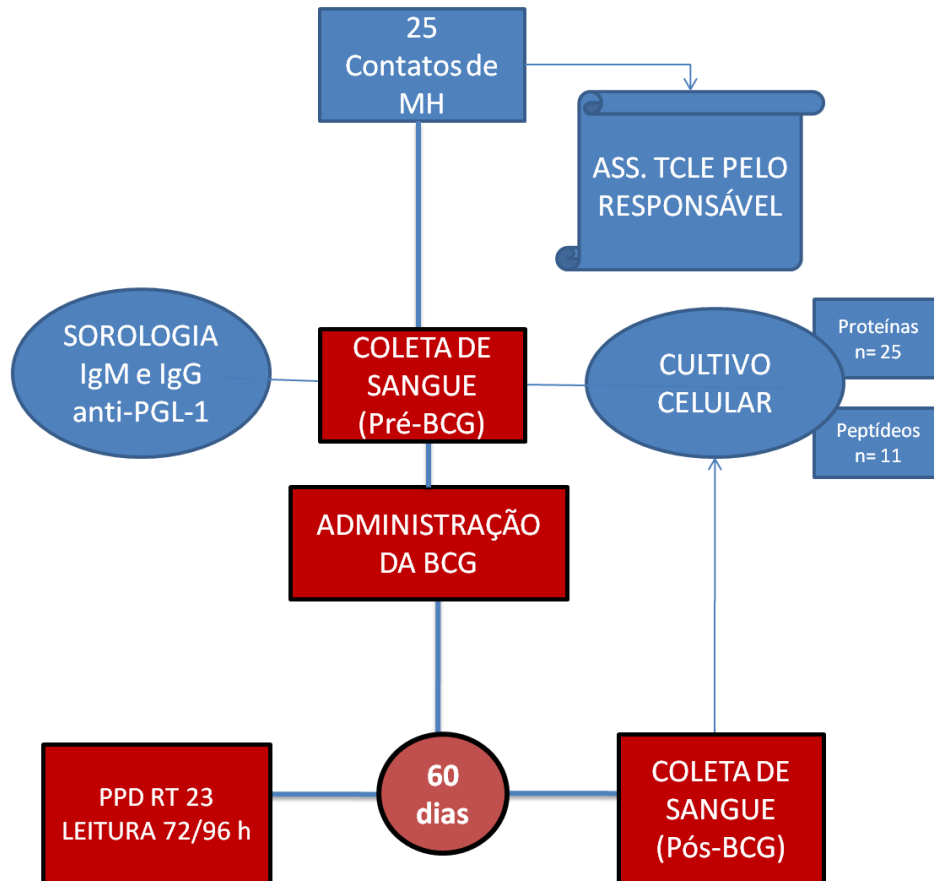


Figura 11. Fluxograma da obtenção das amostras para ensaio de cultivo celular e ensaio sorológico de 25 contatos menores de 15 anos de pacientes com hanseníase.

### 5.3.Aspectos Éticos

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia, sendo aprovado no dia 07/05/2008, sob o documento número 006-08 (Anexo).

### 5.4.Administração da 2a dose da BCG.

A vacina BCG foi administrada no Setor de Imunobiológicos da Unidade de Saúde Dona Libânia após exame físico realizado pelos médicos e enfermeiros da instituição. A vacinação prévia pela BCG foi comprovada através do cartão de imunização ou presença da escara conforme protocolo disponibilizado pelo Ministério da Saúde.

A vacina BCG utilizada neste estudo é proveniente da subcepa Moreau-Rio de Janeiro, sendo produzida pela fundação Atapho de Paiva, e distribuídas as unidades de saúde pela Rede de imunobiológicos da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. Foram obedecidas as especificações do fabricante, e não houve queixas relatadas sobre os lotes utilizados.

### 5.5.Visita domiciliária e administração do PPD-RT-23

Sessenta dias após a administração da vacina BCG foi realizada uma visita domiciliar, em parceria com os integrantes do Projeto de Extensão intitulado “Educação em saúde para a prevenção da hanseníase na grande Fortaleza” da Universidade Federal do Ceará. Coordenado pela Profa. Dra Lilia Câmara, o projeto extensionista realiza atividades de educação em saúde em comunidades acometidas pela hanseníase, formando multiplicadores.

A visita domiciliária teve como objetivo de identificar os contatos faltosos, realizar avaliação clínica e administrar a vacina BCG. Nos indivíduos integrantes desta pesquisa foi administrado, na região do antebraço esquerdo, o teste intradérmico com o purificado protéico derivado do *Mycobacterium tuberculosis* (PPD), a realização da leitura após 72/96 horas.



Foram considerados reatores aqueles indivíduos com induração superior a 5 mm e não reatores aqueles cuja enduração foi inferior a 4 mm. O PPD (STATENS SERUM INSTITUT, Dinamarca) foi fornecido gentilmente pela Secretaria de Saúde do município de Fortaleza.

#### 5.6. Cultivo celular de mononucleares do sangue periférico com proteínas e peptídeos derivados do *Mycobacterium leprae*:

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC/CMSP) de vinte e cinco contatos participantes da casuística foram estimuladas com as frações proteínas e treze destes contatos tiveram seus PBMCs estimulados também com os peptídeos derivados do *M. leprae*, antes (pré-BCG) e após a revacinação com a BCG (pós-BCG).

De cada indivíduo, antes e após a administração da BCG, foram coletadas, por punção venosa periférica, amostras de 7,5 mL de sangue, em tubo de poliestireno com heparina de sódio (SARSTED, Alemanha). O sangue foi diluído em 1:2 em salina tamponada com fosfato (PBS) (LGC, Brasil), sendo transferido cuidadosamente sobre 15 mL de ficoll histopaque (LGC, Brasil) e centrifugado a 2.000 rpm por 31 minutos (BECKMAN COUTNER, mod. Allegra X-12R). Após a centrifugação, as CMSP que ficaram sobre a camada de Ficoll foram retiradas e lavadas com PBS, por centrifugação, a 1.500 rpm por 11 minutos. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio AIMV (GIBCO, Estados Unidos), suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina. Para a avaliação da viabilidade, as células foram diluídas 1:10, em solução de azul de Tripan, e a contagem realizada em câmara de Neubauer (SIGMA, Estados Unidos). Com uma viabilidade mínima de 90%, as células foram ajustadas para a concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL, sendo distribuídas em duplicatas, em placas de 96 poços (NUNC, Estados Unidos), no volume de 200 µL por poço. Os estímulos aos quais as células foram submetidas foram: a enterotoxina B do *Staphylococcus aureus* (SEB), a 1 µg/mL (SIGMA, Estados Unidos) como controle positivo; as frações proteínas derivadas do *M. leprae*: fração bacteriana total bruta sonicada do *M. leprae* (MLT), a 20 µg/mL, a fração protéica derivada da parede bacteriana do *M. leprae* (MLCwa), a 10 µg/mL, a fração protéica solúvel derivada do *M. leprae* (MLSA), a 10 µg/mL e os peptídeos: p38 derivado da proteína ML0008c, p67 derivado da proteína ML1419c e p69 derivado da proteína ML1419c, todos na concentração de 10 µg/mL, que

foram gentilmente cedidos pelo Dr Brennan, da Universidade do Colorado - EUA e pela Dra. Cristina Pessolani, da FIOCRUZ-RJ. As culturas foram incubadas com 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37°C por cinco dias, sendo seu sobrenadante retirado e estocado a -80°C para análise posterior das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 por ensaio imunoenzimático (ELISA).

### 5.7. Dosagem de IFN- $\gamma$ por ELISA

Os níveis de IFN- $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas estimuladas por diferentes antígenos e proteínas do *M. leprae* foram quantificados por ELISA comercial, conforme recomendações do fabricante (U-CyTech).

A placa (NUNC Maxisorp, Estados Unidos) foi sensibilizada com 100  $\mu$ L de anticorpo de captura diluído em PBS, 0,01 M, pH 7,2, 1:100, sendo a placa incubada a 4°C, por 16 a 18 horas. A placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem (PBS-Tween 20 0,05%, INLAB, Brasil) e adicionados 200  $\mu$ L de solução para bloqueio (PBS-BSA a 1%, LABORCLIN, Brasil), com nova incubação à 37°C, por uma hora. A solução de bloqueio foi retirada sem lavar a placa. As amostras dos sobrenadantes foram diluídas de 1:2 em PBS-BSA 0,5%. O padrão foi diluído no mesmo tampão, em concentrações que variaram de 15,62 pg/mL a 1.000 pg/mL. Foram adicionados 100  $\mu$ L das amostras diluídas e padrões, e realizado nova incubação a temperatura ambiente (26°C), por 16 a 18 horas. O conteúdo da placa foi descartado e foram realizadas quatro lavagens com tampão de lavagem. Foram adicionados 100  $\mu$ L de anticorpo de detecção marcado com biotina diluído em PBS-BSA 0,5%, na diluição 1:100, e a placa foi incubada por uma hora a temperatura de 37°C. O conteúdo foi desprezado e a placa lavada quatro vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados 100  $\mu$ L da solução estreptavidina-peroxidase (Zymed, EUA) diluída de 1:2000 em PBS-BSA a 0,5% seguido de incubação por uma hora a 37°C, no escuro. O líquido foi desprezado e foram realizadas seis lavagens com tampão de lavagem. Foram adicionados 100  $\mu$ L de solução de tetrametilbenzidina (TMB) acrescido de peróxido de hidrogênio, e a reação foi interrompida com 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2,5 N e a leitura realizada em leitor de ELISA (THERMO, Estados Unidos) em filtro 450 nm.

## 5.8. Dosagem de IL-10 por ELISA

Os níveis de IL-10 nos sobrenadantes das culturas estimuladas por diferentes antígenos e proteínas do *M. leprae* foram quantificados por ELISA comercial, conforme recomendações do fabricante (BD-PHARMINGEM, Estados Unidos).

A placa de 96 poços (NUNC Maxisorp, Estados Unidos) foi sensibilizada com 100 µL de anticorpo de captura na concentração de 3 µg/ mL em tampão carbonato-bicarbonato, 0,1 M, pH 9,0, e incubada a 4°C, por 16 a 18 horas. O conteúdo foi desprezado, e a placa foi lavada duas vezes com tampão de lavagem (PBS-Tween 20 0,05%) e em seguida foi realizado bloqueio com PBS-BSA a 1%. A solução de bloqueio foi desprezada sem lavar a placa. Foram adicionados 100 µL das amostras de sobrenadantes e do padrão, em concentrações que variaram de 31,25 pg/mL a 2000 pg/mL. Foi realizada nova incubação a 4°C, por 16 a 18 horas. O conteúdo da placa foi descartado e foram realizadas quatro lavagens com PBS-tween 20 0,05%. Foram adicionados 100 µL de anticorpo de detecção marcado com biotina na concentração de 1,5 µg/mL, e a placa incubada por 2 horas a temperatura ambiente (26° C). O conteúdo da placa foi desprezado e foram realizadas cinco lavagens com PBS-Tween 20 0,05%. Foram adicionados 100 µL da solução estreptavidina-peroxidase diluída 1:2.000, e a placa incubada por 30 minutos, no escuro. O líquido foi desprezado e foram realizadas seis lavagens com tampão PBS-Tween 20 0,05%. Foram adicionados 50 µL de solução de tetrametilbenzidina acrescido de peróxido de hidrogênio (LCG, Brasil), e a reação foi interrompida com 25 µL de ácido sulfúrico 2,5 N e a leitura realizada em leitor de ELISA (E-max, Estados Unidos) em filtro 450 nm.

### 5.9. Detecção de IgM e IgG sérica anti-PGL-1

Antes da revacinação (pré-BCG), foram coletados 4,9 mL de sangue de cada indivíduo para obtenção de soro (SARSTED, Alemanha). A placa de 96 poços (COSTAR, Estados Unidos) foi sensibilizada com 50 µL do antígeno PGL-1 por poço, diluído em álcool absoluto na concentração final de 10 µg/mL. O PGL-1 foi gentilmente cedido por Dr John Spencer, Universidade do Colorado-EUA, e a placa foi incubada à temperatura ambiente (26°C), por 16 a 18 horas. O conteúdo foi desprezado e o bloqueio foi realizado com PBS-BSA a 1%, à temperatura ambiente (26°C), por 2 horas. A solução de bloqueio foi desprezada sem lavar a placa. Foram adicionados as amostras de soro dos contatos diluídos de 1:50 em PBS-BSA a 0,5%, incubando-se a 4°C, por 16 a 18 horas. Adicionou-se o anticorpo de detecção (Ig de cabra anti-IgM, para a quantificação de IgM anti-PGL ou Ig de cabra anti-IgG para a quantificação de IgG anti-PGL, marca SIGMA, Estados Unidos), conjugado com a peroxidase, diluído em 1:1.000 em PBS-BSA 0,05%. Foi realizada uma incubação por 2 horas a 26°C. A solução contendo orthophenylenediamina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (OPD, marca SIGMA, Estados Unidos) foi utilizada como cromógeno tendo o peróxido de hidrogênio como substrato, com a reação interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 2,5 N. As leituras foram realizadas em leitor de ELISA (THERMO, Estados Unidos) em filtro de 492 nm. Os resultados foram expressos como índice, calculado da seguinte forma: o valor médio da D.O. do soro teste foi subtraído do valor do branco dividido pela D.O. média do controle negativo do ensaio. O índice 1.2 foi considerado o limiar de reatividade (*cut-off*) do teste, sendo considerados positivos os valores iguais ou superiores a este.

### 5.10. Análise Estatística

Foram utilizados testes não-paramétricos: o teste de Wilcoxon para amostras pareadas, o teste de Mann-Whitney para amostras não-pareadas, o teste de Fisher para as variáveis qualitativas, o teste de Spearman para as análises de correlação, e o teste de Kruskal- Wallis para análise de três variáveis entre diferentes grupos, com nível de significância  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA E INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO.

Vinte e cinco indivíduos menores de 15 anos, contatos de pacientes com hanseníase, escolhidos de forma randomizada, preencheram os critérios de inclusão, e seus responsáveis legais autorizaram a sua participação em nosso estudo, sendo preenchida uma ficha epidemiológica. Vinte e cinco contatos foram estimulados com as proteínas e treze destes com os peptídeos do *M. leprae*.

A tabela 2 mostra que os contatos dos pacientes com hanseníase apresentaram a mediana da idade de 6 anos, com predomínio de indivíduos do sexo masculino (52%) e de contatos de indivíduos com a forma paucibacilar (54%). O percentual de detecção da cicatriz pela BCG na primeira vacinação e na revacinação foi de 96% e 100%, respectivamente. O tempo médio entre o momento do diagnóstico do caso-índice e a primeira coleta de sangue do contato (pré-BCG) foi de 42 dias. Todos os casos-índice receberam tratamento segundo a forma clínica apresentada.

TABELA 2. Descrição das variáveis dos 25 contatos de pacientes com hanseníase conforme inquérito epidemiológico.

VARIÁVEIS	RESULTADOS
Idade (Mediana)	6 anos (variação de 1 a 12 anos)
Sexo	
Masculino	52% (13/25)
Feminino	48% (12/25)
Classificação caso-índice	
Paucibacilar	48% (12/25)
Multibacilar	52% (13/25)
Cicatriz vacinal pela 1ª BCG	96% (24/25)
Cicatriz vacinal pela revacinação	100% (25/25)
Tempo entre o diagnóstico do caso-índice e a 1ª coleta (dias).	42 dias (1 a 168)

Após sessenta e cinco dias, em média (variação de 61 a 92 dias), da revacinação com a BCG (pós-BCG), foi coletada uma nova amostra de sangue destes vinte e cinco contatos, somente para cultura de células. Dois contatos revacinados com a BCG apresentaram forte ulceração em resposta à vacina, que evoluiu para a formação de quelóide.

Os contatos estavam distribuídos nos bairros mais periféricos da capital e dos municípios vizinhos, sendo que algumas dessas áreas compõem “áreas de risco”, ou regiões hiperendêmicas para hanseníase, **como a regionais 5, 6, 3 e 1** (figura 12).

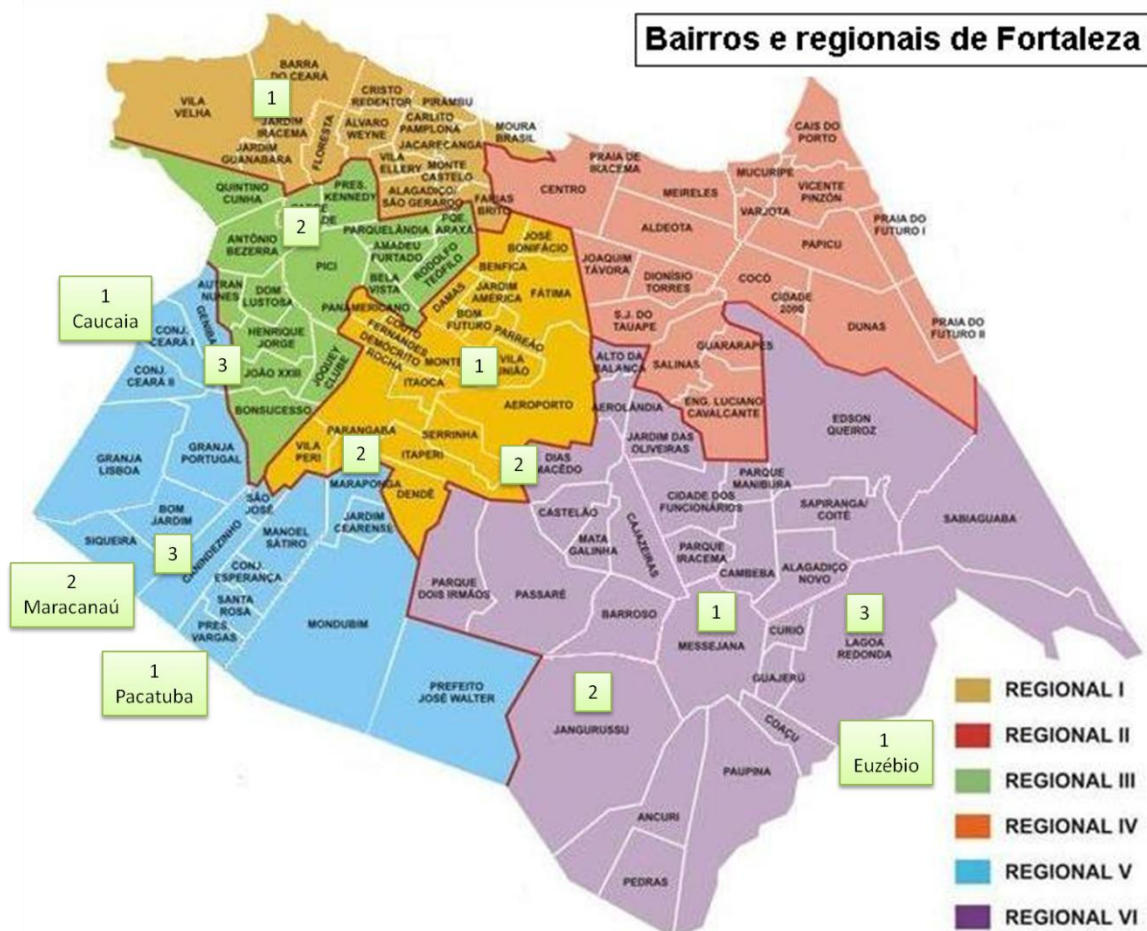


Figura 12. Distribuição da casuística por bairro do município de Fortaleza e região metropolitana. Adaptado a partir do site [www.fortaleza.ce.gov.br](http://www.fortaleza.ce.gov.br).

Destes contatos, 96% (24/25) eram naturais de Fortaleza e região metropolitana, sendo um nascido no interior do estado do Ceará e outro proveniente do Distrito Federal.

Foi identificado parentesco entre o caso-índice e o contato em todos os contatos entrevistados. Destes contatos, 36% (9/25) eram avós, 60% (15/25) eram pai ou mãe, 4% (1/25) eram tios.

Foi relatado convívio diário com o caso-índice por 84% (21/25) dos contatos, seguido de 16% (4/25) que relataram convívio semanal. Em nenhuma das famílias houve relato de mudança no comportamento entre os contatos e o caso-índice após o diagnóstico, sendo mantidos o convívio e o compartilhamento de objetos de uso coletivo e pessoal entre eles.

## 6.2. VISITA DOMICILIÁRIA E ADMINISTRAÇÃO DO PPD.

As visitas domiciliares contemplaram 18 famílias, das quais são provenientes os contatos de pacientes com hanseníase que integraram este trabalho.

Foram realizadas ações de educação em saúde com estes indivíduos, identificados os contatos faltosos a consulta no posto de saúde, seguindo-se do exame clínico e quando sadios, foi administrada a vacina BCG nos outros contatos (crianças e adultos) que não haviam recebido a vacina no Centro de Saúde (Projeto de Extensão Universitária vinculado à Pesquisa).

A administração do PPD se desenrolou no decorrer da visita domiciliária, com o procedimento sendo realizado em todos os contatos da casuística do nosso estudo e sua leitura realizada entre 72 a 96 horas, sempre pelo mesmo observador.

Dos vinte e cinco contatos, nos quais foi realizado o teste tuberculínico pós-BCG, 64% (16/25) foram reatores (variação da leitura de 5 a 17 mm) e 36% (9/25) não reatores (variação da leitura de 0 a 4 mm).

Não houve relação entre o resultado do teste tuberculínico com outras variáveis testadas, tais como idade, sexo e forma clínica do caso-índice (Tabela 3).

Tabela 3. Análise da resposta ao teste tuberculínico (PPD) e as variáveis idade, sexo e forma clínica do caso-índice de 47 contatos de pacientes com hanseníase.

PPD (N=25)	NÃO-REATOR (N = 9)	REATOR (N= 16)	P
<b>Idade (mediana)</b>	6 anos (variação de 1 a 10 anos)	6 anos (variação de 2 a 12 anos)	ns*
<b>Sexo</b>			
<b>Masculino</b>	3	10	ns**
<b>Feminino</b>	16	6	
<b>Caso-índice</b>			
<b>Multibacilar</b>	5	8	ns**
<b>Paucibacilar</b>	4	8	

\*Teste "t" de Student. \*\*Teste de Fisher, nível de significância de  $p < 0,05$



### 6.3. RESPOSTAS DOS CONTATOS FRENTE ÀS PROTEÍNAS DO *M. leprae*.

#### 6.3.1. A REVACINAÇÃO COM A BCG MODULA A PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$ E DE IL-10 FRENTE AO ESTÍMULO COM PROTEÍNAS DO *M. leprae* DE FORMA ESPECÍFICA, PRINCIPALMENTE FRENTE AO MLT (EXTRATO BRUTO).

Em vinte e cinco contatos foram obtidas amostras pareadas (pré e pós-BCG) de células mononucleares de sangue periférico, que foram submetidas a estímulos frente aos extratos protéicos derivados do *M. leprae* e ao mitógeno SEB.

A tabela 4 mostra a média da produção de citocinas com seus respectivos erros padrões frente aos estímulos protéicos do *M. leprae* dos 25 contatos de pacientes com hanseníase, pré-BCG e pós-BCG. Em apenas um contato não foi possível quantificar as citocinas frente ao estímulo com mitógeno, pós-BCG.

Identificamos uma grande variação na produção de IFN- $\gamma$  e de IL-10 frente aos extratos protéicos derivados do *M. leprae*, principalmente de IFN- $\gamma$ .

A produção das citocinas frente ao “superantígeno” SEB ocorreu segundo o esperado, com estimulação linfocitária tanto para a produção de IFN- $\gamma$  como para IL-10.

Identificamos que, após a revacinação com a BCG (pós-BCG), houve um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  frente ao MLT nestes contatos ( $p=0,0003$ ). Foram também observadas o aumento médio das concentrações desta citocina frente as outras frações protéicas (MLSA e MLCwa), mas sem significado estatístico (Tabela 4, Figura 13).

Tabela 4. Análise da produção de citocinas por 25 contatos, pareados, antes da BCG (pré-BCG) e após a revacinação com a BCG (pós-BCG) frente ao mitógeno (SEB) e frente aos extratos protéicos derivados do *M. leprae* (MLT, MLSA e MLCwa).

ESTÍMULO	Pré-BCG	Pós-BCG	<i>p</i> **
	Media ± SEM (variação)	Media ± SEM (variação)	
<b>SEB</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	8800,0 ± 526,1 (4.433 – 14.290)	9171,0 ± 417,9 (6.343 – 13.380)#	ns
IL-10 (pg/mL)	932,3 ± 90,33 (298,7 – 1.955)	1189,0 ± 106,4 (68,6 – 1900)	0,0229
<b>MLT</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	4747,0 ± 544,8 (309,9 – 10.100)	8717,0 ± 636,1 (3428 – 16.040)	0,0003
IL-10 (pg/mL)	263,5 ± 44,0 (40 – 1027)	666,2 ± 72,9 (127,1 – 1432)	0,0004
<b>MLSA</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	5831,0 ± 597,0 (0 – 11.530)	7389,0 ± 689,1 (1.703 – 13.070)	ns
IL-10 (pg/mL)	261,6 ± 39,9 (0 – 695,4)	343,3,0 ± 42,2(44,1 – 708,4)	ns
<b>MLCwa</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	5925,0 ± 787,4 (0 – 13.180)	6696,0 ± 573,5 (2.580– 12.140)	ns
IL-10 (pg/mL)	285,4 ± 28,71 (85,4 – 572,3)	348,7 ± 44,0 (63,9 – 775,4)	ns

#SEB pós-BCG (N=24). \*\*Teste de Wilcoxon, nível de significância  $p < 0,05$ .

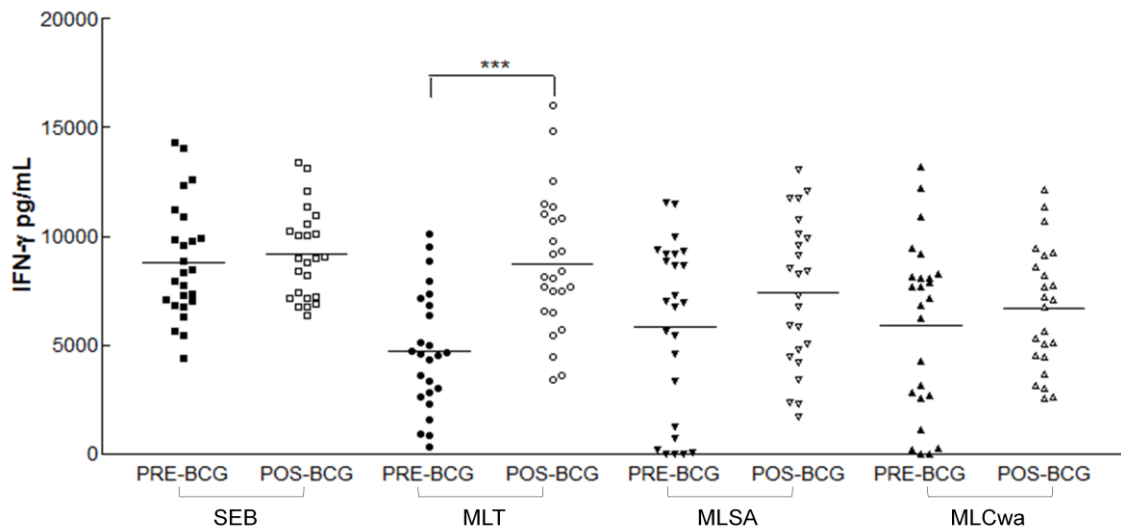


Figura 13. Produção de IFN- $\gamma$  pelos contatos de pacientes com hanseníase frente ao mitógeno e às proteínas do *M. leprae*, antes (pré-BCG) e após (pós-BCG) a revacinação com a BCG. n=25, \*\*\*MLT pré-BCG x pós-BCG, p=0,0003, teste de Wilcoxon, nível de significância p<0,05.

Na pré-BCG, identificamos que a produção de IFN- $\gamma$  sob o estímulo com o mitógeno SEB foi significativamente superior à produção desta citocina frente aos outros estímulos, com exceção da produção frente ao peptídeo p67, que não houve diferenças significativas nos níveis de IFN- $\gamma$ . Entretanto, na pós-BCG, a produção de IFN- $\gamma$  frente ao estímulo com o mitógeno foi significativamente superior apenas quando comparada aos níveis frente à proteína MLCwa (p=0,0046) e ao peptídeo p69 (p<0,0001, teste de Mann-Whitney).

Na pós-BCG, identificamos o aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  frente ao MLT somente quando comparada sua produção ao MLCwa (p=0,0332, Teste de Mann-Whitney), sem diferenças significativas frente aos outras proteínas testadas.

A análise da produção de IFN- $\gamma$  frente aos peptídeos específicos do *M. leprae* é mostrada na tabela 5. Observamos a capacidade dos peptídeos p38, p67 e p69 em expandir clones específicos produtores de IFN- $\gamma$  nestes contatos, com variações entre as respostas.

Identificamos que, na pós-BCG, houve um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  frente ao estímulo com o peptídeo p69 (p=0,0048). Entretanto, foi observado o aumento médio na produção desta citocina frente a todos os peptídeos específicos do *M. leprae*, mas sem significado estatístico.

A resposta dos contatos ao antígeno p69 foi significativamente inferior quando comparada a resposta aos antígenos protéicos e aos outros peptídeos, sendo o p69 o peptídeo que possuiu a menor média de produção de IFN- $\gamma$  e de IL-10 entre os estímulos testados neste trabalho (Tabela 5).

Tabela 5. Análise da produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 dos contatos, pareados, pré-BCG e pós-BCG, frente aos peptídeos p38, p67 e p69.

ESTÍMULO	Pré-BCG	Pós-BCG	$p^*$
	Media $\pm$ SEM (variação)	Media $\pm$ SEM (variação)	
<b>P38 n=11</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	5676 $\pm$ 812,6 (1.073 – 10.720)	6409 $\pm$ 1231,0 (0 – 14.530)	ns
IL-10 (pg/mL)	152,2 $\pm$ 39,76 (19,1 – 475,7)	345,5 $\pm$ 69,95 (6,4 – 684,7)	0,0215
<b>P67 n=11</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	7379,0 $\pm$ 1130,0 (828,5 – 13.170)	8.016,0 $\pm$ 1260,0 (778,7 – 12.810)	ns
IL-10 (pg/mL)	202,9 $\pm$ 46,97 (15,4 – 521,4)	368,9 $\pm$ 74,72 (20 – 768,8)	ns
<b>P69 n=11</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	448,2 $\pm$ 331,8 (0 – 3.703)	2050,0 $\pm$ 869,6 (207,4 – 8077)	0,0048
IL-10 (pg/mL)	32,02 $\pm$ 74,72 (20 – 768,8)	113,0 $\pm$ 23,4 (1300 – 249,3)	0,0171

\*Teste de Wilcoxon, nível de significância  $p < 0,05$

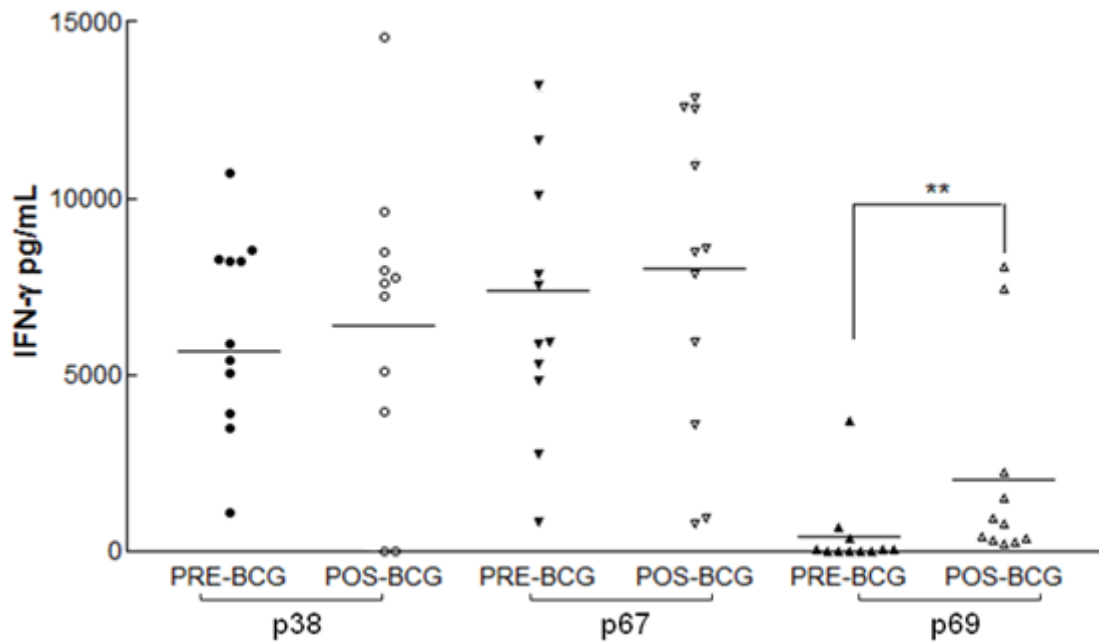


Figura 14. Produção de IFN- $\gamma$  pelos contatos de pacientes com hanseníase frente aos peptídeos derivados do *M. leprae*, antes (pré-BCG) e após (pós-BCG) a revacinação com a BCG. P69 pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0048$ .

Quanto à produção de IL-10 por estes contatos, identificamos um aumento significativo na produção desta citocina frente aos estímulos com o mitógeno (SEB),  $p=0,0229$ , e com o extrato bruto (MLT),  $p=0,0004$  (Tabela 4, Figura 15).

Frente ao estímulo com o extrato solúvel (MLSA), de parede (MLCwa) e o peptídeo p67, embora tenha havido aumento na produção de IL-10 na pós-BCG, não identificamos diferenças significativas após a revacinação.

Quanto à resposta aos peptídeos, identificamos um aumento significativo da produção de IL-10, pós-BCG, frente aos peptídeos p38 e p69 ( $p = 0,0215$  e  $p=0,0171$ , respectivamente).

Identificamos que a produção de IL-10 frente ao p69 foi significativamente inferior quando comparadas a produção desta citocina frente aos outros estímulos, proteínas e peptídeos, tanto na pré-BCG quanto na pós-BCG ( $p<0,05$ , teste Mann-Whitney).

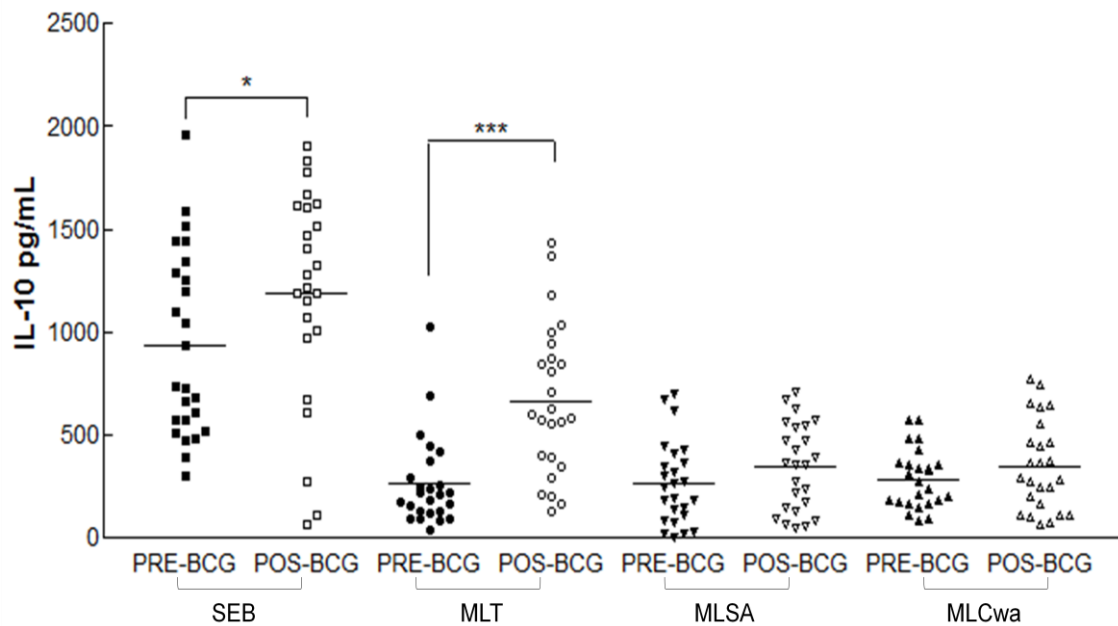


Figura 15. Produção de IL-10 pelos contatos de pacientes com Hanseníase frente ao mitógeno e às proteínas do *M. leprae*, antes (pré-BCG) e após (pós-BCG) a revacinação com a BCG.  $n=25$ , \*SEB pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0220$ \*\*MLT pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0004$ , teste de Wilcoxon, nível de significância  $p<0,05$ .

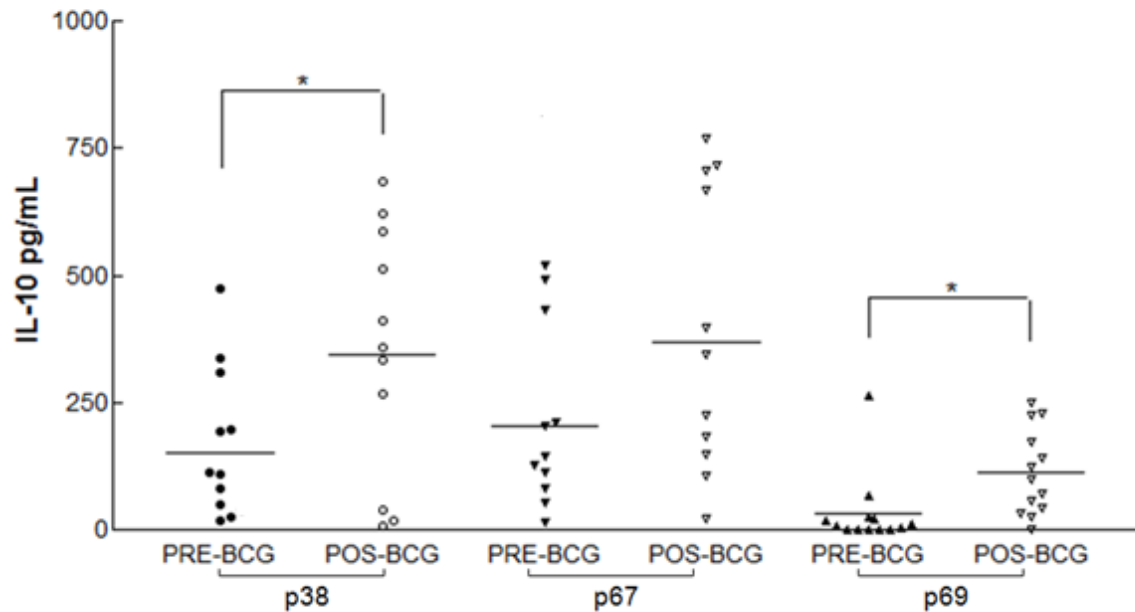


Figura 16. Produção de IL-10 pelos contatos de pacientes com hanseníase frente aos peptídeos derivados do *M. leprae*, antes (pré-BCG) e após (pós-BCG) a revacinação com BCG. \*p38 pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0215$  e p69 pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0171$  teste de Wilcoxon. Nível de significância  $p<0,05$ .

### 6.3.2. A REVACINAÇÃO COM A BCG MODULA A PRODUÇÃO DE CITOCINAS FRENTE AO ESTÍMULO COM O MLT, COM PADRÕES DISTINTOS ENTRE AS DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS E FORMA CLÍNICA DO CASO ÍNDICE.

A partir da análise da produção de IFN- $\gamma$  e de IL-10 por CMSP frente ao estímulo com antígeno MLT, pré e pós-BCG, os contatos foram avaliados de acordo com sua distribuição segundo as faixas etárias de 1 a 4 anos; de 5 a 9 anos e de 10 a 15 anos. Esta divisão é a utilizada atualmente pelo Ministério da Saúde, para a descrição da distribuição por idade de indivíduos com hanseníase. A produção das citocinas frente ao MLT também foi analisada segundo a forma clínica do caso-índice e a resposta ao PPD, mostrados na tabela 6.

Tabela 6. Análise dos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10, frente ao estímulo com MLT, dos contatos de pacientes com hanseníase de acordo com a faixa etária, classificação do caso-índice, e reação ao PPD, pré-BCG e pós-BCG.

<b>PARÂMETRO</b>	<b>Pré-BCG</b> Media $\pm$ SEM (variação)	<b>Pós-BCG</b> Media $\pm$ SEM (variação)	<b>p*</b>
<b>FAIXA ETÁRIA (N=25)</b>			
<b>01 a 04 anos (N=8)</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	4203,0 $\pm$ 539,2 (2625 – 7372)	9141,0 $\pm$ 860,9 (5683 – 12.510)	0,015
IL-10 (pg/mL)	328,5 $\pm$ 109,6 (40 – 1027)	751,1 $\pm$ 169 (199,2 – 1.432)	ns
<b>05 a 09 anos (N=11)</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	4912 $\pm$ 1065 (309,9 – 10.100)	9249,0 $\pm$ 1171 (3.428 – 16.040)	0,024
IL-10 (pg/mL)	210,6 $\pm$ 39,4 (84,8 – 449,7)	680,3 $\pm$ 76,74 (212 – 1033)	0,001
<b>10 a 15 anos (N=6)</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	5170 $\pm$ 1054 (2.314 – 9507)	7.178,0 $\pm$ 1027 (3.643 – 10.850)	ns
IL-10 (pg/mL)	273,9 $\pm$ 92,0 (117 – 691,3)	527,4 $\pm$ 160,2 (127 – 117,9)	ns
<b>CASO-ÍNDICE (N=25)</b>			
<b>MB (N=13)</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	4536,0 $\pm$ 543,1 (863,6 – 7372)	9263,0 $\pm$ 989,0 (3.643 – 16.040)	0,0012
IL-10 (pg/mL)	235,9 $\pm$ 46,5 (84,8 – 691,3)	743,5 $\pm$ 87,8 (168,5 – 1.370)	0,0002
<b>PB (N=12)</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	4975,0 $\pm$ 995,8 (309,9 – 10.100)	8126,0 $\pm$ 788,6 (3.428 – 12.510)	0,0342
IL-10 (pg/mL)	293,5 $\pm$ 78,1 (40 – 1027)	582,5 $\pm$ 117,7 (127 – 1432)	ns
<b>PPD (N=25)</b>			
<b>Não reator (N=9)</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	4248 $\pm$ 902,6 (309,9 – 8882)	8820 $\pm$ 294,6 (3.428 – 14.860)	0,0195
IL-10 (pg/mL)	219,8 $\pm$ 64,3 (40 – 691,3)	812,4 $\pm$ 106,4 (346,1 – 1.432)	0,0039
<b>Reator (N=16)</b>			
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	5028 $\pm$ 695 (867,6 – 10.100)	8860 $\pm$ 712,8 (4.502 – 16.040)	0,0047
IL-10 (pg/mL)	288,2 $\pm$ 59,1 (84,8 – 1.027)	584 $\pm$ 93,0 (127,1 – 1.370)	0,0158

\*Teste de Wilcoxon, com nível de significância < 0,05

Com a revacinação, identificamos o aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  na faixa etária de 1 a 4 anos ( $p=0,0156$ ), mas não dos níveis de IL-10. Na faixa etária de 5 a 9 anos, foi observado aumento significativo dos níveis de IFN- $\gamma$  ( $p=0,0244$ ) e de IL-10 ( $p=0,001$ ), e na faixa etária de 10 a 15 anos, os níveis de IFN- $\gamma$  e os de IL-10 não sofreram alterações significativas (Tabela 6 e figuras 17 e 18).

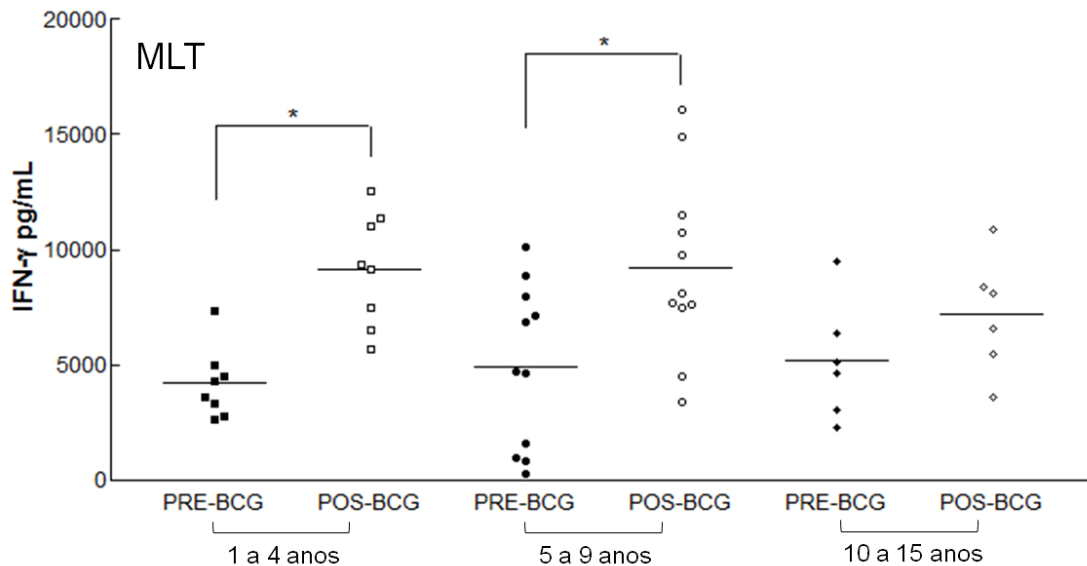


Figura 17. Produção de IFN- $\gamma$  dos contatos de pacientes, pré-BCG e pós-BCG, frente ao MLT nas diversas faixas etárias. \* 1 a 4 anos pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0156$ . 5 a 9 anos pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0244$ , teste de Wilcoxon.

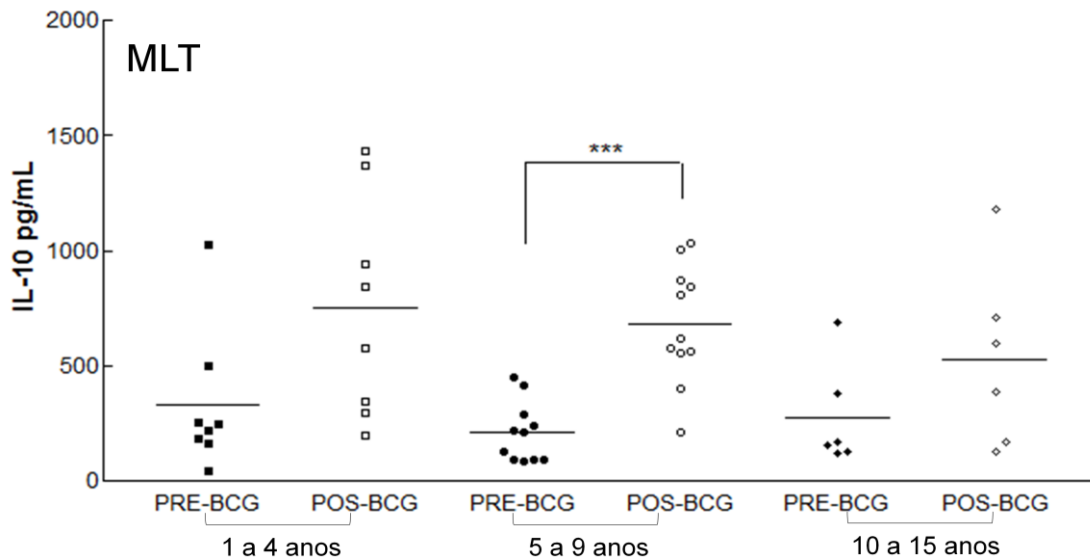


Figura 18. Produção de IL-10 dos contatos de pacientes, pré-BCG e pós-BCG, frente ao MLT nas diversas faixas etárias. 5 a 9 anos pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0010$ , teste de Wilcoxon.



A análise da produção de citocinas dos contatos agrupados de acordo com a classificação operacional do caso índice mostrou que, os contatos de pacientes multibacilares (MB) possuem um padrão de resposta distinto dos contatos de pacientes paucibacilares (PB). Identificamos um aumento significativo na produção tanto de IFN- $\gamma$  como de IL-10 nos contatos de pacientes MB ( $p=0,0012$  a  $p=0,0092$ , respectivamente). Entretanto, nos contatos de pacientes PB a revacinação aumenta de forma significativa a produção apenas de IFN- $\gamma$  ( $p=0,0342$ ). O aumento de IL-10 nos contatos de pacientes MB foi em média três vezes maior após a revacinação, enquanto que, nos contatos de pacientes PB, os níveis de IL-10 não sofreram alterações após a revacinação (Tabela 6, Figura 19).

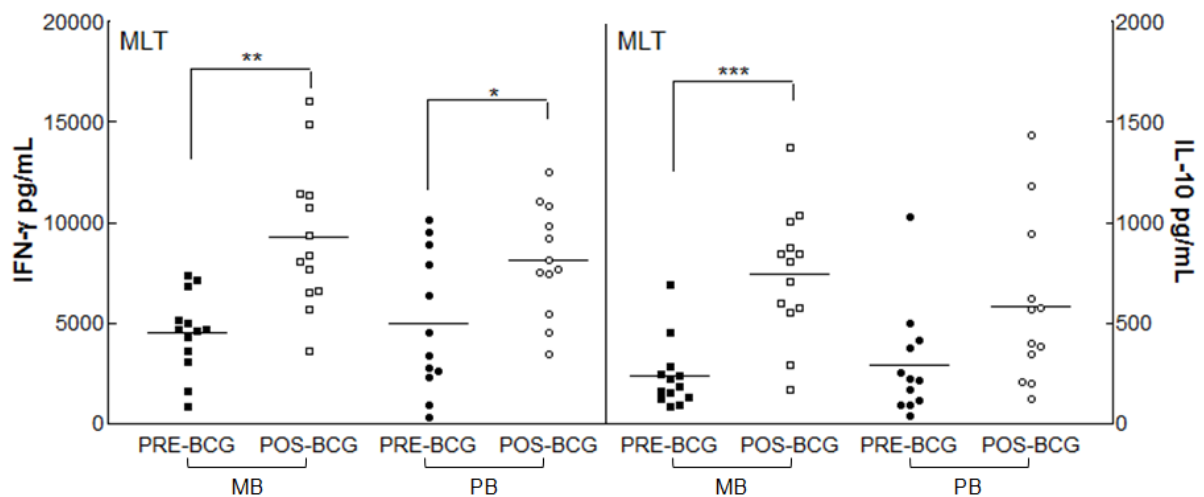


Figura 19. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 frente ao MLT dos contatos de pacientes, agrupados de acordo com a forma clínica do caso índice, MB- multibacilar e PB-paucibacilar, na pré-BCG e pós-BCG. IFN- $\gamma$  \*\*MB: pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0012$ ; \*PB: pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0342$ . IL-10 \*\*\*MB pré-BCG x pós-BCG,  $p=0,0002$ , teste de Wilcoxon.

A análise da produção de citocinas pelos contatos agrupados de acordo com a reatividade ao teste de PPD mostrou que estes contatos apresentam padrões semelhantes de resposta. Identificamos um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  e de IL-10 nos indivíduos reatores e não-reatores (Tabela 6, Figura 20).

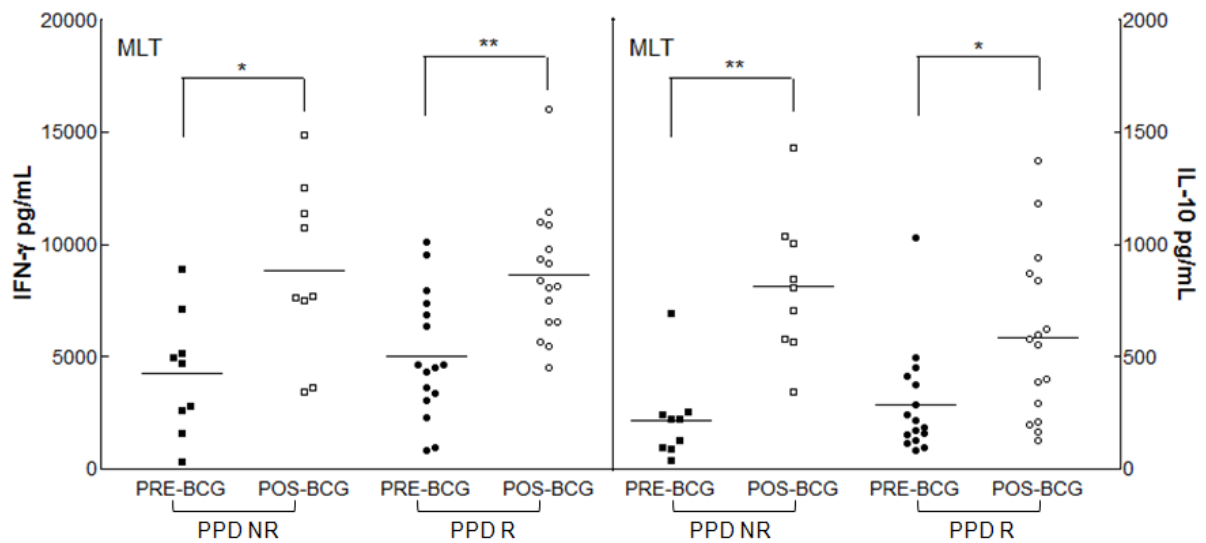


Figura 20. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 pelos contatos reatores (R) e não reatores (NR) ao PPD, frente ao MLT, antes (pré-BCG) e após (pós-BCG) a revacinação com a BCG. n=25. IFN- $\gamma$ : \*PPD NR pré-BCG x pós-BCG, p=0,0195, \*\*PPD R Pré-BCG x Pós-BCG, p=0,0047. IL-10: \*\*PPD NR pré-BCG x pós-BCG, p=0,0039. \*PPD R Pré-BCG x Pós-BCG, p= 0,0158. Teste de Wilcoxon, nível de significância p<0,05.

### 6.3.3. A RELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$ E DE IL-10, ANTES E APÓS A BCG, MOSTRA QUE O PADRÃO DE RESPOSTA DE CADA CONTATO É SEMELHANTE FRENTE AOS VÁRIOS ESTÍMULOS.

Através da relação entre a produção de IFN- $\gamma$  e a IL-10 pelos contatos frente as proteínas do *M. leprae*, observamos que o padrão de resposta desenvolvido pelos contatos de pacientes com hanseníase são semelhantes entre os diferentes antígenos testados, sendo esta correlação mantida após a revacinação com a BCG.

Identificamos uma forte correlação positiva entre a relação IFN- $\gamma$ /IL-10 frente ao MLT quando comparadas aos outros antígenos (SEB, MLSA e MLCwa), sendo a maior desta correlação quando comparada ao MLSA. Frente a este antígeno solúvel (MLSA) e frente ao extrato bruto (MLT), verificamos a existência de uma forte correlação positiva antes da revacinação (p<0,0001, teste de correlação de Spearman, r=0,8104) que se manteve após a

revacinação ( $p < 0,0001$ , teste de correlação de Spearman,  $r = 0,7841$ ). (Figuras 20 e 21).

Apesar da manutenção do padrão de resposta, na pós-BCG, observamos que os contatos aumentam a produção de IFN- $\gamma$  de forma superior a de IL-10, fazendo com que aqueles cuja relação encontravam-se próximo ao marco zero no gráfico, passassem a ter uma relação positiva, que também foi verificada frente aos outros estímulos protéicos testados (Figura 22).

O espectro de padrão de resposta, definido como os valores obtidos entre a relação IFN- $\gamma$  e IL-10 frente ao estímulo com o MLT, mostrou variações entre 4,8 a 55,3 na pós-BCG.

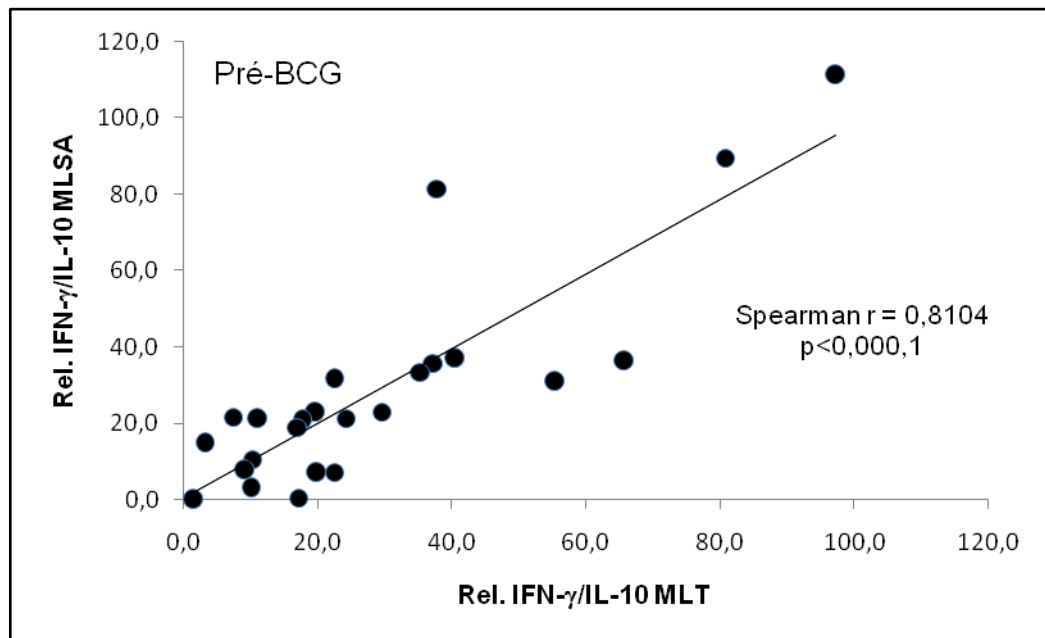


Figura 21. Análise da correlação entre os valores de IFN- $\gamma$ /IL-10 frente ao estímulo com o MLSA e com o MLT, pré-BCG. Valores da relação expressos em escala logarítmica na base 10. Teste de Spearman,  $r = 0,8104$ ,  $p < 0,0001$ .

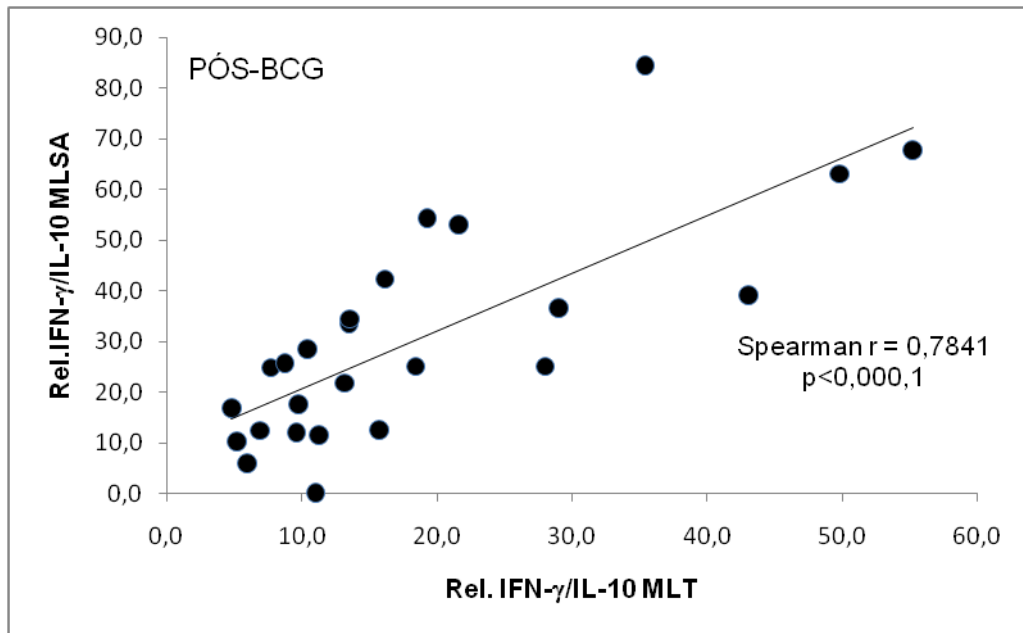


Figura 22. Análise da correlação entre os valores de IFN- $\gamma$ /IL-10 frente ao estímulo com o MLSA e com o MLT, pós-BCG. Valores da relação expressos em escala logarítmica na base 10. Teste de Spearman,  $r = 0,7841$ ,  $p < 0,0001$ .

#### 6.3.4. ANTES DA REVACINAÇÃO COM A BCG, A PRESENÇA DE SOROLOGIA POSITIVA PARA ANTICORPOS ANTI-PGL-1 NÃO INTERFERE NA RESPOSTA DE CITOCINAS DESTES CONTATOS AO ESTÍMULO COM O MLT.

A sorologia para anti-PGL-1 foi realizada nos 50 contatos de pacientes com hanseníase sendo a detecção de IgM positiva (índice  $\geq 1,2$ ) em 48% (24/50), e a detecção de IgG negativa em todos. Os níveis de IgM anti-PGL-1 não foram diferentes quanto às variáveis idade, sexo, forma clínica do caso-índice e resposta ao PPD. Naquela casuística estão contidos os 25 contatos, cujas dosagens de citocinas foram obtidas de forma pareada (pré e pós-BCG).

A análise entre a produção de anticorpos anti-PGL-1 pelos 25 contatos e a dosagem de citocinas mostrou que a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 aumenta significativamente nos contatos com sorologia positiva e negativa, demonstrando que a presença de tais anticorpos não interfere na resposta por citocinas e não é consequência desta (Figura 23).

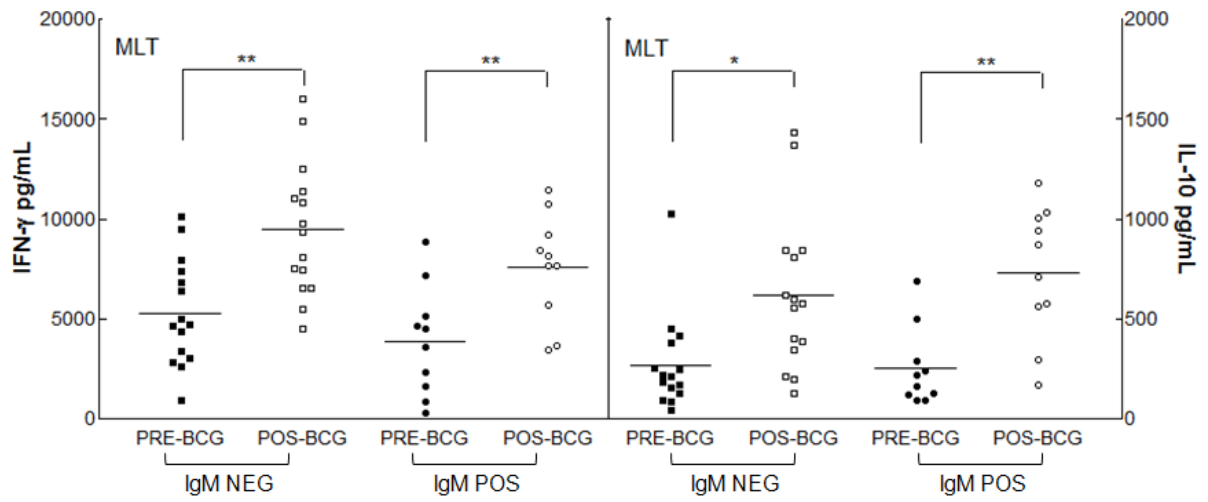


Figura 23. Produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 pelos contatos com a sorologia positiva para IgM anti-PGL-1 (IgM POS) e sorologia negativa (IgM NEG) frente ao MLT pré-BCG e pós-BCG.

## 7. DISCUSSÃO.

O primeiro indício de que a BCG poderia ser utilizada como medida profilática na hanseníase ocorreu em 1939, com o cientista Fernandez, que percebeu a capacidade do inoculado intradérmico com o *Mycobacterium bovis* atenuado (Bacilo de Calmette-Guérin) em converter o teste de Mitsuda, que contém o *M. leprae* morto, de negativo para positivo (NOORDEEN, 2000).

A recomendação da Organização Mundial de Saúde para o uso da BCG, como estratégia na prevenção da disseminação da hanseníase entre os contatos dos pacientes com hanseníase, proporcionou estudos epidemiológicos, cujo objetivo principal foi o de verificar a eficácia da vacina.

Os resultados destes estudos epidemiológicos intrigam a toda a classe científica, pois a BCG tem demonstrado diferentes taxas de eficácia entre as populações, como as encontradas pela compilação de estudos realizados por Setia e cols. (2006) (variação de 14% até 37%), estudos em regiões endêmicas no Brasil por Cunha e cols. (2004) e Düpre e cols. (2008) (74% e 54%), e em estudos realizados na Índia e em Malawi por Zodpey, (2005) e KARONGA group, (1996) cuja proteção foi cerca de 50%.

Nosso estudo contribui para o esclarecimento do possível papel da revacinação com a BCG na resposta imune desenvolvida pelos contatos de pacientes com hanseníase, frente a exposição, *in vitro*, as proteínas do *M. leprae*.

Em nossa casuística, a cicatriz da BCG mostrou-se um bom indicador de vacinação prévia como descrito por Rodrigues e cols. (2007), com uma frequência de 96% dos contatos com a escara da BCG ao nascer. Em um dos contatos a escara pela BCG estava ausente, mesmo com a comprovação de sua administração via cartão vacinal do Ministério da Saúde.

Referindo-se a avaliação da eficácia vacinal pela responsividade dos contatos ao teste tuberculínico, foi expressiva a quantidade de não-reatores após os sessenta dias da revacinação. Nos estudos que verificaram a reatividade ao PPD, após a administração da BCG, na população de contatos de pacientes com hanseníase, como o de Botasso e cols. (1998) e Düpre e cols. (1990), a anergia ao PPD relatada nesses trabalhos foi semelhante a encontrada por nós na população de contatos. Entretanto, em estudos cuja avaliação da escara da BCG ocorre em casuísticas com exposição a outras micobactérias, como em contatos de *M.*

*tuberculosis* (JOOS e cols. 2006; BRIASSOULIS e cols. 2005 e BARBOSA e cols. 2003) a reatividade ao PPD relatada foi superior a encontrada em nosso estudo.

Todos os contatos responderam *in vitro* as frações do *M. leprae* com produção de IFN- $\gamma$  e IL-10. Nossos dados estão de acordo com os de Spencer e cols. (2005) que obtiveram respostas por IFN- $\gamma$  de todos os contatos frente ao antígeno MLT, e conforme Lima e cols. (2000) que detectaram respostas por IFN- $\gamma$  e IL-10 em contatos de pacientes com hanseníase após a revacinação com a BCG. Algumas considerações devem ser feitas sobre o estudo de Lima e cols. (2000), pois sua casuística foi composta por oito contatos, cuja dosagem de IFN- $\gamma$  foi realizada apenas frente ao MLT, um ano após a primeira dose da BCG e quinze dias após a revacinação, sendo a dosagem de IL-10 realizada em 24 horas de incubação das células mononucleares.

Nosso estudo contribui na perspectiva da análise da resposta imune de contatos de pacientes com hanseníase frente às principais frações protéicas do *M. leprae* descritas na literatura e três promissores peptídeos para triagem diagnóstica, numa população pouco explorada, a de menores de 15 anos, cujo efeito da revacinação com a BCG é desconhecido.

A resposta ao superantígeno SEB foi compatível a cinética realizada por Reddy e cols. (2004), mostrando níveis superiores de IFN- $\gamma$  e IL-10, na pré e pós-BCG, do que os outros antígenos testados.

Observamos um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e de IL-10, frente ao MLT, após a revacinação com a BCG. Lima e cols. (2000), em seu estudo, sugerem que o aumento simultâneo do IFN- $\gamma$  e da IL-10 pode estar relacionado a um evento necessário para a homeostase da resposta imune, como no controle para uma resposta inflamatória exacerbada produzida pelo IFN- $\gamma$ .

Em nosso estudo, os contatos apresentaram um perfil de produção média de IFN- $\gamma$  superiores ao de IL-10 e este padrão de produção de IFN- $\gamma$  envolve-se na resistência à infecção pelo *M. leprae*. A participação do IFN- $\gamma$  como uma citocina crucial para o desenvolvimento de uma resposta eficaz contra o *M. leprae* vem a partir dos estudos envolvendo pacientes com hanseníase e sua resposta imune *in vitro* as proteínas e derivados protéicos, como o de Spencer e cols. (2005), sendo encontrado um perfil de alta produção de IFN- $\gamma$  naqueles pacientes com resposta satisfatória a micobactéria (forma tuberculóide) e a ausência de IFN- $\gamma$  ou seus baixos níveis naqueles com a forma mais grave da doença (forma virchowiana).

Observamos que o desempenho da BCG em induzir uma resposta por produção de IFN- $\gamma$ , crucial para a ativação dos macrófagos na infecção pelo *M. leprae*, diminui com o aumento da idade do contato. Identificamos uma regulação positiva significativa nos níveis de IFN- $\gamma$ , após a BCG, restrita aos contatos da faixa etária de 1 a 4 anos. Entretanto, identificamos um aumento nos níveis de IL-10, conjuntamente com os níveis de IFN- $\gamma$ , induzidos após a revacinação, nos contatos da faixa etária entre 5 a 9 anos. Os estudos populacionais, como os realizados por Setia e cols. (2006), Ferreira & Alvares (2005); Ferreira & Antunes (2008) remetem informações que podem ser relevantes. Estes estudos apontam para a possível perda da capacidade protetora da BCG com o aumento da idade, acompanhada epidemiologicamente com o aumento dos casos de hanseníase a partir da idade de 5 anos (CEARÁ, 2010). A incidência de casos de hanseníase na faixa etária de 5 a 9 anos é cinco vezes maior que na faixa etária de 1 a 4 anos. Entretanto, no estudo caso-controle realizado por Rodrigues e cols. (2007), a proteção conferida pela BCG neonatal se estendeu além dos 30 anos de idade, tendo como parâmetro a presença de cicatriz e o desenvolvimento da hanseníase. Deve-se salientar neste estudo que a análise dos contatos iniciou-se a partir da faixa etária de 18 anos.

Achamos que a resposta por aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  nos contatos de 1 a 4 anos esteja relacionada à clones de linfócitos de memória, residuais da primeira dose da BCG ao nascer, que estão estimulando a resposta por IFN- $\gamma$  após a revacinação, e contribuindo para um ambiente de ativação macrofágica e de novos linfócitos T específicos para o *M. leprae* e produtores de IFN- $\gamma$ . Consideramos que a resposta com presença de altos níveis de IFN- $\gamma$ , em detrimento aos níveis de IL-10, contribua para a eliminação do *M. leprae* em caso de infecção. Esse cenário *in vitro* pode justificar o achado epidemiológico da incidência rara da doença em crianças na faixa etária inferior a 4 anos.

Na faixa etária de dez a quinze anos, a revacinação com a BCG não interfere na produção de citocinas, e pode significar que, o benefício promovido pela revacinação é dependente da presença anterior de estimulação, ou pela vacinação ou pelo ambiente. Nos dados epidemiológicos remetidos por Ceará (2010), a faixa etária de 10 a 15 anos possui incidência de casos de hanseníase 12 vezes superior que na faixa etária de 1 a 4 anos. Acreditamos que, na medida em que ocorre a perda da eficácia da BCG com o aumento da idade, a exposição ao *M. leprae* pode reverter à resposta do contato para um padrão de susceptibilidade e adoecimento.



É relatado por Britton & Lockwood (2004) que os componentes da parede celular micobacteriana, como o lipoarabinomanama (LAM) e o glicolípido fenólico, são potentes imunógenos para o fomento da resposta imune humoral, com produção de anticorpos, além das propriedades para desativar macrófagos e neutrófilos, diminuindo a expressão de moléculas coestimulatórias nas células dendríticas.

Esses achados sugerem que a estimulação frequente destes contatos pela exposição ao *M. leprae*, em decorrência do contato direto com os pacientes, independente da forma clínica, e conjuntamente com a perda da eficácia da BCG, favoreça a habilidade do *M. leprae* em modular a resposta imune para um padrão de citocinas tipo Th2, promovendo a disseminação do bacilo com o decorrer dos anos e adoecimento.

Quanto à resposta aos peptídeos, identificamos que são reconhecidos de forma específica pelos contatos, uma vez que estes peptídeos não têm identidade com sequências genômicas do *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. ulcerans* e *M. para-tuberculosis* (SPENCER e cols. 2005).

O p69 mostrou-se o menos imunogênico dentre os peptídeos testados em nosso estudo, enquanto que o p67 estimulou de forma significativa, a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10, na pré e na pós-BCG, em comparação aos peptídeos p38 e p69.

A presença de respondedores aos peptídeos na população de contatos corrobora o trabalho de Spencer e cols. (2005) cuja produção de IFN- $\gamma$  frente a estes peptídeos foi obtida nos pacientes e seus contatos, sendo a produção de IFN- $\gamma$  ausente nos contatos de área endêmica e nos pacientes com tuberculose. A resposta ao estímulo com o p69 foi obtida apenas na população de contatos e nos pacientes paucibacilares, sob um *cut-off* de 125 pg/mL.

Apesar de não constituir identidade genômica com o *M. bovis*, identificamos entre os peptídeos a regulação positiva na produção de IL-10 frente ao p38, mas não de IFN- $\gamma$ , após a revacinação com a BCG. Enquanto que, frente ao p69, foi observada uma regulação positiva na produção de IFN- $\gamma$  e de IL-10, após a revacinação, indicando que mesmo específicos, os clones ativados frente ao estímulo com os peptídeos do *M. leprae*, podem sofrer influências da resposta promovida pelos linfócitos ativados frente a BCG.

Acreditamos que o p69, assim como o p38, possa representar um marcador importante de infecção pelo *M. leprae*, com sinalização para o desenvolvimento de um padrão de resistência à infecção por parte do contato. O p38 e o p69 são derivados de proteínas

hipotéticas, obtidas através de estudo biomolecular da estrutura genômica do *M. leprae*, mas até o momento, não isolada na micobactéria. Acreditamos que a modulação positiva promovida pela BCG na produção de IFN- $\gamma$  (para o p69) e de IL-10 (para o p38 e o p69), ocorra de forma indireta. A revacinação com a BCG ativaria clones que reagiriam cruzadamente com o *M. leprae*, liberando antígenos protéicos internos, dentre eles, as proteínas hipotéticas aos quais derivariam os peptídeos p38 e p69.

Em seu estudo, Martins (2006) identificou que a população linfocitária ativada sob estimulação com o p69 é predominantemente de linfócitos com a marcação CD8+, seguido de linfócitos T CD4+, sendo a provável fonte do IFN- $\gamma$  produzido *in vitro*.

Acreditamos que a resposta ao p69 represente infecção, pois em indivíduos infectados, a revacinação com a BCG e a ativação linfocitária, levaria a ativação de macrófagos infectados pelo *M. leprae*, processamento protéico, aumento da expressão de HLA de classe I nas células infectadas, apresentação antigênica e ativação de linfócitos T CD8+, específicos para o *M. leprae*, dentre eles os que reconheceriam os peptídeos p38 e p69.

Entretanto, a variação no padrão de resposta aos diferentes antígenos reflete a heterogeneidade no repertório destes linfócitos e a articulação do sistema imune na ativação de células que sejam eficazes na resposta específica contra o *M. leprae*. Resta-nos saber em quais daquelas respostas está o indicativo da susceptibilidade ou da resistência à infecção.

Os contatos de caso-índice MB sofrem regulação positiva na produção tanto de IFN- $\gamma$  quanto de IL-10 após a revacinação, enquanto que os contatos de PB apenas sofrem regulação positiva na produção de IFN- $\gamma$ . Estes achados indicam que a exposição ao *Mycobacterium leprae* existente quando contato de paciente MB, mas não o de PB, pode induzir em alguns indivíduos um padrão de produção de IL-10, em detrimento a produção de IFN- $\gamma$ , que pode resultar em infecção e adoecimento deste contato.

Os estudos observacionais, como de Goulart e cols. (2008), relatam que os contatos de caso-índice MB apresentam um risco duas vezes maior de adoecimento do que os contatos cujo caso-índice é da forma clínica PB. Nos estudos caso-controle realizados por Goulart e cols. (2008) e Düpre e cols. (2004), cerca de 90% dos contatos que adoeceram mantinham convívio com caso-índice MB. A produção de IL-10 em detrimento ao IFN- $\gamma$ , implica na ênfase da ação antiinflamatória promovida por esta citocina, com desativação macrofágica, regulação dos linfócitos T produtores de IFN- $\gamma$  (Raja e cols. 2004), e inibição na produção de TNF- $\alpha$  (Rojas e cols. 1999).

Observamos que indivíduos não reatores e reatores ao PPD aumentaram de forma significativa os níveis de IFN- $\gamma$  e de IL-10 frente ao MLT. Esta produção conjunta das citocinas entre os dois grupos indica que a resposta a tuberculina não se correlaciona ao tipo de resposta desenvolvida frente a infecção pelo *M. leprae*.

Em nossa casuística, identificamos contatos com relações distintas entre as citocinas frente ao MLT. Em nenhum destes, a relação na produção de IFN- $\gamma$  frente a produção de IL-10 foi inferior a quatro vezes, após a revacinação. Identificamos que a modulação promovida pela BCG interfere diretamente na relação IFN- $\gamma$ /IL-10, aumentando a relação entre as duas citocinas e esse achado apóia a evidência de que a BCG proporciona um ambiente que promove a produção de IFN- $\gamma$ , envolvida na proteção à infecção pelo *M. leprae*.

Alguns estudos têm referenciado que a vacina BCG pode refletir como “gatilho” para o adoecimento do contato, sendo esta hipótese defendida pelos autores Düpre e cols. (2008) e percebido no estudo de Goulart e cols. (2008), com o adoecimento de contatos em até um ano após a vacinação.

Acreditamos que o *M. leprae* se faz de algum mecanismo modulatório quando infecção, atuando na regulação positiva da IL-10 e/ou negativa de IFN- $\gamma$ , sendo a resposta vigente potencializada na revacinação com a BCG.

A análise de anticorpos IgM anti-PGL-1 antes da BCG, não mostrou correlação com a produção de IFN- $\gamma$  e/ou de IL-10. Nossos achados indicam que, a presença destes anticorpos não influencia na resposta imune ao *M. leprae*, verificada *in vitro* em nosso estudo e defendemos que, a presença destes anticorpos IgM anti-PGL-1 representem exposição ao *Mycobacterium leprae*, mas não infecção subclínica, uma vez que, mesmo indivíduos de região não endêmica mostram igual positividade que pacientes e contatos de região endêmica (FROTA e cols. 2009).

A presença dos anticorpos anti-PGL-1 como fator preditivo de adoecimento tem sido defendido por alguns estudiosos como Ferreira & Antunes (2008), Calado e cols. (2005) e Moura e cols. (2008). O entusiasmo em torno da sorologia deve-se aos vários estudos realizados, que descrevem a presença de tais anticorpos nos pacientes com hanseníase (BÜHRER-SÉKULA, 2008). Estes pesquisadores defendem que tais anticorpos sejam induzidos na medida em que, na presença de baixos níveis de IFN- $\gamma$ , os macrófagos estariam em seu estado de menor atividade microbicida, levando ao aumento da proliferação do *Mycobacterium leprae*, liberação do mesmo ao meio extracelular, e liberação de PGL-1, LAM

dentre outros glicolípides pelo *M. leprae*, estimulando a ativação de linfócitos B e liberação de anticorpos anti-PGL-1 pelos plasmócitos.

No trabalho de Ferreira & Antunes (2008), a prevalência desses anticorpos anti-PGL-1 na casuística de contatos foi de 19,7%, sendo significativa a proporção de positivos ao teste entre os contatos de caso-índice MB. Foi observado pelos autores que os contatos soropositivos apresentavam uma mediana de idade superior aqueles soronegativos, sendo a positividade maior nos contatos com idade superior a 8 anos. Avaliando o risco para adoecimento, Ferreira & Antunes (2008) concluem que a chance do contato de paciente MB apresentar anticorpos anti-PGL-1 aumenta 1,06 vezes. De acordo com Calado e cols. (2005), a prevalência de soropositivos entre os contatos de pacientes virchowiano sugere haver infecção subclínica. A faixa de cinco a nove anos de idade apresentou expressiva quantidade de soropositivos e segundo os autores reflete extensa e precoce exposição ao bacilo.

Além disso, outros fatores devem ser discutidos, como os diferentes antígenos disponíveis para sorologia (sintéticos e naturais), metodologia utilizada para dosagem, influências hormonais, diferenças populacionais etc. O IgM anti-PGL-1 pode ser detectado em patologias que induzem ativação policlonal de linfócitos, como a psoríase, a paracoccidiodomicose, a AIDS, sendo detectados inclusive em indivíduos de região não endêmica (SILVA e cols. 2008).

Nesse contexto, concordamos com Nagao-Dias (2007) que a presença de anticorpos IgA salivares e IgG séricos refletem de forma mais segura a exposição e reexposição ao *M. leprae*, uma vez que esses anticorpos representam a existência de células de memória em um momento de resposta secundária ao *M. leprae*, sendo estes, de alta afinidade. Em nossa casuística, a dosagem sérica de IgG anti-PGL-1 foi indetectável em todos os contatos, refletindo, possivelmente, a não existência de infecção subclínica. Mas só poderíamos ter certeza, caso fosse feito o acompanhamento dessas crianças, por, no mínimo, um ano.

Neste trabalho identificamos o comportamento imunológico dos contatos de pacientes expostos ao *M. leprae* e revacinados com a BCG, de acordo com duas citocinas chaves. A elucidação dos papéis das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 na população de contatos e seu possível envolvimento na resistência ou susceptibilidade à infecção pelo *M. leprae*, tenta esclarecer através da análise da resposta imune os achados epidemiológicos, e nossos resultados indicam que se fazem necessárias políticas públicas direcionadas a essa população de contatos, menores de 15 anos, que expostos aos pacientes não tratados, tornam-se susceptíveis a

infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Por outro lado, identificamos a incapacidade da BCG em promover um perfil de proteção, por produção de IFN- $\gamma$ , em faixas etárias acima de 4 anos, e até regular a resposta por IL-10, cujo desequilíbrio pode induzir ao adoecimento deste contato.

Entretanto, este trabalho deixa várias questões a serem elucidadas sobre a extensão e limitações no uso da BCG como imunoprevenção na hanseníase, por exemplo:

- Nos indivíduos expostos ao *M. leprae*, quais as vias moleculares ativadas pela vacinação que induziriam para um padrão produtor de IFN- $\gamma$  ou de IL-10?
- Qual o perfil linfocitário ativado nestes contatos que foram estimulados com as proteínas do *M. leprae*, e qual o impacto das citocinas dos padrões Th1, Th2, T regulatórias e Th17 no balanço da resistência ou susceptibilidade à infecção?
- Como quebrar a cadeia de transmissão da hanseníase focando no contato, na perspectiva de detectar e impedir uma possível modulação realizada pelo *M. leprae* ou até mesmo pela BCG?

## 8. CONCLUSÕES.

1. A revacinação com a BCG modula de forma específica, e significativamente, os níveis de IFN- $\gamma$  e IL-10 nos contatos de pacientes com hanseníase, para as proteínas e peptídeos, principalmente frente ao estímulo com o extrato bruto (MLT) e para o peptídeo p69.
2. A idade do contato é crítica para a eficácia da revacinação com a BCG, caracterizada pela ativação de clones de linfócitos produtores de IFN- $\gamma$ , sendo este aumento significativo na idade de 1 a 4 anos. Entretanto, na faixa etária de 5 a 9 anos houve modulação para a ativação de clones de linfócitos produtores de IL-10, além dos produtores de IFN- $\gamma$ , sendo incentivo para um perfil de susceptibilidade à infecção.
3. Os contatos de pacientes multibacilares possuem um perfil com produção significativo de IFN- $\gamma$  e IL-10, distinto dos contatos de paucibacilares, que respondem ao MLT com produção de IFN- $\gamma$ , apenas.
4. A resposta ao PPD e a produção de anticorpos IgM anti-PGL-1 não influenciam na resposta imune *in vitro* frente as proteínas do *M. leprae*.
5. Os contatos apresentam o mesmo padrão de resposta as proteínas derivadas do *Mycobacterium leprae*, caracterizado pela relação entre as citocinas IFN- $\gamma$ /IL-10 com todos os contatos apresentando um perfil de relação positiva entre as citocinas, caracterizando um perfil de resistência a infecção pelo *M. leprae*.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, C.H.M.; BARBOSA, J.C.; JR., A.R.N.; ALENCAR, M.J.F.A.; PONTES, R.J.S.; CASTRO, C.G.J.; HEUKELBACH, J.; Hanseníase no município de Fortaleza, CE, Brasil: aspectos epidemiológicos e operacionais em menores de 15 anos (1995-2006). **Revista Brasileira de Enfermagem**. V. 61, p. 694-700, 2008.

BANG, P.D.; SUZUKI, K.; PHUONG, L.T.; CHU, T.M.; ISHII, N.; KHANG, T.H.; Evaluation of polimerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for diagnosis of leprosy. **Journal of Dermatology**. V. 36, p.269-276, 2009.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; FERNANDES, B.D.; CARVALHO, L.P.; CARDOSO, S.; CUNHA, S.; BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M.; RODRIGUES, L.C.; BARRAL-NETO, M.; BCG (Bacille of Calmete-Guérin) revaccination leads to improved *in vitro* INF- $\gamma$  response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. **Vaccine**. V. 21, p. 2152-2160, 2003.

BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M.; FERREIRA, A.A.; BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **Jornal de pediatria**. V. 82 N°3, 2006.

BLACK, G.F.; WEIR, R.E.; CHAGULUKA, S.D.; WARNDORFF, D.; CRAMPIN, A.C.; MWAUNGULU, L.; SICHALI, L.; FLOYD, S.; BLISS, L.; e cols. Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in health, non-*Mycobacterium bovis* BCG- vaccinated Malawian young adults. **Clinical and Diagnostic laboratory Immunology**. V. 10. N°4, p. 602-611, 2003.

BOCHUD, P.Y.; SINSIMER, D.; ADEREM, A.; SIDDIQUI, M.R.; SAUNDERSON, P.; BRITTON, S.; ABRAHAM, I.; ARGAW, A.T.; JANER, M.; HAWN, T.R.; KAPLAN, G.; Polymorfisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**. V. 28, p.1055-65, 2009.

BOCHUD, P.Y.; HAWN T.R.; SIDDIQUI, M.R.; SAUNDERSON, P.; BRITTON, S.; ABRAHAM, I.; ARGAW, A.T.; JANER, M.; ZHAO, L.P.; KAPLAN, G.; ADEREM, A.; Toll-like receptor 2 (TLR-2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **Journal Infection Disease**. V. 197, n°2, p. 253-261, 2008.

BOTASSO, O; MERLIN, V.; CANNON, L.; CANNON, H.; INGLEDEW, N.; KENI, M.; HARTOPP, R.; STANFORD, C.; STANFORD, J.; Studies of vaccination of persons in close contact with leprosy patients in Argentina. **Vaccine**. V. 16, n° 11, p. 1166-1171, 1998.

BRASIL, M.S. **DATASUS**. Disponível em <http://www.saude.gov.br>. Acesso em 15/10/2009 as 14:00h.

BRASIL, M.S. **Vigilância em saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. Brasília, 2008.

BRASIL, M.S. **Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010**. Brasília, 2006.

BRASIL, M.S.; **Protocolo para atendimento em hanseníase**. Brasília, 2007.

BRASIL, M.S.; **Guia para controle da hanseníase**. Brasília, 2002.

BRIASSOULIS, G.; KARABATSOU, I.; GOGOGLU, V.; TSORVA, A. BCG vaccination at three different age groups: response and effectiveness. **J. Immun. Based Ther. Vaccine**. V. 3, n°1, 2005.

BRITTON, J. W & LOCKWOOD, D. J.; Leprosy. **The Lancet**. p.1209, April of 2004.

BÜHRER-SÉKULA, S.; BERRS van S.; OSKAM, L.; LECCO, R.; MADEIRA, E.S.; DUTRA, M.A.L.; LUIS, M.C.; FABER, W.R.; KLATSER, P.E.. A relação entre soroprevalência de anticorpos contra o glicolípido fenólico-I entre crianças em idade



escolar e endemicidade da hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 41 (suplemento II). P. 81-88, 2008.

BÜHRER-SÉKULA, S.; ILLARRAMENDI, X.; TELES, R.S.; PENNA, M.L.F.; NERY, J.A.C.; SALES, A.M.; OSKAN, L.; SAMPAIO, E.P.; SARNO, E. N. ; The additional benefit of the ML flow test to classify leprosy patients. **Acta tropica**. V. 111, p. 172-176, 2009.

BÜHRER-SÉKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; LEEUWEN, J.; AMADOR, S.; FUJIWARA, T.; KLATSER, P. R.; OSKAM, L. Simple and fast lateral Flow Test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**., V. 41. p. 1991-5, 2003.

BUSHAN, P.; SARDANHA, K.; KORANE, R.V.; CHOUDHARY, M.; MANJU, P.; Diagnosing multibacillary leprosy: a comparative evaluation of diagnosis accuracy of slit-skin smear, bacterial index of granuloma and WHO operational classification. **Indian Journal of Venereol. Leprol**. V. 74. Supl. 4 p. 322, 2008.

CALADO, K.L.S.; BÜHRER-SÉKULA, S.; VIEIRA, A.G.; OLIVEIRA, M.L.W.; DURÃES, S.; Positividade sorológica anti-PGL-1 em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. V. 80. Nº 3, p.301-6, 2005.

CEARÁ, GOVERNO DO; Informe epidemiológico hanseníase- Janeiro de 2010. Secretaria de Saúde, 2010.

CEARÁ, GOVERNO DO; Informe epidemiológico hanseníase-Setembro de 2009. Secretaria de Saúde, 2009.

CEARÁ, SECRETÁRIA DE SAÚDE. **Guia prático para o exame baciloscópico da hanseníase**. Fortaleza: SESA, 2004.

CEARÁ. GOVERNO DO; Ceará em números. Disponível em: [http://www.ceara.gov.br/portal\\_govce/ceara/ceara-em-numeros](http://www.ceara.gov.br/portal_govce/ceara/ceara-em-numeros). Acesso em 07/11/09 as 16:09h.

COLE, S.T.; EIGGLMEIER, K.; PARKHILL, J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**. V. 409. p.1007, 2001.

CUNHA, S.S.; RODRIGUES, L.C.; PEDROSA, V.; DOURADO, I.M.; BARRETO, M.L.; PEREIRA, S.M.; Neonatal BCG protection against leprosy: a study in Manaus, Brazilian Amazon. **Leprosy review**. V. 75, p. 357-66, 2004.

CURTO, M. & PASCHOAL, V.; Uma década de acompanhamento dos portadores de hanseníase no ambulatório de dermatologia de um hospital escola. **Arq. Ciênc. Saúde**. V.12 n°4. p.183, 2005.

DEPS, P.D.; ALVES, B.L.; GRIPP, C.G.; ARAGÃO, R.L.; GUEDES, B.V.S.; FILHO, J.B.; ANDREATTA, M.K.; MARCARI, R.S.; PRATES, C.A.; RODRIGUES, L.C.; Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: A case control study. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol**. V.74, supl.4. p.338, 2008.

DOCKRELL, H.M.; BRAHMBHATT,S.; ROBERTSON, B.D.; BRITTON, S.; FRUTH, U.; GEBRE, N.; HUNEGNAW, M.; HUSSAIN, R.; MANANDHAR, R.; e cols. A postgenomic approach to identification of *Mycobacterium leprae* specific peptides as T-cell reagents. **Infection and Immunity**. V. 68, n° 10, p.5846-5855, 2000.

DOUGLAS, J.T.; CELLONA, R.V.; FAJARDO, T.T.; ABALOS, R.M.; BALAGON, M.V.; KLTSER, P.R. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. V. 11, p. 897-900, 2004.

DÜPRE, N.C.; CAMACHO, L.A.B.; CUNHA, S.S.; STRUCHINER, C.J.; SALES, A.M.; NERY, J.A.C.; SARNO, E.N.; Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts:

a cohort study. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** V. 102, p. 631-638, 2008.

DÜPRE, N.C.; ALVIM, M.F.S.; GALLO, M.E.N.; NERY, J.A.C.; SARNO, E.N.; Fatores envolvidos na reatividade do PPD em pacientes com a doença de Hansen. **Cadernos de Saúde Pública.** V. 6, n°2, p.175-185, 1990.

EIDT, M. L. 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, 2004.

FAÇANHA, M.C.; LIMA, J.R.C.; TEIXEIRA, G,F,D,; PINHEIRO, A.C.; FERREIRA, M.L.L.T.; ROUQUAYROL, M.Z.; Hanseníase: subnotificação de caos em Fortaleza-Ceará, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia. Ver. Investigação Clínica, Epidemiológica, Laboratorial e terapêutica.** V. 81. Sup. 4, p. 329, 2006.

FERREIRA, M.A.A. & ANTUNES, C.M.F.; Factors associated with ML Flow test seropositivity in leprosy patients and household contacts under the age of 18. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V. 41, n° 2, p.60-66, 2008.

FERREIRA, I.N. & ALVAREZ, R.R.A. Hanseníase em menores de 15 anos no município de Paracatu, Minas Gerais (1994 a 2001). **Rev. Bras. Epidemiologia.** V. 8. N° 1, p.41-9, 2005.

FINE, P.E.M.; Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. **The Lancet.** V. 346 p. 1339-1345, 1995.

FOOTE, S. Mediating immunity to mycobacteria. **Nature genetics.** V. 21. , p. 345. Abril , 1999.

FORTALEZA, PREFEITURA DE; Informe epidemiológico: hanseníase- Julho 2008. Secretaria Municipal de Saúde, 2008.

FROTA, C.C.; FREITAS, M.V.; FOSS, N.T; LIMA, L. N.C.; RODRIGUES, L. C.: BARRETO, M.L.; KERR, L.R.S. Seropositivity to anti-PGL-I in cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in Northeast Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** (*in prelo*), 2009.

FUKUTOMI, Y.; MAEDA, Y.; MATSUOKA, M.; MAKINO, M.; *Mycobacterium leprae* depend on temperature. **Journal of Japanese of leprosy**. V. 78, p. 7, 2009.

GARCIA, J.R.L; Entre a loucura e a hanseníase: interfaces históricas das práticas e políticas instituídas. **Hansen. Int.** V. 26. N°1. P.14-22, 2001.

GOMES, I.G.; NAHN JR., E.P.; SANTOS, R.K.R.G.; SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. The functional state of the complement system in leprosy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** V. 78, n°4, p.605-610, 2008.

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

GOULART, I.M.B.; SOUZA, D.O.B.; MARQUES, C.R.; PIMENTA, V.L.; GONÇALVES, M.A.; GOULART, L.R.; Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**. V. 15 N°1, p.101-5, 2008.

HASHIMOTO, K.; MADA, Y.; KIMURA, H.; SUZUKI, K.; MASUDA, A.; MATSUOKA, M.; MAKINO, M.; *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells its influence on antigen presenting function. **Infection and Immunity**. V. 70. N°9, p.5167, 2002.

JESUS, L.A.O.; **Produção de IFN-gama em pacientes com hanseníase e seus contactantes numa amostra populacional no município de Sobral-CE**. Dissertação de Mestrado defendida na Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.

JOOS, T.J.; MILLER, W.C.; MURDOCH, D.M.; Tuberculin reactivity Calmette-Guérin vaccinated populations: a compilation of international data. **Int. J. Tuberc. Lung. Dis.** V. 10, n° 8, p.883-91, 2006.

KANG, T.J.; YEUM, C.E.; KIM, B.C.; YOU, E.; CHAE, G.; Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunology.** V. 112, p. 674, 2004.

KARONGA, GROUP; Randomised controlled trial of single BCG, repeat BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. **The Lancet.** V. 348, p.17, 1996.

LAHIRI, R. & KRAHENBUKL, J.L.; The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. **Leprosy Review.** V. 79, p. 401-409, 2008.

LAVANIA, M.; KATOCH, K.; KATOCH, V.M.; GUPTA, A.K.; CHAURUAN, D.S.; SHARMA, R.; GANDHI, R.; CHAURAN, V.; BANSAL, G.; SACHAN, P.; SACHAN, S.; YADAV, V.S.; JADHAV, R.; Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infection, Genetics and Evolution.** p. 5, 2008.

LIMA, M.C.B.S.; PEREIRA, G.M.B.; RUMJANEK, F.D.; GOMES, H.M.; DUPPRE, N.; SAMPAIO, E.P.; ALVIM, I.M.P.; NERY, J.A.C.; SARNO, E.N.; PESSOLANI, M.C.V.; Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. **Scand. J. Immunol.** V. 51, p. 419-428, 2000.

LOCKWOOD, D. J.; SARNO, E. & SMITH W.C.; Classifying leprosy patients – searching for the perfect solution? **Leprosy review.** V. 78, p.317, 2007.

LYON, S.; LYON, A.C.; SILVA, R.C.; GROSSI, M.A.F.; LYON, S.H.; BÜHRER-SÉKULA, S.; ROCHA, M.O.C.; Comparison of ML flow serology and slit skin smears to assess the bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil. **Leprosy review.** V. 79, p. 162-170, 2008.

MARTINS, M. V. B. S. **Avaliação da resposta imune celular *in vitro* induzida por novos antígenos de *Mycobacterium leprae*.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

MONTEIRO, Y.N.; Hanseníase: história e poder no estado de São Paulo. **Hansen Int.** V. 12 n°1 p.1-7, 1987.

MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; JEAN-YVES, C.; LACROIX, C.; SOW, S.; SPENCER, J.S.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D.L.; GELBER, R.; VIRMOND, M.; FLAGEUL, B.; SANG-NAE, C.; JI, B.; PANIZ-MONDOLF, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P.E.; RASOLOFO, V.; BRENNAN, P.J.; COLE, S.T.; On the Origin of Leprosy. **Science.** V.308. p.1040, 2005.

MOURA, R. S.; CALADO, K.L.; OLIVEIRA, M. L. W.; BUHRER-SÉKULA, S.; Leprosy serology using PGL-1: a systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** V. 41 (suplemento II). P. 11-18, 2008.

MURRAY, R.A.; SIDDIQUI, M.R.; MENDILLO, M.; KRAHENBUHL, J.; KAPLAN, J.; *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. **The Journal of Immunology.** V. 178. p. 338, 2007.

NAGAO-DIAS, A.T.; ALMEIDA, T.L.; OLIVEIRA, M.F.; SANTOS, R.C.; LIMA, A.L.; BRASIL, M.; Salivary anti-PGL-1 and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. **Brasilian Journal Infect. Disease.** V. 11. April, 2007.

NOORDEEN, S.K.; Profilaxis-scope and limitations. In Leprosy research at the new millennium. A workshop sponsored by member organizations of the International Federation of anti-leprosy Associations. **ILEP.** Jun, 2000.

O POVO, JORNAL.; Bilhete ao ex-governador, 2003. Disponível em: [www.opovo.uol.com.br/opovo/colunas](http://www.opovo.uol.com.br/opovo/colunas). Acesso em 07/11/09 as 16:25h.

OHARA, N.; MATSUOKA, M.; NOMAGUCHI, H.; NAITO, M.; YAMADA, T.; Inhibition of multiplication of *Mycobacterium leprae* in mouse foot pads by recombinant Bacillus Calmette-Guérin (BCG). **Vaccine**. V.18, p.1294-1297, 2000.

OPROMOLLA, P.A.; MARTELLI, A.C.C.; A terminologia relative à hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. V. 80. N°3, p.293-4, 2005.

OSKAM, L. & BUHRER-SÉKULA, S. A strategy to improve the ML-flow test for detection of anti-phenolic glycolipid-1 antibodies: reply. **Leprosy Reviews**. V. 75. p. 194-195, 2004.

PARKASH, O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. **FEMS Immunology Medical Microbiology**. V. 55. p. 1-5, 2009.

RAJA, A. Immunology of tuberculosis. **Indian J. Med. Res**. V.120, p.213-232, 2004.

REDDY, M.; EIRIKIS, E.; DAVIS, C.; DAVIS, H.M.; PRABHAKAR, U. Comparative analysis 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. **J. Immunol. Met**. V. 293, p. 127-42, 2004.

RODRIGUES, A.G.; **Estudo do polimorfismo C2029T no gene do receptor toll-like tipo 2 e da resposta imune humoral em pacientes com hanseníase**. Dissertação de Mestrado defendida na Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

RODRIGUES, L.C.; KERR-PONTES, L.R.S.; FREITAS, M.V.C.; BARRETO, M.L.; Long lasting BCG protection against leprosy. **Vaccine**. V. 25, p.6842, 2007.

ROJAS, M.; OLIVIER, M.; GROS, P.; BARRERA, L.F.; GARCIA, L.F. TNF- $\alpha$  and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. **J. Immunol**. V. 162, p. 6122-31, 1999.

ROMAGNANI, S.; Regulation of the T cell response. **Clinical and Experimental Allergy**. V. 36, p. 1357, 2006.

SCHLESINGER, L.S. & HORWITZ, M.A. Phenolic Glicolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **J. Exp. Med.** V. 174, p. 1.031-1038, 1991.

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 reviews**. V. 19 N°2. p.338, 2006.

SETIA, M.S.; STEINMAUS, C.; HO, C.S.; RUTHERFORD, G.; The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-análise. **The Lancet**. V.6 Março, 2006.

SHEN, J.; WANG, Y.; ZHOU, M.; WENZHONG, L.; Analisis on value of household contact survey in case detection of leprosy at a low endemic situation in China. **Indian Journal Venereol. Leprol**. V. 75, p.152, marc-april, 2009.

SILVA, R.C.; LYON, S.; ARAOS, R. ; LYON, A.C. ; GROSSI, M.A.F. ; LYON, S.H. ; PENIDO, R.A. ; BÜHRER-SÉKULA, S.; ANTUNES, C.M.F. Comportamento dos testes sorológicos ML flow e ELISA (PGL-1) em áreas endêmicas e não endêmica de hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 41, n°2, p.19-22, 2008.

SOUZA, A.D.; EL-AZHARY, R.A.; FOSS, N. T.; Management of chronic diseases: na overview of the Brazilian governmental leprosy program. **International Journal of Dermatology**. V. 48. p.109, 2009.

SOUZA, C.S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina, Ribeirão Preto**. V. 30. p.325-334, 1997.



SPENCER, J.S.; DOCKRELL, H.M.; KIM, H.J.; MARQUES, M.A.M.; WILLIAMS, D.L.; MARTINS, M.V.B.S.; MARTINS, M.L.F.; LIMA, M.C.B.S; e cols. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. **The journal of Immunology**. V.175, p. 7930, 2005.

SRIDEVI, K.; NEENA, K.; CHITRALEKHA, K.T.; ARIF, A.K.; TOMAR, A.D.; RAO, D.N.; Expression of coestimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), molecules (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) in PBMC of leprosy patients using *Mycobacterium leprae* antigen (MLCwa) with murabutide and T cell peptide of Trat protein. **International Immunopharmacology**. V. 4, p.1-14, 2004.

STEFANI, M.M.A.; Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 89. Supl. 2. P.-89-94, 2008.

TORRES, P.; CAMARENA, J.J.; GOMEZ, J.R.; NOGUEIRA, J.M.; GIMENO, V.; NAVARRO, J.C.; OLMOS, A.; Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. **Leprosy review**. V. 74, p.18-30, 2003.

VELEMA, J.P.; OGBEIWI, O.I.; ILEP organisations should strive for high BCG coverage in communities at risk of leprosy. **Leprosy review**. V. 78, p. 88-101, 2007.

VINCENT, N.G.; ZANAZZI, G.; TIMPL, R.; TALTS, J.F.; SALZER, J.L.; BRENNAN, P.J.; RAMBUKKANA, A.; Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**. V. 103, p.511, 2000.

VISSA, V.D. & BRENNAN P.J.; The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome biology**. Vol. 2 N°8 p.2, 2001.

WEAVER, C.T.; HATTON, R.D.; MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E.; IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu. Rev. Immunol**. V. 25, p.821-52, 2007.

WILLIAMS, D.L.; TORRERO, M.; WHEELER, P.R.; TRUMAN, R.W.; MARK, Y.; MORRISON, N.; BISHAI, W.R.; GILLIS, T.P.; Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infection. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** V. 8, p.58-72, 2004.

WHO. Weekly epidemiological record. N° 32. p.309-316, 2006.

ZODPEY, S.P. Protective effect of BCG vaccine in the prevention of leprosy. **Indian J. Dermatol. Leprol.** V. 73, N° 2, 2007.

ZODPEY, S.P.; AMBALEKAR, N.N.; THAKUR, A.; Effectiveness of Bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: a population-based case-control study in Yavatmal District, India. **Public Health.** V. 129, p.209-216, 2005.

## 10. ANEXOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CENTRO DE REFERÊNCIA NACIONAL EM DERMATOLOGIA SANITÁRIA DONA LIBÂNIA - CDERM

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto CEP/CDERM – 006/08

Título: Análise da resposta imunológica com a 2ª dose da BCG em contactantes de indivíduos com hanseníase

Pesquisador responsável: Jose Julio da Costa Sidrim

Proposição do(a) relator(a):

aprovação

aprovação com pendências

não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP/CDERM – 07/05/2008

Data do parecer final do projeto pelo CEP/CDERM: 07/05/2008

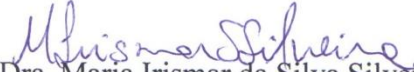
PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia CDERM, em sua reunião realizada em 07/05/2008, decidiu APROVAR, de acordo com o parecer do(a) Relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observações:

1. O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatório final da pesquisa ao CEP/CDERM.

Fortaleza, 09 de maio de 2008

  
Dra. Maria Irismar da Silva Silveira  
Coordenadora do CEP/CDERM



Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Patologia e Medicina Legal

**Projeto: Análise da resposta imunológica após a 2ª dose de BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) em contatos de pacientes com hanseníase abaixo de 15 anos.**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO- Responsável legal**

Como a resposta à doença é fundamental no caminhar da infecção no indivíduo com Hanseníase, este estudo possui como objetivo: Estudar de forma laboratorial, em indivíduos que possuem contato com pacientes com hanseníase, com idade inferior a 15 anos, a produção de fatores do sistema imunológico (INF-gama e IL-10), frente ao estímulo de partes do microorganismo causador da hanseníase, antes e após uma segunda dose da vacina BCG.

Com esse propósito, serão coletados 2 tubos de sangue de uma veia, antes da administração da vacina BCG, conjuntamente com duas amostras de swab nasal, e 1 tubo de sangue 60 dias após a vacinação, sendo o procedimento realizado com técnica adequada, de forma a minimizar os riscos e promover o máximo de conforto. Com o material coletado, será realizado ensaio em laboratório para dosar os fatores imunológicos e identificação do microorganismo que causa a hanseníase.

De acordo com o Protocolo de Atendimento em Hanseníase (2007), autorizo a administração da vacina BCG e estou ciente, que após a aplicação da vacina aparecerá um nódulo local, que evoluirá para crosta.

Autorizo a aplicação do teste tuberculínico (PPD), 60 dias após à administração da vacina e sua leitura em 48 horas após a aplicação. O PPD é um teste aplicado no terço médio do antebraço cuja leitura é realizada pela medição do nódulo formado.

Os avanços na terapêutica originados da pesquisa serão disponibilizados à sociedade e ao participante.

Quaisquer dúvidas ou esclarecimentos podem ser obtidos a qualquer momento, através dos responsáveis pelo projeto: Dra Márcia Valéria Brandão, Dra Lília Câmara e Enfo Emerson Ramalho Ferreira. Endereço e Telefone: Núcleo de Estudos Avançados de Microbiologia Médica, Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, fones: 85-33668313 (Gabinete na UFC); 85-31018813 (Laboratório de Imunologia- Dona Libânia) e 85-88469947 (Enfo Emerson).

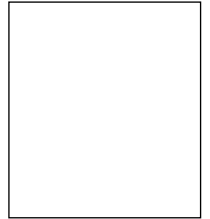
A participação na pesquisa é voluntária, sendo garantida a sua desistência a qualquer momento, sem prejuízo pessoal, assistencial ou ao tratamento. Será assegurada a privacidade das informações disponibilizadas e em caso de dúvida quanto aos seus direitos, recursos ou reclamações em relação à pesquisa, podendo entrar em contato com a Secretária da Comissão de Ética no telefone 85- 31015452.

Assim, eu, \_\_\_\_\_, portador da cédula de identidade \_\_\_\_\_, responsável legal pelo menor \_\_\_\_\_, declaro que autorizo sua inclusão no grupo de estudo do projeto acima citado de responsabilidade dos pesquisadores Dra Márcia Valéria Brandão, Dra Lília Câmara e Enfo Emerson Ramalho Ferreira.

Assinatura / Digital \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Enfo Emerson Ramalho Ferreira



Local \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**A ser preenchido pelo coordenador do projeto:**

**Contato:** ( )PB ( )MB

**PRESENÇA DE ESCARA:** ( )SIM ( )NÃO

**CASO ÍNDICE:** \_\_\_\_\_

**REGISTRO:** \_\_\_\_\_



Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Patologia e Medicina Legal

**Ficha para entrevista de indivíduos do estudo:**

“ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA APÓS A 2ª DOSE DE BCG (BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN) EM CONTATOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE MENORES DE 15 ANOS”

Entrevistador: \_\_\_\_\_

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

I. Sujeito

1. Nome: \_\_\_\_\_

2. Idade: \_\_\_\_\_

3. Sexo: (Masc.), (Fem.)

4. Unid. de atendimento: \_\_\_\_\_

5. Atendido por: \_\_\_\_\_

6. Endereço: \_\_\_\_\_

7. Bairro: \_\_\_\_\_ 8. Município: \_\_\_\_\_ 9. Estado: \_\_\_\_\_

10. Fone: \_\_\_\_\_

11. Naturalidade: \_\_\_\_\_

11. Tempo de residência: \_\_\_\_\_

12. Raça: (Branco), (Negro), (Índio), (Mestiço), (Oriental)

13. Vacinação com BCG: Cicatriz (não) (sim).

14. Idade da 1ª vacinação: \_\_\_\_\_ (dias/meses/anos)

15. 2ª vacinação com BCG: (não) (sim).

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

16. É portador de alguma doença: (não) (sim). Qual? \_\_\_\_\_

17. Faz algum tratamento: (não) (sim). Qual? \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_

18. Amamentação: ( ) exclusiva ( ) sim ( ) não

19. Histórico de Tb pulmonar ou pneumonia? ( ) sim ( ) não

20. Histórico de Familiar com Tb pulmonar ou pneumonia? ( ) sim ( ) não

21. Objetos compartilhados:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

22. Condições de moradia: ( ) Alvenaria ( )

23. Tipo de piso: ( ) areia ( ) cimento ( ) azulejo

24. Água: ( ) CAGECE ( ) Poço ( ) Mineral

25. Esgoto: ( ) CAGECE ( ) Fossa séptica ( ) Vala/rua

25. Atividades esportivas de rotina/local: \_\_\_\_\_

## II. Dados do Caso-índice

26. Nome: \_\_\_\_\_

27. Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: (Masc) (Fem)

28. Número de registro: \_\_\_\_\_

29. Classificação operacional: (Paucibacilar) (Multibacilar).

30. Histopatologia: \_\_\_\_\_ Baciloscopia (I.B.): \_\_\_\_\_

31. Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ 32. Profissão: \_\_\_\_\_

33. Convívio: (Diário) (Semanal) (Quinzenal) (Mensal)

34. Tratamento: \_\_\_\_\_ 35. Data do início do tratamento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## III. Dados Laboratoriais

36. 1ª Coleta de células para cultura: (não) (sim). Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

37. 2ª Coleta de células para cultura: (não) (sim). Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

38. Muco Nasal: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Executor: \_\_\_\_\_

39. anti-PGL-1: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Executor: \_\_\_\_\_

40. PPD Administração. Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Executor: \_\_\_\_\_

41. PPD Leitura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Executor: \_\_\_\_\_

