



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



IVONETE DOS SANTOS QUEIROZ

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO
DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES HANSÊNICAS**

Salvador, Bahia
2016

IVONETE DOS SANTOS QUEIROZ

**INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO
DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES HANSÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof^a Dra. Sara Timóteo Passos

Co-Orientador: Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho

Salvador, Bahia
2016

Dedico este trabalho a Deus,
pois, sem Ele nada podemos fazer.

A Ele toda Honra e Glória.

Aos meus pais, Raildes e Leonarda, aos meus irmãos e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me direcionar e me conceder saúde e equilíbrio para persistir nos momentos mais difíceis. Por me dar tranquilidade e serenidade para conduzir este trabalho.

Aos meus pais Sr. Raildes Martins Queiroz (*in memoriam*) e Sra. Leonarda dos Santos Queiroz, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim, que na simplicidade da vida, me ensinaram o valor da educação, força, coragem, amor, determinação, evolução, persistência e, acima de tudo com suas orações e fé inabalável.

Aos meus irmãos, por fazerem parte da minha vida e constituírem meu alicerce familiar. Que apesar da distância, souberam me apoiar e me incentivar nessa caminhada, com quem pude compartilhar meus momentos de angústia e de conquistas.

Em especial à minha amável amiga Patrícia Cisneiros, educadora, pelo apoio valioso e incentivo na realização deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Machado, Pesquisador responsável, Médico Dermatologista e Chefe do Serviço de Imunologia (SIM), pelas preciosas contribuições e apoio, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A Dra. Sara Passos e Dr. Lucas Carvalho, pela disponibilidade, orientação, paciência e pelos ensinamentos, depositado ao longo desses anos.

A Jamile Rêgo Leão pela imprescindível ajuda nas coletas sanguínea, entrevistas e busca ativa dos voluntários.

Aos colegas do Serviço de Imunologia pelo apoio, discussões, parcerias, críticas e disponibilidade que muito acrescentaram a essa pesquisa, em especial Andréa Magalhães, Daniela Celestino, Rúbia Costa, Maurício Teixeira e Uara Santana. E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Edgar Marcelino por possibilitar o desenvolvimento deste projeto no Serviço de Imunologia.

Ao grupo de pesquisa em Hanseníase – pela colaboração no desenvolvimento deste estudo com discussões, sugestões e críticas construtivas.

Ao grupo de pesquisa do SIM – Serviço de Imunologia do HUPES pela colaboração e por terem proporcionado as condições técnicas necessárias para a realização deste trabalho.

Meus agradecimentos especiais a esta faculdade e seus professores, responsáveis pela minha formação.

Aos funcionários do PPGIm pela disponibilidade, carinho e orientação, em especial a Dilcéia.

A toda equipe do Ambulatório Magalhães Neto, aos médicos, residentes, em especial a farmacêutica Carla de Jesus dos Santos, pela colaboração, dedicação e compromisso com as pesquisas desenvolvidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da bolsa UFBA/CAPES. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Por fim, agradeço imensamente aos pacientes e voluntários que participaram deste estudo, sem os quais seria impossível a realização da nossa pesquisa.

*"Que darei eu ao Senhor por todos
os benefícios que me tem feito?
sl 116:12 Louvar-te-ei,
Senhor, de todo meu coração;
contarei todas as tuas maravilhas!
sl 9:1.7. "*

RESUMO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, caracterizada por lesões na pele e ampla apresentação clínica, a qual depende principalmente da resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Esta infecção está distribuída mundialmente persistindo como grave problema de saúde pública no Brasil. As incapacidades e deformidades duradouras decorrentes dos quadros reacionais podem ocorrer antes, durante ou após a instituição do tratamento específico. Os episódios reacionais inflamatórios são decorrentes da exacerbação abrupta da resposta imune mediada por célula contra antígenos do *M. leprae*. O episódio reacional tipo 1 ou reação reversa é uma ocorrência inflamatória aguda que acomete a pele e nervos periféricos, sendo causa comum de incapacidade física. A reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico acomete somente pacientes virchowianos (LL) e borderline-virchowianos (BL) com presença de muitos bacilos e pouca ou nenhuma imunidade celular ao *M. leprae*. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a moléculas MARCO Scavenger, Receptor peptídeo formil 1(FPR1) e Receptor peptídeo N-formil 2 (FPR2) em monócitos de pacientes com hanseníase em associação ao desenvolvimento de reações hansênicas, para alcançar este objetivo células mononucleares do sangue periférico foram obtidas de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase. A marcação de superfície celular foi realizada por citometria de fluxo e os dados analisados com FlowJo em 35 pacientes com hanseníase, divididos em 19 paucibacilar e 16 multibacilar. Os nossos resultados mostraram que os pacientes com a forma paucibacilar apresentam a frequência de monócitos intermediários aumentada. Não houve diferença estatística na média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD80, CD86 e MHC II entre monócitos de pacientes com a forma paucibacilar e multibacilar da hanseníase. No entanto, monócitos intermediários de pacientes com a forma multibacilar apresentaram média de intensidade de fluorescência maior em CD86 e MCHII. Os nossos dados sugerem que o receptor FPR1 pode ter um papel relevante para detecção na amplificação da resposta inflamatória de indivíduos com hanseníase quando comparado com as outras moléculas aplicadas neste estudo.

Palavras-chave: Hanseníase. Reação reversa. Eritema Nodoso Hansênico. MARCO Scavenger, FPR1 e FPR2.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, characterized by skin lesions and extensive clinical presentation which depends mainly on the immune front of the host response to infection by *Mycobacterium leprae*. This infection is distributed worldwide and persists as a serious public health problem in Brazil. Disability and lasting deformities resulting from reaction symptoms can occur before, during or after the institution of specific treatment. Reactional inflammatory episodes are due to the abrupt exacerbation of immune cell-mediated response against *M. leprae* antigens. The episode reaction type 1 or reverse reaction is an acute inflammatory occurrence that affects the skin and peripheral nerves, and is a common cause of disability. Reaction type 2 or ENL only affects lepromatous patients (LL) and borderline-lepromatous (BL) with the presence of many bacilli and little or no cellular immunity to *M. leprae*. To assess the association of biomarkers MARCO Scavenger, Formyl peptide receptor (FPR1) and N-formyl peptide receptor 2 (FPR2) in monocytes of patients with leprosy associated with the development of leprosy reactions, mononuclear cells from peripheral blood were obtained from patients with different clinical forms of leprosy. To achieve this goal peripheral blood mononuclear cells were obtained from patients with different clinical forms of leprosy. The cell surface stain was performed by flow cytometry and the data analyzed with FlowJo in 35 patients with leprosy, divided into 19 paucibacillary and 16 multibacillary patients. Our results showed that patients with the paucibacillary form exhibit increased monocyte frequency. There was no statistical difference in the mean fluorescence intensity (MFI) of CD80, CD86 and MHC II between monocytes of paucibacillary and multibacillary leprosy patients. However, intermediate monocytes from patients with the multibacillary form had higher mean fluorescence intensity in CD86 and MCHII. Our data suggest that the FPR1 receptor may play a relevant role in detecting the amplification of the inflammatory response of individuals with leprosy when compared with the other molecules applied in this study.

Keywords: Leprosy. Reverse Reaction. Erythema Nodosum Leprosum. MARCO Scavenger, FPR1 and FPR2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células Apresentadoras de Antígenos
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	“Bacillus Calmette-Guérin”
BB	<i>Borderline-Borderline</i>
BI	“Bacteriological Index”: Índice Bacilar
BL	<i>Borderline</i> Lepromatosa
BT	<i>Borderline</i> Tuberculóide
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	Monócitos clássicos
CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺⁺	Monócitos intermediários
CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	Monócitos não-clássicos
CD40	Grupo de diferenciação 40
CD80	Grupo de diferenciação 80
CD86	Grupo de diferenciação 86
CMSP	Celulas Mononucleares do Sangue Periférico
ENH	Eritema nodoso hansênico
FPR1	Formyl peptide receptor
FPR2	N-formyl peptide receptor 2
HI	Hanseníase Indeterminada
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleucina
IL-1 _B	Interleucina 1 beta
LL	Lepromatosa
MARCO	MARCO Scavenger

MB	Multibacilar
MFI	Média de intensidade de fluorescência
MHC II	Complexo principal de Histocompatibilidade II
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilar
PQT	Poliquimioterapia
RPM	Rotações por minuto
RR	Reação reversa
SR1	Surto reacional tipo 1
SR2	Surto reacional tipo 2
Th	“T helper”: T auxiliares
Th1	Células T auxiliaadoras do tipo 1
Th2	Células T auxiliaadoras do tipo 2
TNF	“Tumor necrosis factor”: Fator de necrose tumoral
TT	Tuberculóide-Tuberculóide
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ÍNDICE DE TABELA

Tabela1. Tabela 01. Caracterização com dados clínicos e epidemiológicos da amostra deste estudo.....	34
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.**ANÁLISE *EX-VIVO* DA FREQUÊNCIA DA POPULAÇÃO DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE 35
- Figura 2.**FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM CMSP DE PACIENTES COM AS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE ANTES DO TRATAMENTO E INDIVÍDUOS SADIOS..... 36
- Figura 3.** AVALIAÇÃO DA MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA (MFI) DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS CD80, CD86 E MHC II NAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE HANSENÍASE.. 37
- Figura 4.**AVALIAÇÃO DA MÉDIA DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA (MFI) DOS BIOMARCADORES DE FPR1, FPR2 E MARCO EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DE HANSENÍASE..... 37

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO	15
2REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA HANSENÍASE.....	17
2.2IMUNOPATOGÊNESE DA HANSENÍASE	18
2.3EPISÓDIOS REACIONAIS.....	19
2.4REAÇÃO DO TIPO 1 OU REAÇÃO REVERSA (RR)	20
2.5ERITEMA NODOSO HANSENICO	20
2.6TRANSMISSÃO DA HANSENIASE.....	21
2.7TRATAMENTO DA HANSENIASE	21
2.8SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS	22
2.9MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS	23
2.10BIOMARCADORES E HANSENÍASE.....	24
3HIPÓTESE E OBJETIVOS	26
3.1HIPÓTESE	26
3.2OBJETIVO GERAL	26
3.3OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	27
4.2ÁREA DE ESTUDO.....	27
4.3DESENHO DO ESTUDO	27
4.4DEFINIÇÕES DA AMOSTRA.....	27
4.4.1Pacientes	27
4.4.2Pacientes Paucibacilares (PB)	28
4.3.3Pacientes Multibacilares (MB)	28
4.3.4Pacientes com Reação Hansênica Tipo 1 ou Reação Reversa (RR)	28

4.3.6	Indivíduos Sadios	29
4.3.7	Fluxograma ilustrativo do estudo de Estudo de coorte.....	30
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	31
4.5	CRITÉRIOS DE NÃO-INCLUSÃO.....	31
4.6	METODOLOGIA	31
4.6.1	Separação de células mononucleares do sangue periférico.....	31
4.6.2	Citometria De Fluxo	32
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
4.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
5	RESULTADOS	33
5.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	33
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE	34
5.3	FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES HANSÊNICOS COM AS FORMAS PB E MB.....	35
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE ATRAVÉS DAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS CD80, CD86 E DE MHC II	36
5.5	AVALIAÇÃO DE MARCO, FPR1 E FPR2 EM MONÓCITOS EM PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE ANTES E DURANTE O TRATAMENTO	Erro! Indicador não definido.
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	43

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

ANEXOS

Anexo I – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes

Anexo II – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido para controles sadios

Anexo III –Ficha Clínica para pacientes

Anexo IV – Características da amostra

Anexo V – Artigo Científico: investigação de biomarcadores associados ao desenvolvimento de reações hansênicas

Anexo VI – Ofício do comitê de ética em pesquisa (CEP) do HUPES

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa, granulomatosa e crônica causada pelo bacilo, *Mycobacterium leprae*. A doença é caracterizada por uma diversidade de formas clínicas determinadas pela resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção pelo agente etiológico *Mycobacterium leprae* (Machado et al., 2004). Acomete principalmente a pele e, sua transmissão geralmente é por meio das vias aéreas superiores através da inalação de gotículas carregadas de bactérias dos pulmões de uma pessoa infectada a uma pessoa saudável (Mendonça et al., 2008). A hanseníase se apresenta num amplo espectro clínico, que segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1988 a classificou em duas classes, como formas paucibacilar (PB) sendo esta classificação de acordo com o número de lesões, baciloscopia negativa e recebem a PQT-PB por 6 meses e, a forma clínica multibacilar (MB), pacientes que apresentam de uma a cinco ou mais de cinco lesões de pele, respectivamente, baciloscopia positiva e recebem a PQT-MB por 12 meses (WHO, 1995; Walker et al., 2006; Goulart et al., 2002).

No entanto, existe outra classificação da hanseníase, estabelecida segundo Ridley & Joplin em 1966 que classifica os pacientes nas seguintes formas: TT (tuberculóide), BT (borderline-tuberculóide), BB (borderline-borderline), BL (borderline-lepromatoso) e LL (lepromatoso-lepromatoso) (Opromolla et al., 2000; Modlin, 2010; D. Montoya, 2010). Estas formas clínicas podem vir acompanhadas de eventos reacionais que podem ocorrer antes, durante ou após a introdução do tratamento (Kahawita et al., 2008). As reações hansênicas são alterações do sistema imunológico que aparecem como manifestações inflamatórias agudas e subagudas. Ocorrem mais frequentemente nos pacientes multibacilares e afeta principalmente os nervos e a pele (Lienhardt et al., 1994; Kahawita et al., 2008; Stefani et al., 2009).

As reações hansênicas podem ser de dois tipos, a reação tipo 1 onde as lesões cutâneas pré-existentes tornam-se mais eritematosas, intumescidas, edematosas e infiltradas e os limites das lesões tornam-se mais evidentes e definidos. A reação tipo 2 acomete pacientes chamados de lepromatos e dimorfo – e é conhecida como uma alteração da imunidade humoral. Nessa reação observam-se o aparecimento de pápulas, nódulos e placas, eritematosas, dolorosas, na pele de aspecto normal, distribuindo-se de maneira uniforme por todo o corpo, com preferência pelas superfícies dos membros e face (Lienhardt et al., 1994; Kahawita et al.,

2008). A reação do tipo 2 ocorre em indivíduos com a forma multibacilar com alta carga bacilar cuja resposta imune celular para destruir os bacilos está diminuída, predominando a resposta humoral (Stefani et al., 2009).

A imunidade mediada por células na infecção pelo *M. leprae*, com padrão Th1 e secreção das citocinas IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF caracterizam o pólo tuberculóide, e a ausência de resposta celular específica aos antígenos do *M. leprae* caracteriza o pólo lepromatoso com secreção de IL-4, IL-5 e com predomínio da resposta Th2 (Goulart et al., 2002; Mendonça et al., 2008).

A evolução das formas clínicas da hanseníase para as reações reversas é um ponto importante das pesquisas científicas na hanseníase. Moléculas como MARCO, FPR1 e FPR2 estão presentes em macrófagos, neutrófilos ou células dendríticas e possuem funções diversas, sendo capazes de atuar na quimiotaxia e fagocitose (Peter JG; Siamon G, 2000). Até o momento não existem biomarcadores eficientes para a hanseníase com o objetivo de contribuir para a identificação precoce dos episódios reacionais nos pacientes com hanseníase. Portanto, nós buscamos biomarcadores expressos em monócitos capazes de realizar avaliação da evolução da forma clínica do paciente para a forma reacional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA HANSENÍASE

A hanseníase uma doença complexa, negligenciada, caracterizada como um importante problema de saúde pública mundial, sendo endêmica em diversos países e, com uma grande incidência, com destaque para a Índia e o Brasil (Sampaio et al., 2012; Almeida et al., 2014). O Brasil está entre os países de alta endemicidade de hanseníase no mundo, após a Índia, e é responsável por aproximadamente 85% dos casos registrados nas Américas (Brasil. MS, 2013).

A Índia apresenta 64% de todos os casos a nível mundial e no Brasil compromete as regiões Norte, Centro-oeste e Nordeste (Ramos S, Rebello, 2001; Brasil, 2010). No Brasil em 2014 foram registrados 31.064 novos casos de hanseníase, sendo o nordeste a região com maior número de casos 13.523 e a Bahia contribui com 2.627 destes (WHO, 2014). A forma de transmissão se dá através do contato entre indivíduos infectados com o *M. leprae*, com a forma multibacilar não tratados e indivíduos sadios, por meio do convívio prolongado, além da susceptibilidade genética. Dados revelam que 95% da população é naturalmente resistente à infecção pelo *M. leprae* (Costa et al., 2008; Sales et al., 2011; Araújo et al., 2012; Feenstra et al., 2013).

Para o diagnóstico da hanseníase, os aspectos clínicos são parte importante. A lesão neural causada pela ação dos bacilos nas regiões de preferência, que são os nervos periféricos, determinam alterações sensitivas e motoras que levam ao comprometimento dos nervos facial (Souza, 1997; Eichelmann et al., 2013; Talhari, 2015), auricular, ulnar, mediano, tibial, fibular comum e trigêmeo, outros órgãos como rins e fígado também podem ser afetado. Além disso, o acometimento dos nervos periféricos resulta em dano motor e sensitivo levando à incapacidade e deformidades físicas no paciente (Britton et al., 2004).

A hanseníase manifesta-se como um amplo espectro de formas clínicas distintas principalmente pelo tipo e magnitude da resposta imunológica montada pelo hospedeiro frente à exposição ao bacilo *M. leprae* (Talhari, 2015). Para simplificar a classificação da doença, o Ministério da Saúde estabeleceu uma classificação operacional da hanseníase com implicação para o tratamento, diminuindo a complexidade para o diagnóstico, que se baseia no número de

lesões apresentadas no indivíduo e presença de bacilo-álcool-ácido-resistente (BAAR), através da baciloscopia em: paciente paucibacilar (PB), deve possuir menos de 5 lesões de pele, sem a presença de BAAR na biópsia e paciente classificados como multibacilar (MB), deve possuir mais de 5 lesões de pele, BAAR presente na biópsia (MS., 2001). No Brasil, as classificações mais empregadas são as de Madri conforme convenção preconizada no Congresso Internacional em 1953, que considera dois pólos estáveis e opostos: virchowiano e tuberculóide e dois grupos instáveis: indeterminado e dimorfo, que podem oscilar para um dos pólos na evolução natural da hanseníase (Ridley et al., 1994; Talhari et al., 1997).

Na classificação proposta por Ridley e Jopling (1966) as subdivisões são baseadas em critérios imunológicos e histológicos. Assim, eles consideraram as formas clínicas como um espectro em que os extremos são os tipos polares tuberculóide (TT) caracterizado por uma ou duas lesões de pele granulomatosas, com baciloscopia negativa e há uma forte resposta celular específica ao *M. leprae*. O pólo lepromatoso (LL), caracterizado por múltiplas lesões de pele infiltradas, nodulares, com resposta imune mediada por célula diminuída e há um aumento da carga bacilar. As formas intermediárias são os borderlines ou dimorfos (borderline-tuberculóide – BT, borderline-borderline – BB e borderline-virchowiano ou lepromatoso – BL). Nas formas clínicas BT a BL, há uma diminuição na resposta imune celular e alta carga bacilar (Ridley & Jopling, 1966; Lockwood, 2006; Walker, 2006; Opromolla et al., 2000). A forma históide é pouco frequente e pode estar associada com a reativação da hanseníase devido ao tratamento incompleto (Moreno et al., 2012).

Apesar de ser considerada uma doença de longa evolução, pode apresentar de forma abrupta episódios reacionais, capazes de desenvolver incapacidades físicas e sequelas (Scollard et al., 2006). Na sua evolução, os episódios reacionais são constantes desafios para os médicos. Sua evolução varia de quadros silenciosos a situações mais complexas, com sérias manifestações e comprometimento neurológico e sistêmico (Araújo, 2003).

2.2 IMUNOPATOGÊNESE DA HANSENÍASE

O ser humano é o principal hospedeiro do *M. leprae*, uma bactéria intracelular obrigatória, álcool-ácido resistente (Barreto et al., 2005), que infecta os macrófagos e células de Schwann e é fagocitado, apresenta replicação lenta e longo período de incubação (Goulart et al., 2002;

Scollard et al., 2006). O *M. leprae* pode se apresentar na forma de bastonete e possui grande afinidade por células cutâneas e por células dos nervos periféricos (Brasil. MS, 2001). A infecção pelo bacilo ocorre pelas vias aéreas superiores que são os principais locais de entrada da bactéria (Brasil, 2010).

Os portadores de hanseníase nem sempre transmitem a doença igualmente e de forma eficaz, geralmente os indivíduos não tratados são aqueles que mais transmitem o bacilo (Mendonça et al., 2008). O estudo da hanseníase é um modelo experimental muito atraente para a investigação da resposta imunológica frente à infecção de caráter espectral e resposta imune em pólos opostos e bem caracterizados (Modlin, 2010; Mendonça et al., 2008). A resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro é um fator decisivo para a determinação da forma clínica da hanseníase, e essa resposta está principalmente relacionada a múltiplas interações e fatores solúveis como a ação de citocinas (Costa et al., 2008).

2.3 EPISÓDIOS REACIONAIS

Os episódios reacionais inflamatórios são decorrentes da exacerbação abrupta da resposta imune mediada por células contra antígenos do *M. leprae*. As incapacidades e deformidades duradouras decorrentes dos quadros reacionais que podem ocorrer antes, durante ou após a instituição do tratamento específico com a polioquimioterapia (Kahawita et al., 2008). As reações podem ser de dois tipos: reação tipo 1 e reação tipo 2 (Meyerson, 1996; Walker et al., 2008). Quando o episódio reacional surge o tratamento é mantido associando-se tratamentos específicos para reações. Os episódios reacionais são fenômenos agudos que interrompem a evolução de doença crônica e o diagnóstico destes episódios é realizado por meio do exame clínico, exame histopatológico por biópsia da pele e baciloscopia (Barreto, 2005).

A identificação precoce de novos pacientes representa uma das medidas de maior impacto no combate à hanseníase (Britton e Lockwood, 2004), permitindo uma conduta terapêutica eficaz para impedir a evolução da doença e chances de desenvolverem as reações e consequentemente incapacidades motoras e sensitivas (Britton e Lockwood, 2004).

Existem dois tipos de reações hansênicas: reação tipo 1 e reação tipo 2, que refletem o processo inflamatório imune-mediado, esse processo envolve distintos mecanismos de

hipersensibilidade (Kamath et al., 2014; Chakma et al., 2012; Lockwood et al., 2011). Os eventos reacionais podem incidir em qualquer uma das formas clínicas, exceto na hanseníase indeterminada, e quebram a cronicidade da doença.

2.4 REAÇÃO DO TIPO 1 OU REAÇÃO REVERSA (RR)

Na reação do tipo 1 (SR1) ou reação reversa (RR), caracteriza-se por apresentação de novas lesões dermato-neurológicas, bem como dor ou espessamento dos nervos (neurites), inflamação aguda nas lesões cutâneas preexistentes, eritematosas, intumescidas, edematosas e infiltradas e podem ulcerar, os limites das lesões tornam-se mais evidentes e definidos; assim como febre, astenia e neurite (Saunderson et al., 2000; Kamath et al., 2014). Neurite aguda quando não tratada rapidamente e adequadamente podem levar ao dano permanente da função neural (Lienhardt et al., 1994; Kahawita et al., 2008).

Para o diagnóstico do processo inflamatório são utilizados critérios clínicos e laboratoriais. Os critérios clínicos são observados por meio das manifestações cutâneas eritematosas, intumescidas, edematosas e infiltradas, placas elevadas e lesões com limites evidentes e definidos com descamação, podendo evoluir para uma ulcera, pode ocorrer hiperestesia ou acentuação da parestesia sobre as lesões cutâneas e perda da função sensitivo-motora decorrente das neuropatias, que é uma das ocorrências mais frequentes e graves da reação reversa, com o acometimento dos nervos ulnar e tibial posterior, assim como mão em garra, pé caído (MS, 2010). De acordo com a Sociedade Brasileira de Hansenologia e Sociedade Brasileira de Dermatologia (2007), os exames laboratoriais não são observadas alterações hematológicas e da bioquímica sanguínea nas reações reversas. Na derme observa-se um denso infiltrado celular, composto principalmente por monócitos e células CD4+, com edema associado ao granuloma e maior expressão de RNA mensageiro para IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF e IFN- γ , com diminuição de IL-4, IL-5 e IL-10 nas lesões. Tem se relatado uma maior expressão de TNF em nervos periféricos do que na pele, sendo esta citocina implicada na patogenia da desmielinização inflamatória em modelos experimentais (Machado, 2005).

2.5 ERITEMA NODOSO HANSENICO

A reação tipo 2 (SR2) ou eritema nodoso hansênico (ENH) acomete somente pacientes virchowianos (LL) e borderline-virchowianos (BL) com presença de muitos bacilos e pouca ou nenhuma imunidade celular ao *M. leprae* (Stefani et al., 2009). Nessa reação observam-se o aparecimento de pápulas, nódulos e placas, eritematosas, dolorosas e tensas ao toque na pele de aspecto normal, distribuindo-se de maneira uniforme por todo o corpo, com preferência pelas superfícies extensoras dos membros e face central e podem se tornar hemorrágicas, vesico-bolhosas, pustulares e ulcerativas caracterizando o quadro de eritema nodoso necrosante (Kahawita et al., 2008).

Os pacientes com ENH podem apresentar ainda sintomas sistêmicos como febre, astenia, mialgias, náuseas, dor articular, artrite, nefrite, vasculite, edema de extremidades, irite, epistaxes, orquite e linfadenite (Chakma et al., 2012; Kamath et al., 2014). Neurite na forma de nervos espessados, dolorosos e com diminuição da função pode fazer parte do ENH (Kahawita et al., 2008). No ENH, os critérios laboratoriais observam alterações hematológicas e da bioquímica sanguínea como leucocitose, neutrofilia e plaquetose; aumento das proteínas da reação inflamatória aguda, especialmente proteína C-reativa e alfa1-ácido glicoproteína, aumento das imunoglobulinas IgG e IgM e proteinúria SBH e SBD (2007). A imunopatogênese do ENH é muito complexa, tendo sido demonstrados, a presença de altos níveis circulantes de IL-1 e TNF no soro dos pacientes, paralelamente ao aumento tecidual na expressão de RNA mensageiro para as citocinas IL-6, IL-8 e IL-10, indicando resposta Th2 (Mendonça et al., 2008).

2.6 TRANSMISSÃO DA HANSENIASE

A hanseníase é transmitida por inalação de gotículas carregadas de bactérias dos pulmões de uma pessoa infectada com o *M. leprae* para uma pessoa sadia. O período de incubação pode ser muito longo (em alguns casos 20 anos) antes que sinais clínicos e sintomas tornem-se aparentes (Nunzi e Massone, 2009). Não existe modelo experimental para a infecção com o *M. leprae* devido ao fato de que esta bactéria não sobrevive fora do ambiente humano e isso é um importante obstáculo no avanço das pesquisas relacionadas à infecção com *M. leprae*.

2.7 TRATAMENTO DA HANSENIASE

O tratamento da hanseníase com a Polioquimioterapia (PQT) é preconizado de acordo com a forma clínica do paciente e consiste na utilização de um conjunto de medicamentos associados (drogas bactericidas e bacteriostáticas) padronizado pela OMS e recomendado pelo Ministério da Saúde (Brasil. MS, 2010) sendo gratuito e fornecido pela atenção básica de saúde.

A polioquimioterapia paucibacilar é a associação de Dapsona com Clofazimina. O tratamento dos pacientes paucibacilares tem duração de 6 doses de 600mg de Rifampicina e 100 mg de dapsona uma vez por mês supervisionada, com duração de 6 meses, comparecimento mensal para dose supervisionada em até 9 meses e dose diária de 100mg de dapsona, auto administrada.

E para os pacientes multibacilares o tratamento dura 12 meses podendo chegar até 18 meses. A polioquimioterapia multibacilar compreende Dapsona, Rifampicina e Clofazimina, altamente bactericida. Compreende 12 doses de 600mg Rifampicina, 100 mg de dapsona e 300mg Clofazimina uma vez por mês supervisionada e dose diária de 100mg de Dapsona e 300mg Clofazimina, auto administrada. Para as reações da hanseníase o tratamento é realizado com prednisona ou talidomida (MS, 2009).

2.8 SUB-POPULAÇÕES DE MONÓCITOS

Monócitos são células sanguíneas circulantes derivadas de progenitores mielóides da medula óssea que fazem parte do sistema imune inato e adaptativa, que ao migrarem para os tecidos diferenciam-se em macrófagos e células dendríticas (Ziegler-Heitbrock et al., 2000), sendo ainda células cruciais para a resposta imune nas diferentes patologias inflamatórias (Ziegler-Heitbrock *et. al.*, 2000).

Passlick *et. al.*, em 1989 dividiu os monócitos em duas sub-populações, monócitos clássicos (CD14+CD16-) e não-clássicos (CD14+CD16+). No entanto, Ancuta *et. al.* em 2003, publicaram que a subpopulação de monócitos CD16-positivo poderiam ser subdividida em diferentes subpopulações: CD14++CD16+ e CD14+CD16++. Em 2010, Zeigler-Heitbrock *et al.*, atualizaram esta classificação com uma terceira sub-população de monócitos - os intermediários (CD14++CD16+). A mais frequente população existente dentre as 3 classificadas são os monócitos clássicos com fenótipo CD14++CD16- (Passlick et al., 1989; Zeigler-Heitbrock, 2000; Moniuszko et al., 2009) que representam em média 85% dos monócitos e as sub-populações de monócitos CD16+, intermediários e não-clássicos, possuem uma frequência média de 5%, podendo variar de 5-15% (Zeigler-Heitbrock, 2000). Além de diferença quanto à frequência as diferentes sub-populações de monócitos também apresentam

diferentes papéis, como os monócitos clássicos que são capazes de produzir citocinas e quimiocinas como IL-6, IL-8, CCL2 e CCL3 em altos níveis e IL-10 de forma moderada (Cros et al., 2010). Já os monócitos intermediários são bons apresentadores de antígenos (Zawada et al., 2010) e os não-clássicos produzem citocinas pró-inflamatórias responsáveis pelo recrutamento de células para o local da inflamação (Zawada et al., 2010; ZeiglerHeitbrock et al., 2010).

Poucos estudos foram realizados para avaliar o papel dos monócitos em pacientes com hanseníase. Murray e colaboradores (2007) observaram *in vitro* que a exposição ao antígeno não é capaz de induzir a maturação e ativação de células dendríticas. Em outros estudos, foi observado que ao estimular culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis com antígenos do *M. leprae*, estes foram capazes de ativar de maneira pobre macrófagos e células dendríticas (Matsumura, et al., 2015; Sinsimer et al., 2012; Manca et al., 2012). Em estudo realizado por Bergheme e colaboradores em 2013 (dados não publicados) mostraram que os monócitos clássicos foram mais frequentes na hanseníase do que os intermediários e os não-clássicos e que os pacientes com a forma multibacilar apresentaram maior frequência de monócitos não clássicos do que pacientes com a forma paucibacilar antes do tratamento com PQT. Em outro estudo realizado por Shibuya e colaboradores (2016) (dados não publicados) foi verificado que pacientes reacionais apresentaram maior expressão de CD86, CD40 e de monócitos intermediários e o MHC II e CD80 foram mais expressos nos indivíduos com reação tipo 1 ou reação reversa.

2.9 MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS

As moléculas CD80 e CD86 são as moléculas co-estimulatórias mais bem caracterizadas que estão expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs) e participam na modulação da resposta imune por linfócitos T tanto na indução como na manutenção da tolerância (Migliori, 2010), se ligando ao receptor específico CTLA-4 ou CD28 (Santos *et al.*, 2001 e 2006). As células apresentadoras de antígenos (APC) são células que participam na sinalização da ativação, proliferação e produção das citocinas de células T, na interação entre antígeno e MHC com o receptor da célula T (TCR), juntamente com as moléculas co-estimulatórias CD80, CD86, e seus receptores nas células T, CD28 e CD152 (CTLA-4) (Migliori, 2010).

As moléculas de MHC II, CD80 e CD86 estão envolvidas, na apresentação antigênica e co-estimulação para a ativação dos linfócitos T. A ligação do CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) aos seus ligantes nas células T naive resulta em um importante sinal co-estimulatório contribuindo para ativação celular com produção de citocinas como o IFN- γ e IL-2. Essas células ativadas apresentam um perfil de expressão de proteínas de superfície que irão favorecer a manutenção ou modificação dos sinais co-estimulatórios que dirigem a expansão clonal e diferenciação celular (Sridevi et al., 2004; Santos et al., 2001; Santos et al., 2006). Ambas as moléculas CD80 e CD86 possuem funções semelhantes, mas apresentam características próprias, quando relacionadas à expressão nas células apresentadoras de antígeno, pela afinidade a receptores CD28 e CTLA-4. Dados revelam que CD80 possui uma maior avidéz de se ligar aos receptores quando comparada a molécula CD86 e que após a ligação de CD80 a uma indução da ligação de CD86 aos receptores, tendo maior afinidade pelo receptor CTLA-4 (Migliori, 2010). O MHC (complexo de histocompatibilidade principal) é uma molécula necessária para a ativação de células T desencadeada por uma resposta a antígenos (Santos et al., 2001; Santos et al., 2006). Devido ao importante papel na ativação celular, as moléculas co-estimulatórias são necessárias para compreender a resposta imune na hanseníase.

2.10 BIOMARCADORES E HANSENÍASE

Os biomarcadores podem ser definidos como variáveis genéticas, imunológicas e bioquímicas que se relacionam com expressão de doença. Nas doenças inflamatórias crônicas estes marcadores se relacionam com atividade ou remissão do processo patológico, contribuindo de modo importante como guia de tratamento. Nos processos infecciosos, como a expressão da doença varia de formas assintomáticas, oligossintomáticas à doença clássica, estes marcadores têm um papel importante como valor preditivo de evolução clínica (Scheriefer, A, Carvalho E M 2008). Os biomarcadores podem ser usados para vários propósitos, dependendo da finalidade e do tipo da exposição. Podem ser classificados de acordo com a exposição, o efeito e a susceptibilidade, sendo instrumentos que possibilitam identificar a substância tóxica ou uma condição adversa antes que sejam evidenciados danos à saúde (Amorim A C, 2003; Scheriefer, A, Carvalho E M 2008). Na hanseníase o uso de biomarcadores como ferramentas que possam identificar a evolução para a forma reacional é importante como uma possibilidade de identificação precoce destas formas graves da doença.

Os Receptores Scavenger (SR) são uma família de proteínas receptoras com grande capacidade para reconhecer lipoproteína de baixa densidade expressos na superfície celular principalmente de macrófagos, células dendríticas e células endoteliais (Murphy, 2005). Nestes receptores Scavenger, o MARCO é um marcador de ativação inata de macrófagos que é expresso na superfície celular de monócitos e macrófagos e está envolvido em eventos como fagocitose, apresentação de antígenos e remoção de células em apoptose, com grande capacidade de reconhecimento de organismos patogênicos gram-positivos e negativos, contribuindo assim para a defesa do hospedeiro contra a infecção (Kraal G, et al., 2000; Peter J G, Siamon G, 2000).

Outros receptores como os peptídeos n-formil - FPR – estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos. Os receptores FPR1 e FPR2 fazem parte da resposta imune inata, expressos em neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, são moléculas associadas à quimiotaxia, contribuem para uma variedade de processos fisiológicos e defesa contra infecções bacterianas (Migeotte *et al.*, 2006; Rabiet *et al.*, 2007, 2009; Le *et al.*, 2002).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESE

A expressão de FPR1, FPR2 e MARCO em monócitos de pacientes com hanseníase estão associados ao desenvolvimento de reações hansênicas.

3.2 OBJETIVO GERAL

Determinar a presença de biomarcadores associados ao desenvolvimento de reações hansênicas.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a subpopulação de monócitos em pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase.
- Avaliar a ativação das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e de MHCII nas subpopulações de monócitos de pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase.
- Avaliar a expressão de MARCO, FPR1 e FPR2 nas subpopulações de monócitos de pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase.
- Verificar associação desses biomarcadores com desenvolvimento de reações hansênicas.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.2 ÁREA DE ESTUDO

Este estudo foi realizado com pacientes do Ambulatório de dermatologia Magalhães Neto no Hospital Universitário Prof. Edgar Santos, localizado em Salvador, centro de referência na Bahia para o tratamento de doenças dermatológicas e suas complicações. Está em funcionamento desde 1992 e atende cerca de 60 novos pacientes com hanseníase por ano.

4.3 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de coorte com pacientes com hanseníase residentes na Bahia e com indivíduos sadios não contactantes de pacientes com hanseníase.

A amostra foi composta por 35 pacientes, sendo 19 pacientes diagnosticados com a forma paucibacilar e 16 pacientes com a forma multibacilar, todos acompanhados ao longo do tratamento para identificação dos episódios reacionais. Foram incluídos 12 indivíduos sadios como grupo controle.

4.4 DEFINIÇÕES DA AMOSTRA

4.4.1 Pacientes

A nossa amostra foi composta de 35 pacientes com hanseníase, sendo 19 pacientes paucibacilar e 14 pacientes multibacilar. Destes, 33 eram casos novos diagnosticados com hanseníase, sem tratamento prévio e 02 pacientes com surto reacional já em tratamento. Destes, 19 pacientes foram diagnosticados com a forma paucibacilar, 03 pacientes desenvolveram surto reacional ao longo do tratamento. Com a forma multibacilar foram 16 pacientes sendo que 06 pacientes desenvolveram surto reacional ao longo do tratamento.

Participaram do estudo os indivíduos que estavam de acordo com os critérios de inclusão e foram acompanhados no ambulatório de dermatologia do Magalhães Neto, ainda estavam de acordo com os termos de consentimento e assinaram o mesmo. O diagnóstico de hanseníase e das reações hansênicas foi realizado por meio da avaliação clínica, teste de sensibilidade,

biópsia da pele de uma das lesões para confirmação da forma clínica da doença e baciloscopia da linfa.

4.4.2 Pacientes Paucibacilares (PB)

Os pacientes foram diagnosticados com hanseníase com a forma clínica indeterminada ou tuberculóide (TT), que são caracterizados por uma ou mais regiões hipocrômicas ou eritematosas da pele e/ou regiões com alteração da sensibilidade devido ao dano de nervos periféricos que foram acometidos, todos com baciloscopia negativa. Estes pacientes apresentam resposta imune Th1, com altos níveis de TNF e IFN- γ (Manca *et. al.*, 2012).

4.3.3 Pacientes Multibacilares (MB)

São pacientes diagnosticados com hanseníase com a forma clínica borderline-borderline (BB), borderline-lepromatosa (BL) e lepromatosa (LL). Clinicamente os pacientes multibacilares manifestam nódulos, placas simétricas e infiltração na pele todas com baciloscopia positiva (Manca *et. al.*, 2012).

4.3.4 Pacientes com Reação Hansênica Tipo 1 ou Reação Reversa (RR)

Pacientes hansênicos são definidos com reação tipo 1 os que apresentam as formas clínicas tuberculóide ou borderline, apresentam uma elevação abrupta da resposta imune mediada por células contra os antígenos do *M. leprae*. Os pacientes com leve reação foram definidos apenas com neurite que também é uma reação do tipo 1.

4.3.5 Pacientes com Reação Hansênica Tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansenico (ENR)

Os pacientes multibacilares, que apresentam a forma clínica lepromatosa ou borderline podem desenvolver este tipo de reação, que é caracterizada por uma reação inflamatória sistêmica mais complicada, com presença de manchas, nódulos subcutâneos muito dolorosos que posteriormente podem levar a ulceração com presença ou não de neurite e até mesmo acometimento de outros órgãos como rins, fígado, e com ou sem febre.

4.3.6 Indivíduos Sadios

Os indivíduos sadios foram definidos como voluntários sadios sem história prévia de hanseníase e que não são contatos de pacientes com hanseníase, além de não apresentarem diagnóstico para outras doenças infecciosas. Deste grupo controle composto por 12 indivíduos sadios, foi coletado 20 ml de sangue periférico de indivíduos com idades entre 18 a 65 anos que se disponibilizaram a participar do estudo.

4.3.7 Fluxograma ilustrativo do estudo de Estudo de coorte

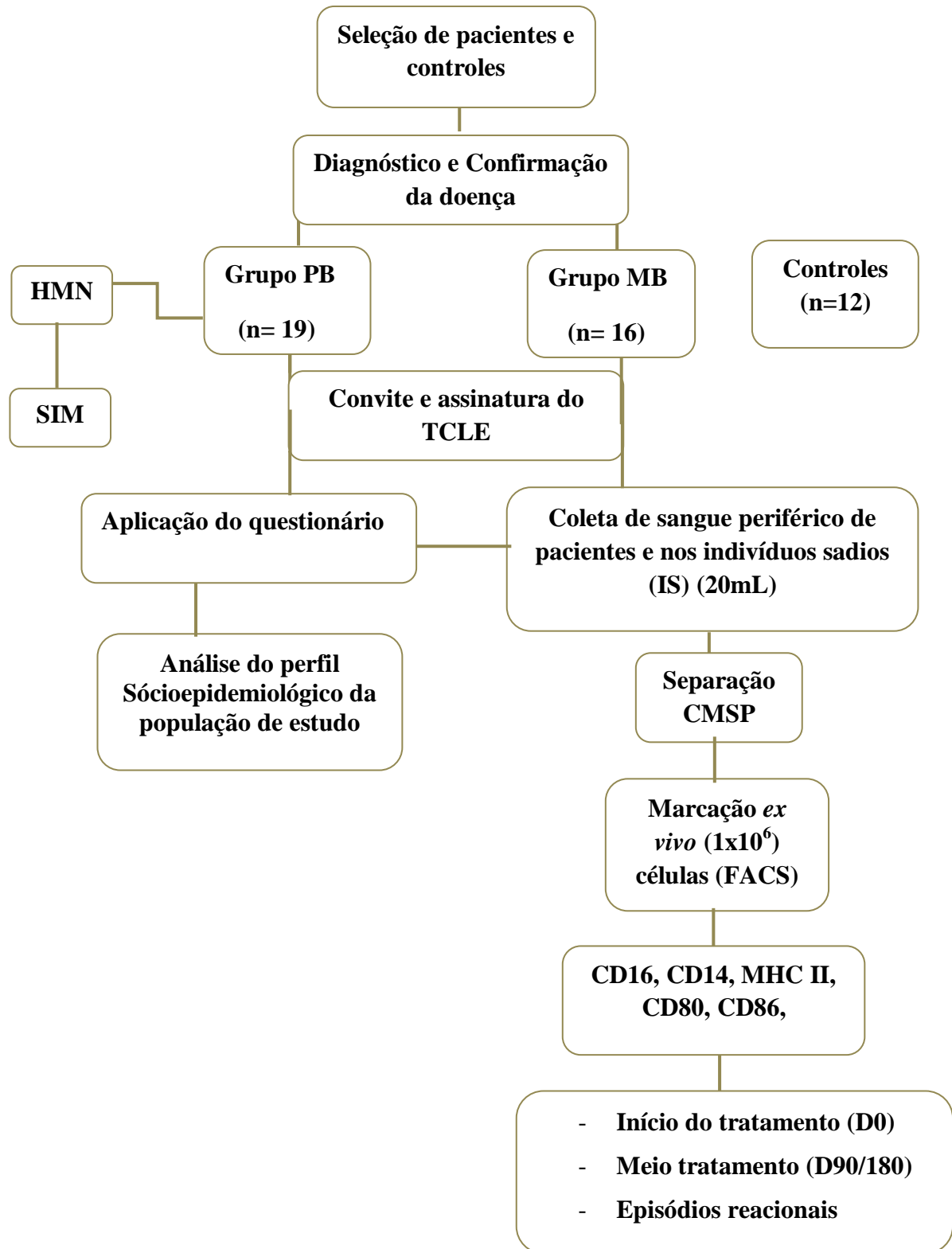


Figura 1. Fluxograma esquemático do estudo.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos neste estudo indivíduos de ambos os gêneros, com idade superior a 18 anos e inferior a 65 anos, residentes na Bahia que apresentaram diagnóstico de hanseníase baseados nos critérios de definições de casos descritos acima, com diagnóstico confirmado de hanseníase por meio da avaliação clínica, exame histopatológico por biópsia de pele e baciloscopia da linfa, que não iniciaram o tratamento com a poliquimioterapia e que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Para o grupo controle foram incluídos indivíduos sadios de ambos os gêneros, com idade superior a 18 anos e inferior a 65 anos, não contactantes de pacientes hanseníase e sem história prévia de hanseníase.

4.5 CRITÉRIOS DE NÃO-INCLUSÃO

Não foram incluídos no estudo pacientes com história prévia de hanseníase, em uso de corticosteróides, talidomida ou imunossupressores, mulheres grávidas, co-infectados por HIV, HTLV-1, HCV ou HBV, menores de 18 anos e maiores de 65 anos e pacientes com quadros de reações hanseníase.

4.6 METODOLOGIA

4.6.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico

Os pacientes e indivíduos sadios foram submetidos à coleta de 20 mL de sangue venoso periférico. O sangue foi coletado em tubo Falcon estéril contendo heparina (1000U/ml) e posteriormente foi diluído em 20 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas por meio de gradiente de concentração com Fycoll-HypaqueTMPlus (GE healthcare, Biosciences AB Durhman, NC, USA). Após centrifugação a 1450 RPM durante 30 minutos a 25° C, um anel de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foi obtido entre a mistura de Ficoll-PaqueTM e o plasma. Em seguida, as CMSP foram centrifugadas obedecendo ao processo de lavagem duas vezes com NaCl 0,9%, a 1290 rpm durante 10 minutos a 25° C e ressuspensas em salina

estéril. As CMSP foram contadas em câmara de Neubauer, ajustando-se à concentração de interesse de acordo com cada ensaio realizado.

4.6.2 Citometria De Fluxo

Experimento *Ex-vivo*

CMSP foram marcadas *ex vivo* com os seguintes anticorpos para determinar as subpopulações de monócitos: anti-CD14 - APC / anti-CD16 - PE/ anti-CD16 - FITC e os anticorpos anti-MHC II – PerCpy/ anti-CD80 – FITC/ anti-CD86 – PerCP-Cy5.5 para avaliar o grau de ativação celular.

As CMSP foram transferidas para tubos para FACS (1×10^6 células). Estes, foram centrifugados durante 5 minutos a 1500 RPM, 4°C. Descartado o sobrenadante, foi adicionado 2µl de cada anticorpo para marcação celular e foi adicionada solução salina não estéril e então mantido por 4°C durante 15 minutos ao abrigo da luz. Adicionou-se 200µl de solução salina não estéril e foram centrifugados por 5 minutos, 1500 RPM a 4°C. O sobrenadante foi descartado e para finalizar, foram adicionado 300µl de paraformaldeído a 4% para fixar a fluorescência e realizada a aquisição no citômetro de fluxo (CANTO II BD).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas através do programa Graphpad Prism 5.0 (Graphpad software, San Diego, CA, USA). Foram utilizadas para análise estatística pareada as análises dos dados obtidos entre os dias D0, D90 e D180 para o grupo PB e para o grupo MB os dias D0, D360 e D720 o teste não-paramétrico de Wilcoxon Matched Pairs Test. Para as análises entre as sub-populações de três variáveis contínuas independentes foi utilizado ANOVA Kruskal-wallis Test e Post Test Dunn. Para comparação entre duas variáveis independentes foi utilizado o teste não-paramétrico U de Mann-Whitney e para a frequência e MFI de monócitos dos grupos PB e MB nas análises pareadas, para avaliar a expressão de CD80 e CD86 e MHCII.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de P foi menor que 0.05 ($P < 0.05$).

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo faz parte de um projeto financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais processo nº 573839/2008-5 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa parecer nº 50/2010.

O estudo foi desenvolvido segundo as diretrizes éticas internacionais para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos de acordo com a resolução 196/96 CNS, 1996, que confere ao indivíduo a não maleficência e a beneficência, não inferindo a dignidade do indivíduo. Os pacientes e indivíduos que participaram do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e a confidencialidade dos dados foram preservadas. Este estudo foi financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Neste estudo foram incluídos 35 casos – pacientes diagnosticados com hanseníase e 12 controles – indivíduos sadios não-contactantes de pacientes com hanseníase. Estes casos foram diagnosticados através da baciloscopia e exame clínico realizado no Ambulatório de Dermatologia do Magalhães Neto no Hospital Universitário Prof. Edgar Santos, localizado em Salvador, centro de referência na Bahia para o tratamento de doenças dermatológicas e suas complicações. Os pacientes foram classificados de acordo com a OMS em paucibacilar e multibacilar, seus dados sócio-epidemiológicos foram adicionados ao banco de dados após preenchimento e assinatura do TCLE. Os pacientes, na maioria, apresentaram diagnóstico de hanseníase, sem tratamento prévio para tal e sem reação hansênica. Estes, nós avaliamos no dia do diagnóstico (D0) e realizamos acompanhamento ao longo do tratamento com poliquimioterapia (PQT) para desenvolvimento de reação hansênica ou não. Alguns pacientes, 01 PB e 04 MB, já iniciaram este estudo com surto reacional (Tabela 01).

Tabela 01. Caracterização com dados clínicos e epidemiológicos da amostra deste estudo.

A- Características da amostra			
	N indivíduos	Média-idade (anos) ± DP	M:F
Casos	35	48,11 ± 13,081	12:23
Controles	12	32,42 ± 8,175	03:09
B- Características dos Casos			
Formas clínicas			N
Paucibacilar (PB)		Total	19
PB sem SR			15
PB que desenvolveram SR			03
PB diagnóstico SR			01
Multibacilar (MB)		Total	16
MB sem SR			06
MB que desenvolveram SR			06
MB diagnóstico SR			04
# Total			35
C- Pacientes que desenvolveram Reação Hansênica			
RR			09
# Total			09

Tabela 01. N=número. DP=desvio-padrão. M=masculino. F= feminino. PB=paucibacilar. SR=surto reacional. MB=multibacilar. RR=Reação Reversa ou reação hansênica tipo 1.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE

A existência de diferentes populações de monócitos humanos no sangue periférico já está bem estabelecida na literatura. Baseado na expressão das moléculas de superfície celular CD14 e

CD16, os monócitos foram subdivididos em clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺). A figura 1^a demonstra o gate estratégico na região dos monócitos de acordo com o tamanho e granulosidade celular e a figura 1B mostra as diferentes subpopulações de monócitos.

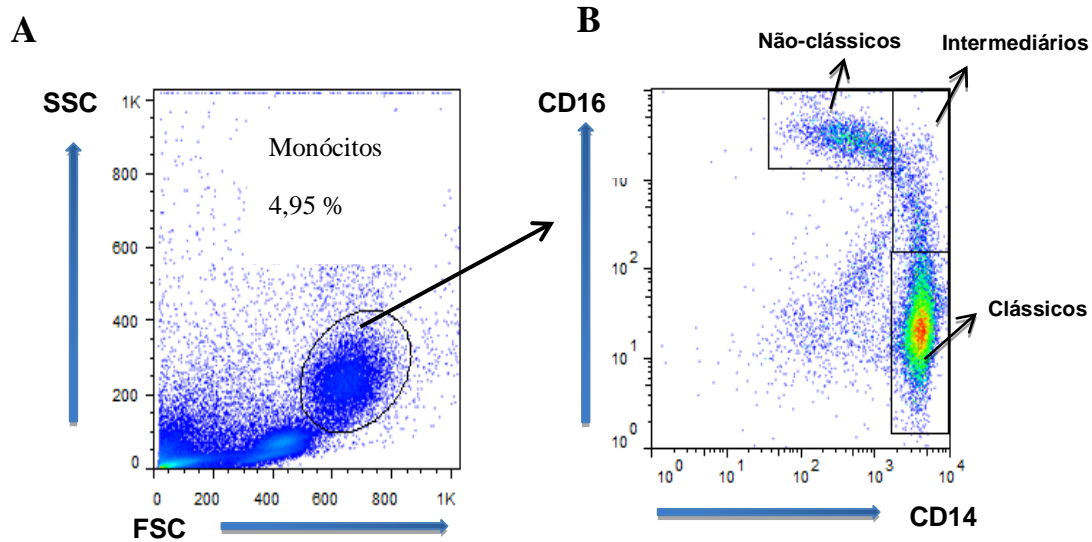


Figura 1. Análise *ex-vivo* da frequência das subpopulações de monócitos em pacientes com hanseníase. (A) Identificação do *gate* dos monócitos por meio da expressão dos parâmetros de SSC (tamanho) e FSC (granulosidade) em CMSP de paciente com hanseníase e (B) Plot representativo das subpopulações de monócitos em CMSP de pacientes com hanseníase identificando-as como: Clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), Intermediários (CD14⁺CD16⁺) e Não-Clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺).

5.3 FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS EM PACIENTES HANSÊNICOS COM AS FORMAS PB E MB

Dados na literatura mostram que monócitos clássicos são mais frequentes no sangue periférico do que os não-clássicos e os intermediários (Passlick et al., 1989; Zeigler-Heitbrock, 2000; Moniuszko et al., 2009). Neste trabalho nós comparamos a frequência das subpopulações de monócitos de pacientes com as formas paucibacilar e multibacilar, com indivíduos saudáveis. Nossos resultados demonstraram que os monócitos clássicos são mais frequentes nos 3 grupos em estudo (figura 2), no entanto foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência dos monócitos intermediários de pacientes PB quando comparados com indivíduos saudáveis.

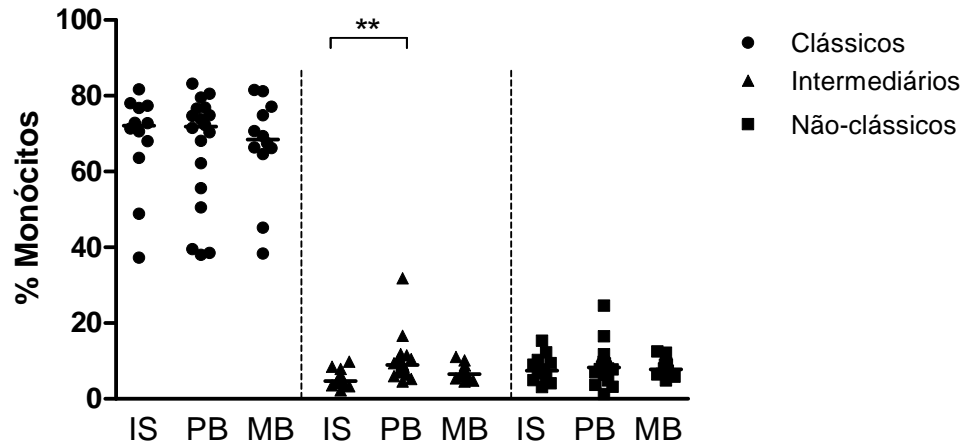
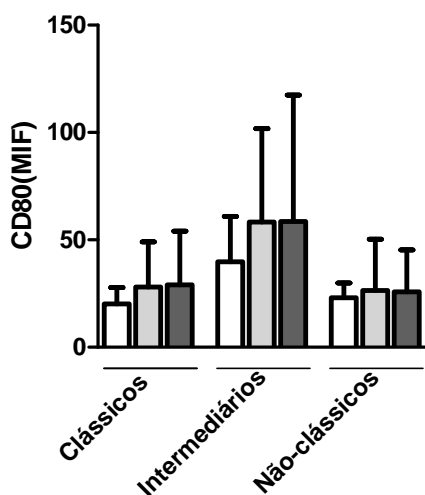


Figura 2. Frequência das subpopulações de monócitos em CMSP de indivíduos sadios e pacientes com hanseníase, antes do tratamento. Os monócitos foram caracterizados de acordo a expressão de CD14 e CD16na superfície celular e a frequência das subpopulações de monócitos de indivíduos sadios (IS) (n=12) e pacientes com as formas PB (n=18) e MB (n=12) da hanseníase foi avaliada por citometria de fluxo. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns para análise estatística. **P<0.0001.

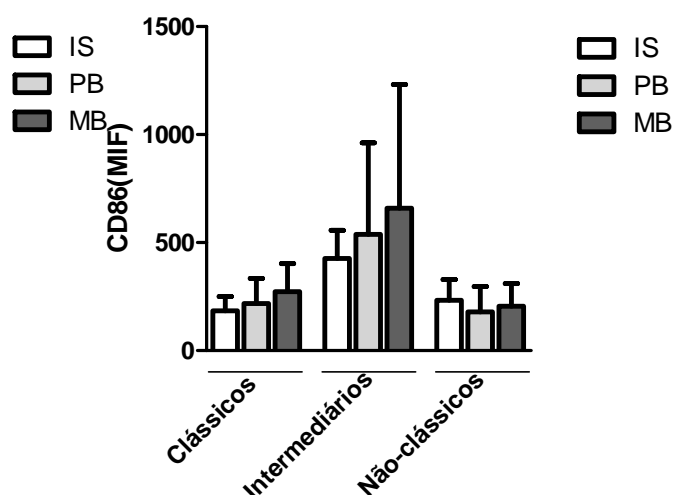
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE ATRAVÉS DASMOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS CD80, CD86 E MHCII

Para determinar o grau de ativação dos monócitos de pacientes com a forma PB e MB, foi avaliada a média de intensidade de fluorescência (MIF) de CD80 (Figura 3A), CD86 (Figura 3B) e MHCII (Figura 3C) nas subpopulações de monócitos. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa da MIF de CD80, CD86 e MHCII entre os grupos, existe uma tendência de aumento nos monócitos intermediários de pacientes PB e MB quando comparados aos indivíduos sadios.

A



B



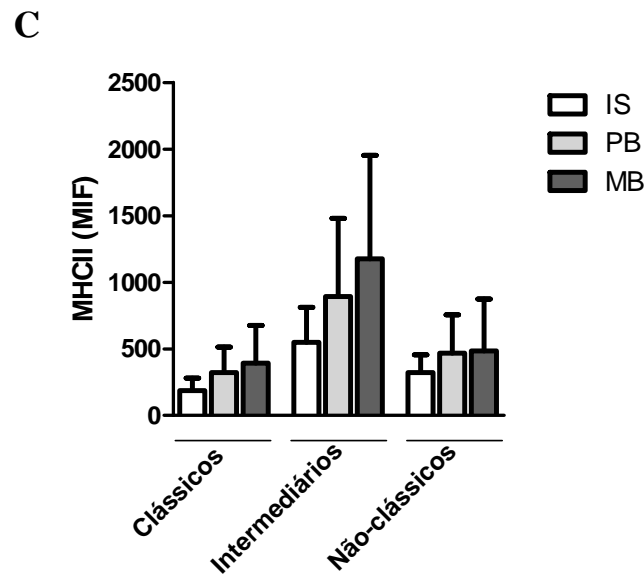


Figura 3. Média de intensidade de fluorescência (MFI) das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e MHC II nas subpopulações de monócitos em pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase. A média de intensidade de fluorescência das moléculas de ativação CD80 (A), CD86 (B) e MHCII (C) foi avaliada nas subpopulações de monócitos em IS (n=12) e pacientes com a forma PB (n=18) e MB (n=12). Para a análise estatística, foi utilizado Kruskal-Wallis e pós-teste Dunns. *P<0.05.

5.5 AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE

Para observarmos se há associação dos biomarcadores com desenvolvimento de reações hansênicas avaliamos as mudanças no perfil da expressão do receptor FPR1 (figura 4A e 4D), FPR2 (figura 4B e 4E) e MARCO (figura 4C e 4F), em monócitos de pacientes de hanseníase com as formas clínicas PB e MB que não desenvolveram surto reacional e pacientes que desenvolveram reações hansênicas. O MFI de FPR1 nos pacientes que não desenvolveram SR é aumento após o tratamento quando comparado ao D0. O MFI de FPR2 e MARCO são semelhantes no D0 e no meio do tratamento com PQT.

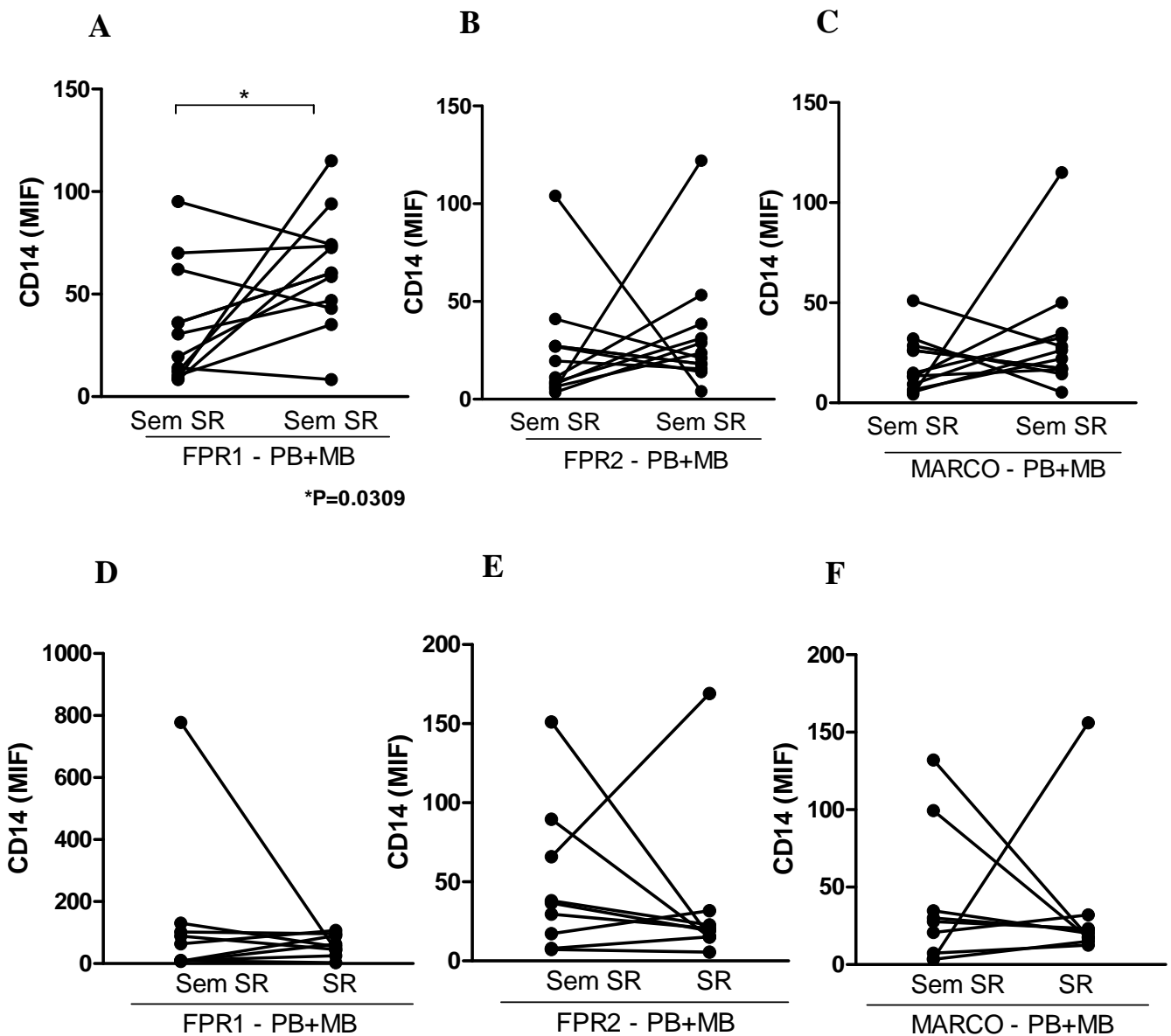


Figura 4. Avaliação da média de intensidade de fluorescência de MARCO, FPR1 E FPR2 em monócitos de pacientes com diferentes formas clínicas PB e MB antes do tratamento e durante a PQT, que desenvolveram ou não surto reacional. Pacientes com a forma PB+MB sem SR (n=12 D0) (Figura 4A, B, C), PB+MB com SR (n=09 D90/D180) (Figura 4D, E, F). Média de intensidade de fluorescência do receptor FPR1 (Figura A e D). Média de intensidade de fluorescência do receptor FPR2 (Figura B e E). Média de intensidade de fluorescência do receptor MARCO (Figura C e F). Os resultados são representados por medida de tendência central a mediana e analisadas por citometria de fluxo. Análise estatística pelo teste não-paramétrico Wilcoxon test usado para analisar a diferença entre os D0 e D90 dos PB; D0 e D180 da forma MB nas diferentes subpopulações de monócitos, *p<0,05.

6 DISCUSSÃO

Com os dados epidemiológicos do presente estudo constatamos uma elevada prevalência do sexo feminino sem reações hansênica (n=23) em relação ao sexo masculino (n=12) na distribuição de casos com hanseníase. Apesar de que os dados da literatura mostram que o sexo masculino é mais prevalente na hanseníase. Porém há na literatura trabalhos que mostram que poder haver uma distribuição similar em ambos os sexos ou predomínio para o sexo feminino (Lana et al., 2000; Grossi, 2005). Os participantes do estudo foram assim distribuídos: 35 pacientes com hanseníase, sendo 19 foram classificados com a forma paucibacilar e 12 eram pacientes com a forma multibacilar. Quanto à faixa etária, a média de idade foi de 48 anos no surgimento da doença, o que corrobora os dados da literatura (Lana et al., 2000).

A maioria dos casos nas doenças de longo período de incubação ocorre aproximadamente entre 20 e 50 anos, o que permite afirmar que a hanseníase é uma doença do adulto jovem e do adulto (Lana et al., 2000). Dos pacientes diagnosticados com hanseníase, 19 foram diagnosticados com a forma clínica paucibacilar e 16 com a forma clínica multibacilar. 15 pacientes paucibacilar continuaram sem a reação hansênica, 3 desenvolveram surto reacional (SR) e 1 chegou ao ambulatório com reação hansênica. Dos pacientes multibacilar 6 continuaram sem desenvolver o SR, 6 pacientes desenvolveram surto reacional (SR) no decorrer do tratamento e 4 chegaram com a reação hansênica. O tratamento poliquimioterápico recebido por 19 deles foi PQT paucibacilar e 14 receberam PQT multibacilar.

Quanto à forma clínica, na nossa amostra de pacientes com hanseníase sem reações há predomínio da forma paucibacilar (n=19) sobre a multibacilar (n=14), o que contraria alguns estudos da literatura, onde a maioria dos indivíduos é diagnosticada tardiamente, geralmente em alguma forma clínica multibacilar, especialmente em áreas desfavorecidas economicamente (Ribeiro Junior et al., 2012).

Quanto às formas clínicas de acordo a classificação de Ridley e Joplin na nossa amostra de pacientes com hanseníase sem reações há um predomínio da forma paucibacilar as mais encontradas foram a forma tuberculóide e borderline borderline. 4 pacientes foram classificados com a forma indeterminada (I), 8 pacientes com a forma tuberculóide (TT), 7 pacientes com a forma borderline tuberculóide (BT), 4 pacientes com a forma borderline

borderline (BB), 5 pacientes com a forma borderline virchowiano (BL), 4 pacientes com a forma virchowiano ou lepromatoso (LL) e 3 pacientes já chegaram com reação hansênica dos casos conforme exposto na tabela 1. Esta descrição da nossa amostra concorda com o que já foi descrito na literatura como, por exemplo, que cerca de 30% dos pacientes com hanseníase irão desenvolver a reação imune patológica, reação reversa (RR) ou ENL (Britton WJ *et al.*, 2004). Os controles foram 12 indivíduos saudáveis, com média de idade de $32,42 \pm 8,175$ (tabela 1). Na distribuição por sexo verificou-se que 03 eram do sexo masculino e 09 eram do sexo feminino, dentre os indivíduos saudáveis.

A hanseníase é uma doença causada pelo *M. leprae*, que se manifesta num amplo espectro de formas clínicas principalmente pelo tipo e magnitude da resposta imunológica montada pelo hospedeiro frente à exposição ao bacilo (Talhari, 2015). Os monócitos – células derivadas da medula óssea, cruciais para a resposta imune nas diferentes patologias inflamatórias (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2000) e, portanto, importantes na hanseníase são sub-divididas em diferentes sub-populações de acordo com a expressão de CD14 e CD16. Há poucos estudos sobre o papel dos monócitos na hanseníase. Outros estudos demonstraram *in-vitro*, que a exposição ao *M. leprae* não é capaz de levar a maturação e ativação de células dendríticas mensuradas pela expressão de marcadores de superfície e produção de citocinas inflamatórias como o *Mycobacterium tuberculosis* (Murray *et al.*, 2007). Estudos relataram que nas fases iniciais da infecção o *M. leprae* se mantém resistente a imunidade de células T mediadas por células dendríticas (Hashimoto *et al.*, 2002). Sinsimer, 2010 observou que ao estimular culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos saudáveis o antígeno do *M. leprae* é capaz de ativar de maneira fraca os macrófagos e células dendríticas (Sinsimer *et al.*, 2010; Manca *et al.*, 2012).

Cada uma destas sub-populações apresenta funções diversas, com diferenças inclusive quanto à expressão, como se tornam ativadas e o seu papel na resposta imunológica nas diferentes patologias.

Diante disso e de estudos realizados pelo nosso grupo por Shibuya e colaboradores e Bergheme e colaboradores utilizando como foco a hanseníase e as sub-populações de monócitos nós decidimos realizar este estudo com o objetivo de investigar biomarcadores em monócitos associados ao desenvolvimento das reações hansênicas, sendo estas as formas mais graves da hanseníase.

O primeiro dado desta dissertação apresenta como a população de monócitos foi determinada utilizando a técnica de citometria de fluxo (figura 1) e em seguida a frequência dos monócitos segundo as suas sub-populações, que foram determinadas em indivíduos saudáveis, pacientes PB e MB antes de iniciarem o tratamento com a PQT (figura 2). Os nossos dados corroboram com os dados da literatura, uma vez que a maior frequência é de monócitos clássicos tanto em pacientes PB, MB como em indivíduos saudáveis (Passlick *et al.*, 1989; Zeigler-Heitbrock, 2000; Moniuszko *et al.*, 2009). No entanto, a diferença da frequência só foi estatisticamente significativa entre os monócitos intermediários dos indivíduos saudáveis e pacientes PB. Devemos evidenciar que a significância biológica pode não ser relacionada com a estatística, já que os monócitos intermediários são bons apresentadores de antígenos (Zawada *et al.*, 2010) e estão em frequência elevada nos pacientes com hanseníase quando comparados aos indivíduos saudáveis.

O aumento da atividade dos monócitos pode ser correlacionado com o aumento da resposta linfoproliferativa ao *M. leprae* nos episódios de reação hansênica, no entanto a importância de uma possível ação imune supressora do *M. leprae* é discutida (Santos, dos 1994). Através de estímulos como LPS, os monócitos intermediários, são capazes de produzir citocinas como IL1 β , TNF e IL-10 (Cros *et al.*, 2010; Zawada *et al.*, 2011). Devido à expressão de genes que codificam moléculas de MHC II e genes envolvidos no processamento de antígenos, os monócitos intermediários são bons apresentadores de antígenos (Zawada *et al.*, 2010). Uma vez determinada a frequência dos monócitos (figura 2), investigamos como estas células são ativadas nas diferentes sub-populações nos pacientes com as formas PB e MB da hanseníase antes de iniciarem o tratamento com a PQT. A ativação dessas células é necessária para o desenvolvimento de resposta imune celular e eliminação do *M. leprae*. Para tanto, avaliamos a ativação celular utilizando CD80, CD86 e a molécula MHC II (figura 3). Dados revelam que CD80 possui uma maior avidéz de se ligar aos receptores quando comparada a molécula CD86 e que após a ligação de CD80 a uma indução da ligação de CD86 aos receptores, tendo maior afinidade pelo receptor CTLA-4 (Migliori, 2010) e que no sangue total de pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase durante o curso da reação hansênica tipo 2 (ENH) e tipo 1 (RR) há uma forte expressão de CD80 em contrapartida há uma diminuição na expressão desta molécula em pacientes lepromatosos antes do eritema nodoso hansênico (Santos *et al.*, 2006). Os nossos resultados demonstraram que os monócitos são ativados de forma mais eficiente por CD86 (figura 3B) em comparação à CD80 (figura 3A) e à molécula MHC II (figura 3C). Estudos tendo como objetivo o papel das moléculas CD80 e CD86 foram

realizados com pacientes com hanseníase e indivíduos sadios estimulados em cultura com antígenos de *M. leprae* (Santos et al., 2001; Sridevi et al., 2004), no entanto no presente estudo não utilizamos estímulo em nossas células.

As limitações ao se usar um sistema clínico na classificação de pacientes com hanseníase podem levar a condutas inadequadas, tratamento ineficaz mantendo a transmissão da doença (Croft et al., 1998 e Cripta et al., 2004). A classificação correta e precoce dos casos de hanseníase é uma importante ferramenta para o entendimento da doença e da evolução dos pacientes. Estudo anterior propôs o desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação do *M. leprae* em biópsias de pele em casos em que a baciloscopia foi negativa (Figueira, M et al., 2010). Estudo anterior que utilizou os biomarcadores MARCO, FPR1 e FPR2 (Dupnik KM et al., 2015) mostrou mudanças transcricionais que caracterizam a reação imune na hanseníase. Portanto, o nosso objetivo é realizar investigação de biomarcadores em monócitos de pacientes com hanseníase sem ser necessários realizar uma caracterização das diferentes sub-populações de monócitos, uma vez que a caracterização dos monócitos foi o objetivo de trabalho realizado por nosso grupo anteriormente (Bergheme *et al*, dados não publicados). Para tanto, categorizamos nossos resultados nas diferentes sub-populações de monócitos para demonstrarmos a frequência e ativação destes nas diferentes formas clínicas da hanseníase (PB e MB) comparando com os indivíduos sadios como grupo controle, mas como os resultados apresentaram concordância com o descrito na literatura (Passlick et al., 1989; Zeigler-Heitbrock, 2000; Moniuszko et al., 2009; Santos et al., 2001; Sridevi et al., 2004) a investigação quanto os biomarcadores foi realizada em monócitos sem diferenciar as sub-populações em pacientes antes de iniciar o tratamento com a PQT e pacientes que desenvolveram ou não a reação hansênica através da marcação de células CD14+ (figura 4). O avanço no conhecimento sobre o binômio, infecção-doença, tem mudado o conceito das doenças infecciosas e os marcadores biológicos tem tido um importante papel nesta área, contribuindo para diagnóstico das doenças, mas também com a atividade e remissão dos processos patológicos (Scheriefer *et al.*,2008). Algumas doenças infecciosas como as leishmanioses, doença de Chagas, hepatite viral e a síndrome de imunodeficiência adquirida foram descritas no século XX e a expressão clínica destas infecções é extremamente variável. Marcadores bioquímicos e imunológicos têm mostrado forte associação com câncer de próstata, câncer de intestino, câncer de fígado e de mama e têm sido amplamente utilizados como método auxiliar no diagnóstico das doenças auto-imunes e doenças inflamatórias crônicas. Marcadores genéticos têm sido associados com várias doenças e espera-se para o

século XXI um grande avanço no conhecimento sobre o papel de genes no desenvolvimento de doenças inflamatórias, neoplásicas e doenças infecciosas (Scheriefer, A 2008).

Sabe-se que os Receptores Scavenger (SR) são uma família de proteínas receptoras com grande capacidade para reconhecer lipoproteína de baixa densidade expressos na superfície celular principalmente de macrófagos, células dendríticas e células endoteliais (Murphy, 2005). Nestes receptores Scavenger, o MARCO é um marcador de ativação inata de macrófagos que é expresso na superfície celular de monócitos e macrófagos e está envolvido em eventos como fagocitose, apresentação de antígenos e remoção de células em apoptose, com grande capacidade de reconhecimento de organismos patogênicos gram-positivos e negativos, contribuindo assim para a defesa do hospedeiro contra a infecção (Peter JG; Siamon G, 2000). Estudos relatam que células que expressam MARCO não só se ligam, como também auxiliam na fagocitose, confirmando o papel de MARCO no controle da infecção (Migeotte et al., 2006; Rabiet et al., 2007, 2009; Le et al., 2002). Os receptores FPR1 e FPR2 estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos. Estes receptores fazem parte da resposta imune inata, expressos em neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, são moléculas associadas à quimiotaxia, contribuem para uma variedade de processos fisiológicos e defesa contra infecções bacterianas (Migeotte et al., 2006; Rabiet et al., 2007, 2009; Le et al., 2002). Os nossos resultados revelaram que FPR2 e MARCO (figura 4A, B,C,D,E e F) não se apresentaram eficientes como marcadores para diferenciar pacientes que desenvolveram ou não reação hansênica durante o tratamento, apesar de resultados em estudo anterior terem apresentado que quando os pacientes desenvolveram episódios reacionais os genes para estes marcadores estavam expressos duas vezes mais do que em indivíduos sadios (Dupnik KM et al., 2015). Temos que chamar a atenção de que estudo recente mostrou que pacientes com história de reação hansênica têm um perfil de expressão gênico único em resposta ao antígeno de *M. leprae in vitro* (Orlova M et al., 2013). O estudo de Dupnik a metodologia aplicada foi através de análise transcricional o que é um diferencial importante entre os resultados encontrados em nosso estudo e no citado. O FPR1 foi o biomarcador que apresentou diferença estatisticamente significativa na análise dos pacientes PB que não desenvolveram reação hansênica durante o tratamento (figura 4A).

7 CONCLUSÃO

Os monócitos intermediários tem maior expressão nos pacientes PB e a molécula CD86 e MHCII têm maior expressão em pacientes com a forma multibacilar, podendo exercer um

importante papel na sua patogênese. Os nossos dados sugerem que o receptor FPR1 pode ter um papel relevante para contribuir na amplificação da resposta inflamatória em indivíduos com hanseníase e sendo possivelmente estes os que desenvolverão a reação hansênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida NFB, Assis CVM, Oliveira FAF, De Souza FE, Tavares JLEV, Barros LVM, Oliveira SVM, Sousa SMB. TH17 cells, interleukin-17 and interferon- γ in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. J Eur Acad Dermatol Venereol. 1354-61, doi: 10,1111 / jdv.12869. 2014.

Amorim A C. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. Rev. Bras. Epidemiol.v. 6, 2003.

Araujo, S., J. Lobato, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. Memories of the Oswaldo Cruz Institute, 2012; 107 Suppl 1: 55-59.

Araújo MG. Hanseníase no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical36: 373-382. 2003.

_____. Análise do cluster da taxa de detecção geral de hanseníase no Brasil no triênio 2011-2013. MS/SVS/CGHDE- Sinan.

Barreto JA, Belone AFF, Fleury RN, Soares CT, Lauris JRP. Manifestações de padrão tuberculóide reacional na hanseníase dimorfa: estudo histoquímico e imuno-histoquímico comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia. Anais Brasileiros de Dermatologia80:68-74, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Hanseníase - Atividades de Controle e Manual de Procedimentos. Brasília, 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Guia para Hanseníase. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Gestão de Políticas Estratégicas. ATDS; 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em 22 de julho de 2016.

Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. Lancet363:1209-1219. 2004.

Chakma JK, Malaviya GN, Girdhar A, Hussein S. Florid reactive periostitis ossificans of long bones and digits associated with reaction in a patient with leprosy. Lepr Rev. 83:98-103. 2012.

Costa RD, Mendonça VA, Lyon S, Penido RA, Costa AMDD, Costa MD, Nishi MP, Teixeira MM, Teixeira AL, Antunes CMF. Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 β) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com hanseníase. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.41(2):99-103, 2008.

Croft R.P., Smith W., Nicholls P., Richardus J.H. Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skinsmears examination. International Journal of Leprosy, v. 66, p. 445-450, 1998.

Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. Immunity2010;33:375-86.

Dupnik KM, Bair TB, Maia AO, Amorim FM, Costa MR, Keesen TS, Valverde JG, Queiroz MC, Medeiros LL, Lucena NL, Wilson ME, Nobre ML, Johnson WD jr, Jeronimo SM. Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. Oxford Journals. The Journal of Infectious Diseases.2005.

Eichelmann, K., S. E. Gonzalez Gonzalez, et al. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment." Actas Dermo-Sifiliográfica, v.104(7): 554-563, 2013.

Feenstra, S. G., Q. Nahar, et al. A qualitative exploration of social contact patterns relevant to airborne infectious diseases in northwest Bangladesh. Journal of Health, Population and Nutrition, v.31(4): 424-434,2013.

_____. Guide to eliminate leprosy as a public health problem. Geneva: World Health Organization; 1995.

Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 35(4):365-75, 2002.

_____. Hanseníase no mundo: World Health Organization; 2014.

Kraal G, Lann VDLJ, Elomaa O, Tryggvason K, The macrophage receptor MARCO. Elsevier, 2000.

Kahawita, I P; Walker, SL; Lockwood, DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. Anais Brasileiros de Dermatologia, v 83, n. 1, p. 75-82, 2008.

Kahawita IP, Lockwood, DNJ. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 102, 329-337, 2008.

Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. J Am Acad Dermatol. 71(4):795-803. 2014.

Lana FCF, Lima RF, Araújo MG, Fonseca PTS. Situação epidemiológica da hanseníase no município de Belo Horizonte/MG Período 92/97. Hansenologia Internationalis, 25(2): 121-132, 2000.

LE, Y; Murphy, P.M; Wang, J.M. Formyl-peptide receptors revisited. Trends Immunol. 2002.

Lienhardt C, Fine PE. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? Leprosy Review 1994;65:9-33.

Lockwood DN, Suneetha L, Sagili kd, Chaduvula MV, Mohammed I, VAN BW, Smith WC, Nicholls P, Suneetha S. Cytokine and protein 82 markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. PLoS Negl Trop Dis 5; e1327, 2011.

Machado PRL, Araújo MIAS, Carvalho L, Carvalho EM. Mecanismo de resposta imune às infecções às infecções. Anais Brasileiro de Dermatologia. 79(6):647-64, 2004.

Manca C, Peixoto B, Malaga W, Guilhot C, Kaplan G. Modulation of the cytokine response in human monocytes by *M. leprae* phenolic glycolipid-1. Journal of Interferon & Cytokine Research. 32(1):27-33, 2012.

Massone C, Talhari C, Ribeiro-Rodrigues R, et al. Leprosy and HIV coinfection: a critical approach. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 9:701-710, 2011.

Mendonça VA, Costa RD, Melo Geba, Antunes CM, Teixeira AL. Immunology of leprosy. An Bras Dermatol 83:343-50, 2008.

Meyerson MS. Erythema nodosum leprosum. Int J Dermatol 35:389-92, 1996.

Migeotte, I.; Communi, D.; Parmentier, M. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. Cytokine e Growth Factor rev. 2006.

Migliori IK. Uso de RNA de interferência para modulação das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 em células dendríticas. Programa de Pós graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo: São Paulo, 2010.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Controle da hanseníase na atenção básica: guia prático para profissionais da equipe de saúde da família. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

Modlin RL. The innate immune response in leprosy. Curr Opin Immunol 22(1): 48–54. Doi: 10.1016/j.coi.2009.12.001, 2010.

Moniuszko M, Bodzenta-Luaszyk A, Kowal K, Lenczewska D, Dabrowska M. Enhanced frequencies of CD14⁺⁺CD16⁺, but not CD14⁺CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. Clinical Immunology. 130(3):338-46, 2009.

Montoya D, Modlin RL, “Learning from leprosy. Insight into the human innate immune response”. Advances in Immunology, vol. 105, no.C, pp. 1-24, 2010.

Moreno EG, Arriaza MM, Martinez MDN, Lirola MJM. Confirmación molecular de um caso de lepra de especial dificultad diagnóstica. Enfermedades Infecciosas Microbiology Clinical. 30(5):271-7, 2012.

Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* Inhibits Dendritic Cell Activation and Maturation. The Journal of Immunology. 178:338-44, 2007.

Murphy JE, Tedbury, Vanniasinkam PH, Walker S, Ponnambalam S. Bioquímica e biologia celular de receptors depuradores de mamíferos. Atherosclerosis, 2005.

Opromolla, D. V. A. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 126p, 2000.

Passilick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocytes subpopulation in human peripheral blood. Blood. 74(7):2527-34, 1989.

Peter JG, Siamon. O papel dos receptores scavenger no sistema imune inato, Elsevier. v2, n.3, p 305-311, 2000.

Rabiet, M.J.; Huet, E.; Boulay, F. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview. Biochimie, 2007.

Ramos SM, Rebello PF. Leprosy. Recognition and treatment. American Journal of Clinical Dermatology. 2(4):203-11, 2001.

Ribeiro Júnior A.F, Vieira M.A, Caldeira A.P. Perfil epidemiológico da hanseníase em uma cidade endêmica no Norte de Minas Gerais. 70. Revista Brasileira de Clínica Médica São Paulo, 2012.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis 34:255-73, 1996.

Rutkowski R, Moniuszko TY, Stasiak-Barmuta A, Kosztyla-Hojna B, Alifier M, Rutkowski K, Tatarczuk-Krawiel A. CD80 and CD86 Expression on LPS-Stimulated monocytes and the effect of CD80 blockade on IL-4 and IFN- γ production in nonatopic bronchial asthma. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 51: 421-28, 2003.

Sales, A. M., A. Ponce de Leon, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2011; 5(3): 2013.

Sampaio LH, Sousa ALM, Barcelos MC, Ganância S, Stefani MMA, Duthie MS. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy. Eur J Clin Infect Dis Microbiol31(7):1443-1451. Doi: 10.1007/s10096-011-1462-0. 2012.

Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JA, Defruyt M, Lorré K, Van HH. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) coestimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi Japanese Journal of Leprosy. 78(1):15-24, 2001.

Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van HH, Nery JA, Miranda A. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. Clinical and Experimental Dermatology.32:75-80, 2006.

Saunderson P, Gebre S, Desta K, Byass P, Lockwood DN. The pattern of leprosy-related neuropathy in the AMFES patients in Ethiopia: definitions, incidence, risk factors and outcome. Lepr Rev. 71(3):285-308. 2000.

Schriefer A, Carvalho E M. Biomarkers in Medicine. Gazeta Médica da Bahia, 2008.

Sridevi K, Neena K, Chitralkha KT, Arif AK, Tomar D, Rao DN. Expression ofcoestimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using M. leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trat protein. International Immunopharmacology.4:1-14, 2004.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin Microbiol Rev19:338-81, 2006.

Sehgal VN, Srivastava G, Sundharam. Immunology of reactions in leprosy.Int J Dermatol 27:157-62, 1988.

Sharma N, Koranne RV, Mendiratta V, Sharma RC. A study of leprosy reactions in a tertiary hospital in Delhi.J Dermatol31:898-903, 2004.

Sinsimer D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* Actively Modulates the Cytokine Response in naïve human Monocytes. Infection and Immunology. 78(1):293-300, 2010.

Souza, C.S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. Medicina, Ribeirão Preto, v.30: 325-334, 1997.

Stefani MM, Guerra JG, Sousa ALM, Costa MB, Oliveira MLW, Martelli CT, Scollard DV. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. BioMedCentral Infectious Diseases, 9:75, 2009.

Talhari S, Neves RG. Dermatologia Tropical: hanseníase. Manaus: Editora Tropical; 1997.

Talhari, C., S. Talhari, et al. Clinical aspects of leprosy. Clinical Dermatology, v.33 (1): 26-37, 2015.

Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. Br Med Bull77:103-21, 2006.

Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, Heine GH. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocytes subset. Blood. 118 (12):50-61, 2011.

Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human monocytes. Journal of leukocytes biology. 67:603-6, Blood, 2000.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood, 116:74-80, 2010.

MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO

INVESTIGATION OF BIOMARKERS TO IDENTIFY LEPROSY REACTION DEVELOPMENT

Ivonete S Queiroz¹, Rúbia S Costa¹, Jamile Rêgo¹, Lucas P Carvalho^{1,2,3}, Paulo R L Machado^{1,2,3} and Sara Passos^{1,2}

1 Serviço de Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil,

2 Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia – Doenças Tropicais, Salvador, Bahia, Brazil,

3 Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.

Keywords: Monocytes, Co-stimulatory molecules, Leprosy, Leprosy reactions

Correspondent Author: Sara Passos. saratpassos@hotmail.com. Rua João das Botas, S/N, Serviço de Imunologia, 5 andar – Canela. Salvador-Bahia-Brazil. 40.110-160.

ABSTRACT.

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, characterized by skin lesions and extensive clinical presentation which depends mainly on the immune front of the host response to infection by *Mycobacterium leprae*. This infection is distributed worldwide persist as a serious public health problem in Brazil. Disability and lasting deformities resulting from reaction symptoms can occur before, during or after the institution of specific treatment. Reactional inflammatory episodes are due to the abrupt exacerbation of immune cell-mediated response against *M. leprae* antigens. The episode reaction type 1 or reverse reaction is an acute inflammatory occurrence that affects the skin and peripheral nerves, and common cause of disability. Reaction type 2 or ENL only affects lepromatous patients (LL) and borderline-lepromatous (BL) with the presence of many bacilli and little or no cellular immunity to *M. leprae*. To assess the association of biomarkers MARCO Scavenger, Formyl peptide receptor (FPR1) and N-formyl peptide receptor 2 (FPR2) in monocytes of patients with leprosy associated with the development of leprosy reactions, mononuclear cells from peripheral blood were obtained from patients with different clinical forms of leprosy. To achieve this goal peripheral blood mononuclear cells were obtained from patients with different clinical forms of leprosy. The cell surface stain was performed by flow cytometry and the data analyzed with FlowJo in 35 patients with leprosy, divided into 19 paucibacillary and 16 multibacillary patients. Our results showed that patients with the paucibacillary form exhibit increased monocyte frequency. There was no statistical difference

in the mean fluorescence intensity (MFI) of CD80, CD86 and MHC II between monocytes of paucibacillary and multibacillary leprosy patients. However, intermediate monocytes from patients with the multibacillary form had higher mean fluorescence intensity in CD86 and MCHII. Our data suggest that the FPR1 receptor may play a relevant role in detecting the amplification of the inflammatory response of individuals with leprosy when compared with the other molecules applied in this study.

Keywords: Leprosy. Reverse Reaction. Erythema Nodosum Leprosum. MARCO Scavenger, FPR1 and FPR2.

INTRODUCTION.

Leprosy is an infectious and chronic disease caused by bacillus gram - positive, *Mycobacterium leprae*. The disease is characterized mainly by involvement of the skin, and transmission is usually through the upper airway by inhalation of charged droplets of bacteria from the lungs of an infected person to a healthy person (Mendonca et al., 2008). Leprosy presents a wide clinical spectrum, which according to the health ministry classified into two classes, multibacillary (MB) and paucibacillary (PB) (Ministry of Health, 2001). However, there is another classification of leprosy, established according to Ridley & Joplin in 1966, which classifies patients in the following ways: TT (tuberculoid), BT (borderline-tuberculoid), BB (borderline-borderline), BL (borderline-lepromatous) and LL (lepromatous-lepromatous) (Opromolla et al., 2000). These clinical conditions may be accompanied by reactional events that may occur before, during or after introduction of the treatment. Leprosy reactions represents changes in the immune system that appear as acute and sub-acute inflammatory manifestations. They occur more often in multibacillary cases and mainly affects the nerves and skin (REF). Leprosy reactions can be of two types, type 1 reaction to where the pre-existing skin lesions become more erythematous, swollen, edematous and infiltrated and the limits of the lesions

become more clear and defined. Type 2 reaction affects patients called lepromatous and dimorphic - and is known as a change of humoral immunity. In this reaction can observe the appearance of papules, nodules and plates, erythematous, painful, in normal looking skin, distributing itself uniformly throughout the body, preferably the surfaces of the limbs and face (Lienhardt et al. 1994 ; Kahawita et al, 2008). Reaction type 2 occurs in individuals whose cellular immune response to destroy the bacilli is decreased, predominantly humoral response. The evolution of the clinical forms of leprosy for the reverse reactions is an important point of scientific research in leprosy. Molecules as MARCO, FPR1 and FPR2 may be present in macrophages, neutrophils or dendritic cells and have multiple functions, being able to act on the chemotaxis and phagocytosis by macrophages (REF). There are no effective biomarkers for leprosy in order to contribute to the early identification of reactional states in leprosy patients. Therefore, we seek biomarkers expressed in monocytes able to perform evaluation of the clinical presentation in patient with leprosy to the reaction form of the disease.

MATERIAL AND METHODS.

This study was conducted with Dermatology Clinic of Magalhães Neto at the University Hospital Prof. Edgar Santos, located in Salvador, Bahia there is a reference center for the treatment of dermatological diseases and their complications. It has been operating since 1992 and serves about 60 new leprosy patients per year. This is a cohort study of leprosy patients living in Bahia and healthy individuals not contacts of leprosy patients. The sample consisted of 35 leprosy patients, 19 patients diagnosed with paucibacillary and 16 patients with multibacillary, all accompanied during treatment to identify the reactive episodes and 12 healthy subjects as a control group were included. To develop this study separation of mononuclear cells from peripheral blood was performed and stain with monoclonal antibodies to flow cytometry analysis with the objective to identified the monocytes subpopulations and evaluation for co-stimulatory markers and identification of the

biomarkers in the different groups of patients. All statistical analysis was performed with GraphPad InStat 5.0 and all the individuals sign a informed consent to participate the study that was part of a project funded by the National Institute of Science and Technology in Tropical Diseases (No.573839/2008-5) and was approved by the Research Ethics Committee (50/2010).

RESULTS.

The existence of different populations of human monocytes in peripheral blood is already well established in the literature. Based on the expression of cell surface molecules CD14 and CD16, monocytes were divided into classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺) and nonclassical (CD14⁺ CD16⁺⁺). Figure 1 illustrates the regions where the analysis for CD14 and CD16 expression were performed according to the cell size and granularity (Figure 1).

Data in the literature show that the population of classical monocyte is present more often in the peripheral blood of individuals, followed by non-classical and intermediates. In this paper we compare the frequency of subpopulations of monocytes of patients with paucibacillary and multibacillary with healthy subjects. Our results showed that the population of classical monocytes are more frequent in the 3 study groups (Figure 2).

To further characterize these subpopulations of monocytes the CD80 (Figure 3A), CD86 (Figure 3B), and expression of MHCII (Figure 3C) were analyzed in subpopulations of classical, intermediate and nonclassical monocytes in paucibacillary and multibacillary leprosy patients and healthy individuals (IS), in order to verify the activation of these cells. The results showed that intermediate monocytes are the most activated population of monocytes by CD80, CD86 and MHCII (Figure 3). Although not given statistically

significant difference between different groups of patients or the different subpopulations of monocytes.

The biomarkers – FPR1, FPR2 and MARCO – were investigated to be able to identify a leprosy reaction development. To develop this, we decided to investigate these molecules in the monocyte gate – CD14⁺ cells in leprosy patients (D0) and when they develop leprosy reaction or not (Figure 5). At this analysis we found that FPR1 presented an important drop of mean of fluorescence intensity when the patients develop a leprosy reaction (Figure 4A) with a statistical difference when compared with the other molecules in this study – FPR2 and MARCO..

DISCUSSION.

Leprosy is a disease caused by *M. leprae*, which manifests itself in a wide spectrum of clinical presentations mainly by the type and magnitude of the immune response mounted by the host upon exposure to the bacillus (Talhari, 2015). Monocytes - cells derived from bone marrow are crucial for the immune response in different inflammatory pathologies (Ziegler-Heitbrock et al, 2000) and, therefore, important in Hansen are sub-divided into subpopulations according to the expression CD14 and CD16 (REF). Each of these sub-populations has various functions, including differences with regard to expression, as they become activated and their role in the immune response in different pathologies. Based on studies by our group (Shibuya and Bergheme) that had focus on leprosy and subpopulations of monocytes, we decided to conduct this study in order to investigate biomarkers in monocytes associated with the development of leprosy reactions, these being the more severe forms of leprosy.

The first figure at this publication presented a determination of monocyte population using flow cytometry technique (Figure 1) and then the frequency of monocytes according to their sub-populations that were determined in healthy individuals, PB and MB patients (Figure 2). Our data corroborate the literature, since the higher frequency is classical monocytes in both PB patients, MB and in healthy individuals (Passlick et al., 1989; Ziegler-Heitbrock, 2000; Moniuszko et al., 2009). However, the difference in the frequency was not statistically significant between the intermediate monocytes from healthy subjects and PB and MB

patients. We must highlight that the biological significance can not be related to the statistics, since the intermediate monocytes are good presenters of antigens (Zawada et al., 2010) and are in high frequency in leprosy patients when compared to healthy subjects. Once determined the frequency of monocytes (Figure 3), we investigate how these cells are activated in different subpopulations in patients with PB and MB forms of leprosy before starting treatment with MDT. To this end, we evaluated cell activation using CD80, CD86 and MHC II molecule (Figure 4). Data show that CD80 has a greater avidity of binding to the receptors when compared to CD86 molecule and upon binding CD80 to an induction of binding CD86 to receptors having more affinity for CTLA-4 receptor (Migliori, 2010) and in whole blood of patients with lepromatous leprosy during the course of type leprosy reaction 2 (ENL), type 1 (RR) there is a strong expression of CD80 in return there is a decrease in the expression of this molecule in lepromatous patients before erythema nodosum leprosum (Santos et al., 2006). Our results demonstrated that monocytes are activated more efficiently by CD86 (Figure 4B) in comparison to CD80 (figure 4A) and MHC II molecule (Figure 4C). Studies aiming the role of CD80 and CD86 molecules were performed with leprosy patients and healthy individuals stimulated in culture with *M. leprae* antigens (Santos et al., 2001; Sridevi et al., 2004), but we did not use stimulus in our cells. Our goal is to perform investigation of biomarkers in patient monocytes leprosy without being necessary perform a characterization of subpopulations of monocytes, since this was the aim of work performed by our group previously (Bergheme et al, unpublished data). Therefore, we only categorize our results in the different sub-populations of monocytes to demonstrate the frequency and activation of these in different clinical forms of leprosy (PB and MB) compared to healthy subjects as a control group, but the results showed agreement with the described in the literature (Passlick et al., 1989; Zeigler-Heitbrock, 2000; Moniuszko et al, 2009;. Santos et al., 2001;. Sridevi et al, 2004). Investigation of the molecules – FPR1, FPR2 and MARCO as biomarkers was performed in subpopulations of monocytes before and during treatment (figure 5) and in monocytes from patients before starting the treatment with MDT and patients who developed leprosy reaction by marking CD14 + cells (figure 6). Previous study using biomarkers MARCO, FPR1 and FPR2 (Jeronimo et al., YEAR) showed transcriptional changes that characterize the immune response in leprosy. It is known that Scavenger Receptors (SR) are a family of receptor proteins with large capacity to recognize low density lipoprotein expressed on the cell surface mainly macrophages, dendritic cells and endothelial cells (Murphy, 2005). In these Scavenger receptors, MARCO is an innate activation marker of macrophages which is expressed on the cell surface of monocytes and

macrophages and is involved in events such as phagocytosis, antigen presentation and removal of apoptotic cells, with great capacity for recognition of pathogenic organisms gram-positive and negative, thus contributing to the host defense against infection (4). Studies report that cells expressing MARCO not only bind but also assist in phagocytosis, confirming the role MARCO in infection control (6).

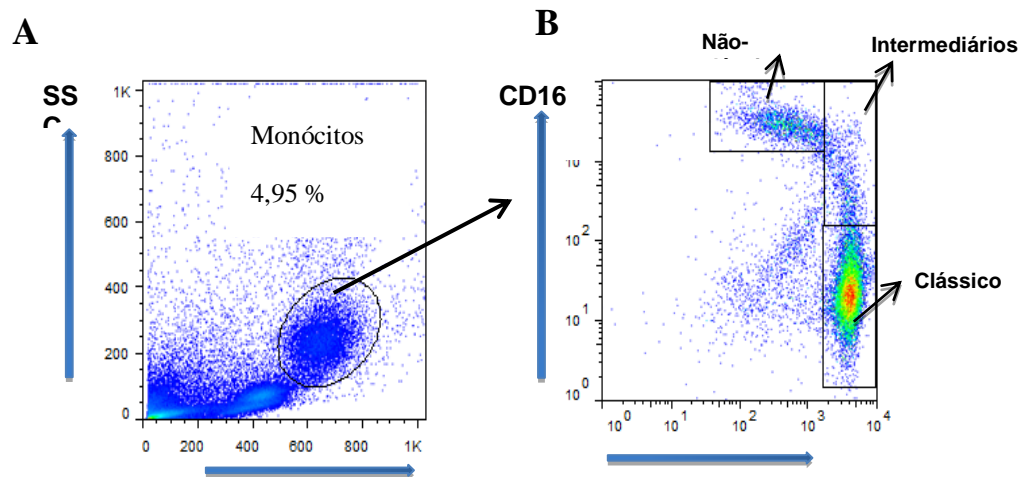


Figure 1. Ex-vivo analysis of the frequency of monocyte subpopulations in leprosy patients. (A) Identification of the monocyte gate by expression of SSC (size) and FSC (granularity) parameters in PBMC of leprosy patients and (B) Plot representative of subpopulations of monocytes in PBMC of leprosy patients identifying them as : Classics (CD14 + CD16-), Intermediates (CD14 + CD16 +) and Non-Classics (CD14 + CD16 ++).

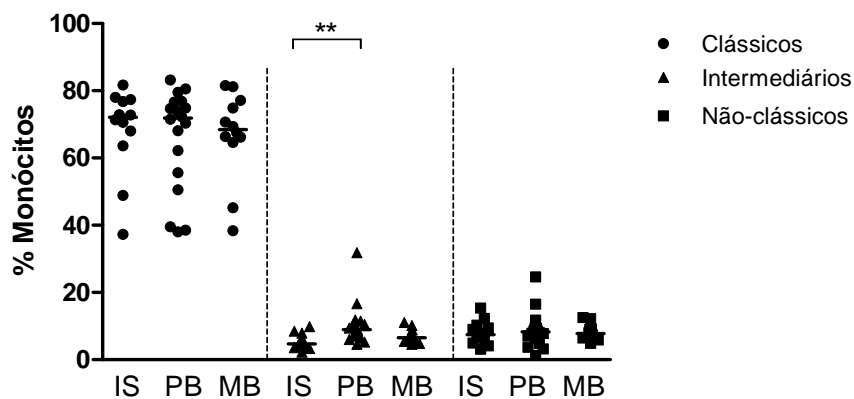


Figure 2. Frequency of subpopulations of monocytes in PBMC from healthy subjects and leprosy patients, prior to treatment. The monocytes were characterized according to the expression of CD14 and CD16 on the cell surface and the frequency of monocyte subpopulations of healthy individuals (n = 12) and patients with PB (n = 18) and MB (n = 12) Of leprosy was assessed by flow cytometry. The Kruskal-Wallis test and Dunns post-test were used for statistical analysis. ** P <0.0001.

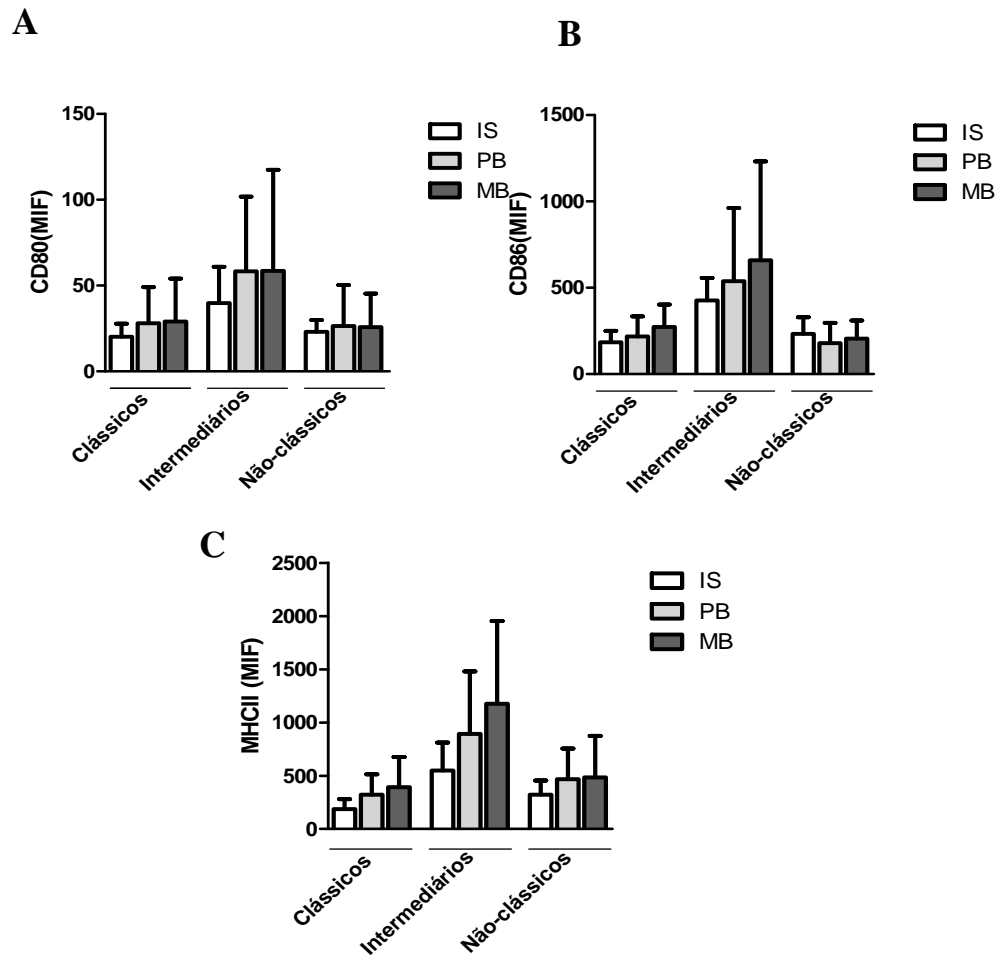


Figure 3. Average fluorescence intensity (MFI) of the costimulatory molecules CD80, CD86 and MHC II in subpopulations of monocytes in patients with different clinical forms of leprosy. The mean fluorescence intensity of the activation molecules CD80 (A), CD86 (B) and MHCII (C) was evaluated in the subpopulations of monocytes in IS (n = 12) and patients with PB (n = 18) and MB (N = 12). For the statistical analysis, Kruskal-Wallis and Dunns post-test were used. * P < 0.05.

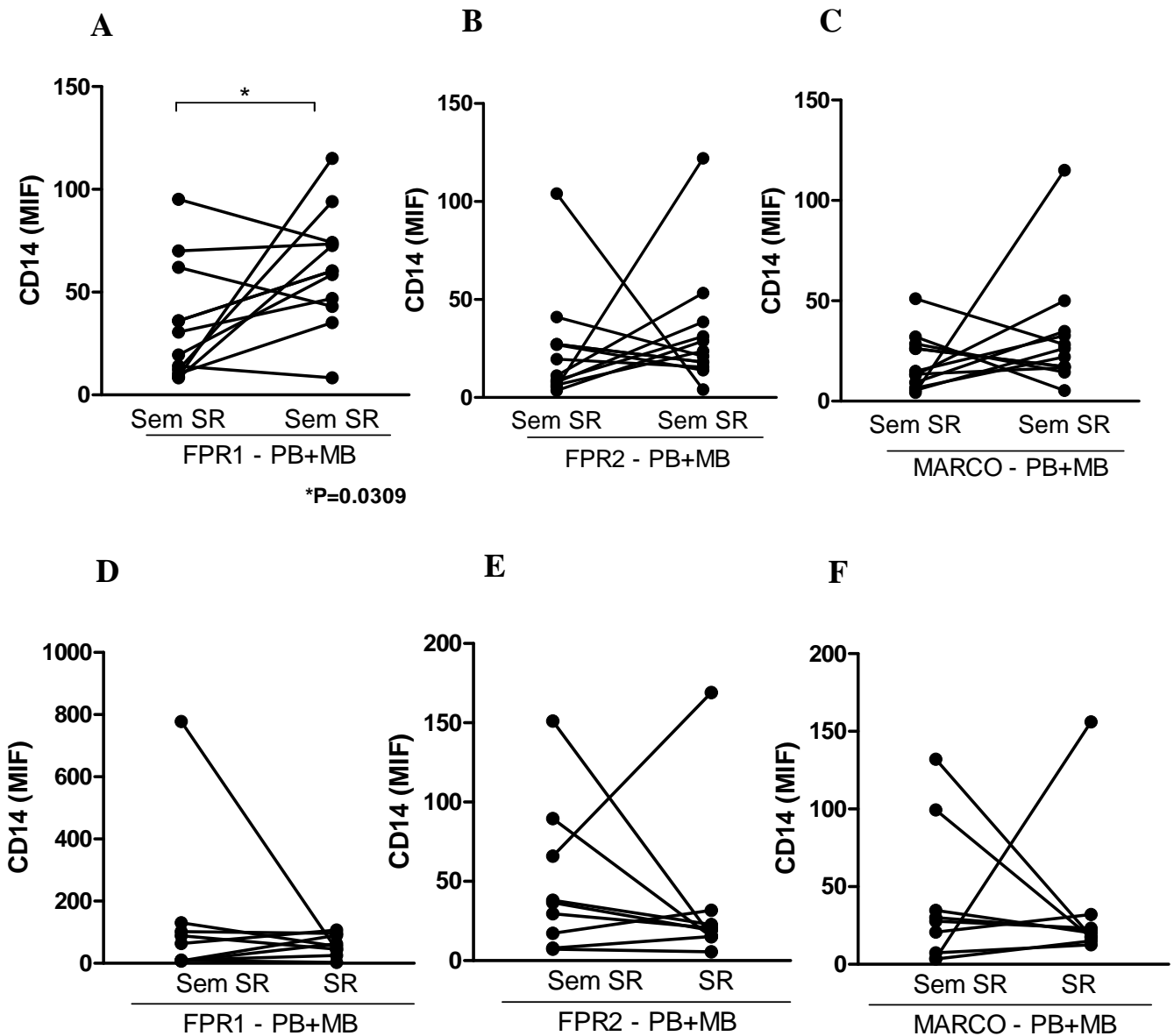


Figure 4. Evaluation of the mean fluorescence intensity of MARCO, FPR1 and FPR2 in monocytes of patients with different clinical forms PB and MB before treatment and during MDT who developed or not reactional outbreak. Patients with PB + MB without SR (n = 12 D0) (Figure 4A, B, C), PB + MB with SR (n = 09 D90 / D180) (Figure 4D, E, F). Mean fluorescence intensity of the FPR1 receptor (Figure A and D). Average fluorescence intensity of the FPR2 receptor (Figure B and E). Mean fluorescence intensity of the MARCO receptor (Figure C and F). The results are represented by a central to median trend measurement and analyzed by flow cytometry. Statistical analysis by the non-parametric Wilcoxon test used to analyze the difference between the D0 and D90 of PB; D0 and D180 of the MB form in the different subpopulations of monocytes, * $p < 0.05$.

REFERENCES.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes



**AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS– UFBA**

Rua Augusto Viana, s/n – Canela – CEP 40140.000 – Salvador-BA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR DO ESTUDO “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE”

Investigador Principal: Paulo Roberto Lima Machado, Médico, Ambulatório de Hanseníase, Serviço de Dermatologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – UFBA, Rua João da Botas s/n, Canela, CEP 40.110-160, Salvador-BA

Nome do Paciente: _____

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar a associação entre resposta imune e genética com as formas clínicas da hanseníase e estados reacionais. Esta participação implica na sua concordância em submeter-se a uma coleta de amostra de sangue retirada de um fragmento da lesão de pele (biópsia). Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico.

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada.

Finalidade do estudo:

Este estudo tem a finalidade de avaliar a influência da resposta imune nas formas clínicas da hanseníase e estados reacionais.

Procedimentos:

Caso concorde em participar do estudo, você doará 40 mililitros de sangue venoso, que será coletado por profissional capacitado para tal, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. Além disso, será feita uma biópsia da lesão de pele após anestesia local, procedimento usado normalmente para o diagnóstico da doença.

Confidencialidade:

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Análise dos Riscos e Benefícios:

A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve e sangramento após retirada da agulha. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados. A biópsia de pele é a retirada de pequeno fragmento da lesão de pele, sendo rotina para o diagnóstico de sua doença. Será feita somente após anestesia local por médico do ambulatório de hanseníase, para evitar desconforto ou dor e poderá deixar uma cicatriz.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:

Este estudo visa avaliar a existência de interação da resposta imunológica com a Hanseníase. O conhecimento preciso dessa interação poderá resultar no desenvolvimento de novas estratégias no controle da doença e principalmente dos episódios reacionais.

Custos:

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Esclarecimentos:

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Paulo Roberto Lima Machado, coordenador do projeto, médico do Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, João das Botas, s/n – Canela, telefone (71) 33396154, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, na pessoa do Dr. Roberto Badaró, no endereço Rua Augusto Viana S/N – Canela, telefone (071) 3283-8140.

Consentimento:

Se você leu o consentimento livre e esclarecido ou este lhe foi explicado e você concorda em participar voluntariamente deste estudo, favor assinar o nome ou colocar sua impressão digital abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário.

Assinatura ou impressão digital do Participante ou Responsável

Assinatura do Pesquisador

Local: _____ Data ____/____/____ Hora: _____

ANEXO II

Modelo da Ficha clínica e questionário – PACIENTES



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS
AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE
SERVIÇO DE IMUNOLOGIA**

**AValiação DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS EM
HANSENÍASE**

FICHA CLÍNICA

A – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

- 1- INICIAIS – RG HUPES: _____
- 2- DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____
- 3- IDADE: _____ ANOS
- 4- GÊNERO: a. Masculino () b. Feminino ()
- 5- FOTOTIPO (fitzpatrick): a. I () b. II () c. III () d. IV () e. V () f. VI ()
- 6- PROFISSÃO: _____ 7- TELEFONE: _____
- 8- COMUNICANTE COM M.H.: () Sim () Não Quantos?

B – DADOS CLÍNICOS

1-MÊS E ANO DE DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE:

2-CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE: a. I () b. TT () c. BT () d. BB () e. BL () f. LL ()

3-SURTO REACIONAL: a) Tipo I () b) Tipo II () c) não classificado () d) não ()

4-BACIOSCOPIA: a) Negativa () b) Positiva () IB=_____

5- _____ AP:

6-APRESENTA OUTRAS DOENÇAS CRÔNICAS? Sim () Não ()

Quais?

7-ENCONTRA-SE EM USO DE MEDICAMENTOS? Sim () Não ()

Quais?

8-COLETA DE SANGUE:

a) Data ____/____/____ PQT: () Sim () Não SR1 () SR2 () sem SR () Pred () Talid () ImSup ()

b) Data ____/____/____ PQT: () Sim () Não SR1 () SR2 () sem SR () Pred () Talid () ImSup ()

c) Data ____/____/____ PQT: () Sim () Não SR1 () SR2 () sem SR () Pred () Talid () ImSup ()

9- PQT: () MB () PB DATA INÍCIO: ____/____/____ DATA ALTA: ____/____/____

() ESQUEMA ALTERNATIVO. QUAL? _____

RESPOSÁVEL

PELA

AVALIAÇÃO:

DATA: ____/____/____ 97

II. ESCOLARIDADE:

0: sem escolaridade **1:** I grau incompleto
 2: I grau completo **3:** II grau incompleto
 4: II grau completo **5:** III grau incompleto
 6: III grau completo

II. EPIDEMIOLOGIA

Município de Nascimento: _____ UF I _____
 Residiu em outros municípios por período igual ou superior a 6 meses? **0:** não **1:** sim
 Quais? Município _____ UF _____
 Município _____ UF _____
 Município _____ UF _____
 Tempo de moradia no endereço atual:
 1. Menos de 6 meses **3.** 1 a 2 anos
 2. 6 meses a 1 ano **4.** 2 a 5 anos **5.** Mais de 5anos
 Total Renda familiar:
 0. Sem renda **1.** Até 1 salário mínimo (SM)
 2. 1 a 2 SM **3.** 2 a 3 SM **4.** 3 a 4 SM **5.** Mais de 4 SM

III. ANTECEDENTES PESSOAIS:

Tuberculose 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação. Idade _____
 Diabetes 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação
 HAS 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação
 Alergia 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação
 Outros _____

 Internamentos 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação
 Causa (s) _____

IV. ANTECEDENTES FAMILIARES:

Hanseníase na família 0: não 1: sim 99: não sabe _____ Número de casos
 Hanseníase na residência 0: não 1: sim 99: não sabe _____ Número de casos
 Parentesco com o (s) caso (s) de HANSEN 1: seu pai 2: sua mãe 3: seu filho
 (a) 4: seu esposo (a) 5: outros, especificar: _____

V. CLASSIFICAÇÃO FINAL PARA ESTE ESTUDO

CASO CONTROLE REAVALIAR APÓS 6M

ANEXO III



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE EM CONTROLES
SADIOS**

Título do Projeto:

Investigador Principal: Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Comitê de Ética: Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n - 1º andar, Canela **CEP:** 40.110-060 Salvador – Bahia- fone: (71) 3283-8140.

Nome do Participante: _____

Número de Identificação no Projeto:

Convite e Objetivo:

Você é convidado (a) a participar como voluntário de um estudo que tem como objetivo entender sobre o papel dos biomarcadores nas reações hansênicas. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo aos médicos que fazem parte do projeto. Antes de concordar em participar desta pesquisa é importante que você leia este documento, e caso decida participar do estudo você será solicitado (a) a assinar este formulário de consentimento.

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da doença Hanseníase. Você é livre para recusar a participar no estudo.

Finalidade do Estudo:

Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela hanseníase. Para isto estudaremos o seu sangue.

Procedimentos:

Caso concorde em participar do estudo, você doará 20 ml de sangue (mais ou menos 1 xícara de café pequenas) para separação das células de defesa e pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo frente à infecção por Hanseníase.

Confidencialidade:

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Análises de Riscos e Benefícios:

A retirada de sangue nos pacientes pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanha de sangramento ou mancha na pele. A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:

O entendimento de como a resposta imune contribui para o desenvolvimento da Hanseníase trará benefícios grandes aos portadores da doença, inclusive o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Custos:

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contactar um dos seguintes investigadores pelo telefone 71- 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho e Dr. Paulo Machado. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone: (71) 3283-8140.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor rubricar todas as páginas e assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar e a outra ficará com o pesquisador.

O pesquisador rubricará todas as páginas e assinará esse consentimento.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para estudo.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue e / ou pele sejam retiradas para estudo.

Assinatura do participante

Data Hora

Assinatura da testemunha

Data Hora

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

Assinatura do pesquisador

Data Hora