



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE



AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DO
ANTÍGENO RECOMBINANTE rSm29 NA HANSENÍASE

Thaillamar Silva Vieira

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE



AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DO
ANTÍGENO RECOMBINANTE rSm29 NA HANSENÍASE

THAILLAMAR SILVA VIEIRA

Professor Orientador: Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci

Professor Co-orientador: Dra. Luciana Santos Cardoso

Dissertação de mestrado apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, da área de concentração em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2020

Ficha Catalográfica
Bibliotheca Gonçalo Moniz
Sistema Universitário de Bibliotecas
Universidade Federal da Bahia

Vieira, Thailamar Silva.

V658

Avaliação da Capacidade imunomoduladora do antígeno recombinante rSm29 na hanseníase / Thailamar Silva Vieira. - 2023.

90 p. : il.

Inclui anexos.

Orientadora: Profª. Drª. Léa Cristina de Carvalho Castellucci.

Co-Orientadora: Profª. Drª Luciana Santos Cardoso.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2023.

1. Hanseníase. 2. Antígenos. 3. Biomarcadores. I. Castellucci, Léa Cristina de Carvalho. II. Cardoso, Luciana Santos. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. IV. Título.

CDU (2007) - 616-002.73

Elaboração (Resolução CFB nº 184/2017): Solange Mattos

CRB-5/758

BANCA EXAMINADORA:

Membros Titulares:

Profa. Dra. Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo - UFBA (BA)

Profa. Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci – UFBA (BA)

Profa. Dra. Soraya Castro Trindade– UFES (BA)

Membro Suplente:

Profa. Dra. Lucas Carvalho – UFBA (BA)

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor DEUS

Fonte de força, sabedoria e fé inabalável

Ao Dr. Paulo Machado

Pesquisador líder do grupo de hanseníase, Coordenador do SIM, Médico Dermatologista responsável pelo Laboratório de Hanseníase do Complexo HUPES, por todos ensinamentos, apoio e contribuições neste trabalho.

À Dr^a Léa Castellucci

Pesquisadora líder do grupo de genética do hospedeiro humano no Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia. Orientadora, professora pesquisadora e entusiasta da ciência. Agradeço imensamente pela paciência, orientações, ensinamentos e aceitação como sua aluna. Idealizadora desse projeto, sempre disponível às inúmeras discussões e análises. Os sinceros agradecimentos.

À Prof^a Dra Luciana Cardoso

Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia, pesquisadora líder do grupo de Alergia e Helminthíases ao Serviço de da Universidade Federal da

Bahia, co-idealizadora e co-orientadora pelo apoio, viabilização e orientações deste projeto.

Aos colegas do grupo de genética

De maneira especial a Tainã Lago e Nadja Lima pela ajuda técnica e conhecimentos empenhados a essa pesquisa.

Aos amigos e colegas do SIM

De maneira especial a Ana Paula Nunes, Bruno Cova, Lívia Maria e a todo grupo de Alergia e Helminíase pelo companheirismo, suporte e ajuda nesta trajetória

A toda equipe do Ambulatório de Hanseníase do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES-UFBa), em especial Dr. Paulo Machado e os residentes e do **Instituto Couto Maia**, em especial Dra. Rosângela Cunha e a Enfa Clícinia pela colaboração e disponibilidade para que esse trabalho fosse realizado.

Aos colegas, professores e secretaria do PPgCS, meus agradecimentos pela contribuição direta e indireta neste trabalho.

A minha família e amigos

Em especial, a minha mãe Irismar do Rosário pelo amor, confiança e apoio sem medidas. A minha vó por todo entusiasmo e carinho a cada vitória. A minha família por toda ajuda e parceria, e entendimento nas ausências.

Aos pacientes da pesquisa, objetivo principal pelo qual foi realizada, por acreditarem e participarem desse estudo.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram com essa jornada.

FONTES DE FINANCIAMENTO:

- CAPES

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
1.RESUMO	18
2.HIPÓTESE	19
3. 1. OBJETIVO GERAL	19
3. 1. OBJETIVO ESPECÍFICO	19
4. INTRODUÇÃO	20
5. REVISÃO DA LITERATURA	22
5.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HANSENÍASE.....	22
5.1.1. PANORAMA GLOBAL DA HANSENÍASE.....	22
5.1.2. A HANSENÍASE NO BRASIL.....	24
5.1.3. A HANSENÍASE NA BAHIA.....	25
5.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE.....	27
5.3. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE.....	32
5.4. ANTIGENO RECOMBINANTE rSM29.....	38
6. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	41
6.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA...41	
6.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E CULTURA DE CÉLULAS.....	42
6.3. EXTRAÇÃO DE RNA.....	42
6.4. CONVERSÃO PARA cDNA E EXPRESSÃO GÊNICA.....	43
6.5. DOSAGEM DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS.....	44
6.6. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO <i>S. mansoni</i> - rSM29 E DO <i>M. leprae</i>	44
6.7. APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	44
6.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
7. FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DO ESTUDO	46
8. RESULTADOS GERAIS	48
8.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA AVALIADA.....	47
8.2. RESULTADOS DO OBJETIVO 1.....	48
8.3. RESULTADOS DO OBJETIVO 2.....	51
9. DISCUSSÃO	60

10. CONCLUSÃO	65
11. REFERENCIAS	66
12. ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com hanseníase incluídos no estudo.....	47
TABELA 2. Comparação das concentrações dos sobrenadantes estimulados com <i>M. leprae</i> , <i>M. leprae</i> + rSm29 e rSm29 em pg/mL no grupo de indivíduos paucibacilares (n=7) e multibacilares (n=4).....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase no ano de 2018.....	23
Figura 2. Mapa da distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase com grau 2 de incapacidade física no ano de 2018.....	24
Figura 3. Série histórica da taxa de detecção de casos novos de hanseníase nos anos de 2003-2018. Segundo o Ministério da Saúde (MS-BR).....	25
Figura 4. Coeficiente de Detecção Geral de Hanseníase (por 100.000 hab.), Bahia - 2008a 2018.....	26
Figura 5. A classificação de Ridley – Jopling e a relação com a imunidade do hospedeiro..	28
Figura 6 (a-f). Imagens das lesões causadas pela hanseníase e seus respectivos espectros....	31
Figura 7. Sinalização de receptores <i>toll-like</i> e interação com células do sistema imunológico.....	34
Figura 8. Resposta imune nas formas clínicas polares da hanseníase.....	35
Figura 9 . Aspectos imunológicos das reações hansênicas.....	36
Figura10 (A-B). Expressão gênica relativa para TLR2 (A) e TLR4 (B) entre diferentes estímulos em pacientes com hanseníase.....	49
Figura 11 (A-B). Expressão gênica relativa para <i>IL10</i> (A) e <i>TNF</i> (B) entre diferentes estímulos em pacientes com hanseníase.....	50
Figura 12 (A-N). Produção de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de células estimuladas com antígeno M leprae sonicado, M leprae sonicado + rSm29 e rSm29 no grupo paucibacilar e multibacilar.....	54
Figura 13. Análise exploratória das variações intragrupo MB e PB nos marcadores imunológicos entre os antígenos.....	59
Figura 14. Gráfico de visualização t-SNE (Machine Learning).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	<i>Borderline-Borderline</i>
BCG	“Bacillus Calmette-Guérin”
BI	“Bacteriological Index”: Índice Bacilar
BL	<i>Borderline</i> Lepromatosa ou Virchowiana
BT	<i>Borderline</i> Tuberculóide
CP	Coefficiente de Prevalência
dH₂O	Água destilada
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	“deoxyribonucleic acid”: ácido desoxirribonucleico
EDTA	“Ethylenediamine tetraacetic acid”: ácido etilenodiamino tetra-acético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ENH	Eritema nodoso hansênico
G2D	Deficiência de grau 2
GWAS	“Genome-wide association study”: Estudos de Associação Ampla do Genoma
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos

G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocitárias
HBV	“Hepatitis B Virus”: vírus da hepatite B
HCV	“Hepatitis C Virus ”: vírus da hepatite C
HIV	“Human Immunodeficiency Virus”: Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	“Human leukocyte antigen”: antígeno leucocitário humano
HTLV	“Human T-Lymphotropic Virus”: Vírus linfotrópico T humano
I	Indeterminada
IC	Intervalo de confiança
IFN-γ	Interferon gamma
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IMC	Imunidade Mediada por Células
LL	Lepromatosa ou Virchowiana
<i>M.leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	Multibacilar
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito 1
MIP-1β	Proteína inflamatória de macrófago 1 beta

NF-κB	“Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”: fator nuclear kappa B
NOD	“Nucleotide-binding oligomerization domain”: Proteína de Domínio de Oligomerização Nucleotídica 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OR	“Odds ratio”: razão de chances
PB	Paucibacilar
PCR	“Polimerase Chain Reaction”: Reação em Cadeia da Polimerase
PQT	Poliqimioterapia
RNA	“ribonucleic acid”: ácido ribonucleico
RR	Reação reversa
rSm29	Antígeno recombinante do <i>Schistosoma mansoni</i>
RT-PCR	PCR em tempo real
TCD4	Linfócito T CD4
TCD8	Linfócito T CD8
TGF-β1	“Transforming growth factor beta 1”: Fator de Crescimento e transformação beta 1

Th1	Linfócitos T “helper” 1
Th2	Linfócitos T “helper” 2
TLR	“Toll like receptors”: receptores do tipo Toll
TNF	“Tumor necrosis factor”: Fator de necrose tumoral
Treg	Células T regulatórias
TT	Tuberculóide

4. RESUMO

A Hanseníase é uma doença infecciosa crônica, insidiosa e de difícil tratamento, especialmente nas suas formas reacionais, o que tem instigado o desenvolvimento de novos fármacos, especialmente imunobiológicos no seu tratamento. O antígeno recombinante do *Schistosoma mansoni* (rSm29) tem apresentado função imunorreguladora, pela indução de IL-10 e capaz de modular respostas inflamatórias com perfil Th1 e Th2, demonstradas em doenças como asma, leishmaniose e HTLV-1. Com o objetivo de entender como este antígeno se comportaria na Hanseníase, este estudo buscou avaliar o papel modulador do rSm29 na doença. Foi realizado um estudo piloto, modelo transversal com casuística de 17 pacientes com hanseníase. Após coleta de sangue, ocorreu a separação das CMSPs e incubação por 72 horas em quatro grupos categorizados de acordo com diferentes estímulos: Sem estímulo, *M. leprae*, *M. leprae*+rSm29 e rSm29. Posteriormente, realizamos a extração de RNA com TRIzol, a conversão para cDna e PCR em tempo real (qRT-PCR) utilizando o método Taqman® para os genes alvos (*TLR2*, *TLR4*, *IL-10* e *TNF*) e imunoensaio Bioplex® para dosar importantes marcadores imunológicos da doença. A expressão gênica do gene *TLR2* foi maior no grupo co-estimulado com *M. leprae* + rSm29 em relação ao *M. leprae* e significativo quando comparado ao grupo não estimulado (meio) ($p = 0,0317$). Por outro lado, a expressão de *TLR4* foi maior em culturas na presença do antígeno *M. leprae* em comparação com culturas não estimuladas ($p = 0,0159$) e co-estimuladas ($p = 0,0317$). Observamos também que a expressão do gene de *IL10* foi maior nas culturas na presença dos antígenos e significativo quando comparado o *M. leprae* + rSm29 com culturas sem estímulo ($p = 0,0159$). Em relação à expressão do *TNF*, não houve variação significativa entre os grupos. Os resultados mostram diferenças significativas nas concentrações dos marcadores nos sobrenadantes co-estimulados com os dois antígenos em comparação ao *M. leprae* sonificado no grupo PB observadas em G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α . Além das diferenças significativas observadas nos mediadores da resposta imune anteriores, as citocinas e quimiocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, foram observados também diferença significativa na estimulação apenas com o antígeno recombinante versus a condição *M. leprae* + rSm29 no grupo PB. Em conclusão principal, a adição do antígeno rSm29 ao *M. leprae* em cultura de pacientes com hanseníase colaborou ao desenvolvimento de uma resposta celular do tipo Th1. Essa resposta poderia ajudar pacientes com hanseníase a fazer um melhor controle da infecção micobacteriana, assim favorecendo a forma mais branda da doença.

Palavras chaves: Hanseníase, rSm29, resposta imune, TLR2, TLR4

5. HIPÓTESE

O antígeno recombinante do *Schistosoma mansoni*, rSm29 é capaz de modificar a produção de citocinas inflamatórias em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com hanseníase na presença ou não do antígeno sonicado do *M. leprae*

6. 1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade moduladora do antígeno rSm29 em células de pacientes com hanseníase.

3. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o perfil de expressão gênica dos receptores do tipo Toll 2 e 4 (*TLR2* e *TLR4*) e das citocinas *IL10* E *TNF* em células estimuladas com os antígenos de *M. leprae* e rSm29 e co-estimuladas com os dois antígenos em CMSPs de pacientes com hanseníase

Avaliar um painel de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nos sobrenadantes das culturas de CMSP estimuladas com os antígenos de *M. leprae* e co-estimuladas com os dois antígenos utilizando o imunoenensaio multiplex (Bioplex®).

4. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa, crônica e de evolução insidiosa (De Souza, 2017). O bacilo *Mycobacterium leprae*, agente causador da doença tem tropismo tecidual gerando danos a pele, mucosa e nervos periféricos, que, conseqüentemente , causa comprometimento sensorial e lesões cutâneas (GELUK, 2018) Todos os anos, mais de 200.000 novos casos de hanseníase são relatados em todo o mundo, sendo esse número constante nas principais áreas de transmissão durante os últimos 8 anos (NAAZ et al, 2017;WHO, 2016).

Clinicamente, a hanseníase apresenta-se de maneira espectral, polarizada, de acordo com a resposta imunológica montada pelo hospedeiro frente ao desafio do bacilo. A classificação estabelecida por Ridley-Jopling (1966), associa características clínicas e histopatológicas ao índice bacteriológico. Dessa forma, no polo tuberculóide (TT), predomina uma resposta imune celular do tipo Th1 com baciloscopia negativa, enquanto no polo lepromatoso (LL), ocorre uma resposta do tipo Th2, com característica humoral e baciloscopia positiva. As formas intermediárias ou “borderline”- *borderline* tuberculóide (BT) ;*borderline borderline* (BB); e *borderline* lepromatoso (BL) possuem resposta clínica e imunológica instavel flutuante entre os polos.

Há ainda, as reações hansênicas, que são episódios inflamatórios agudos que ocorrem em cerca de 30-40% dos pacientes, podendo ocorrer antes, concomitantemente ou após o tratamento da hanseníase (SCOLLARD et al., 1994; RANQUE et al., 2007). Estas reações podem ser de dois tipos: Reação tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH). (KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008; RIDLEY; JOPLING, 1966). O diagnóstico precoce da doença e episódios é muito importante. Um manejo efetivo e correto do tratamento impede ou minimiza sequelas e deformidades físicas,

o que têm um impacto social e profissional importante nos indivíduos acometidos, atenuando o estigma e preconceito em relação à doença (LASTÓRIA; ABREU, 2014)

A proteína Sm29 tem se mostrado uma molécula com capacidade moduladora em doenças inflamatórias infecciosas como a Mielopatia associada ao HTLV-1 e a leishmaniose cutânea causada pela *Leishmania braziliensis*, identificando dessa forma o potencial imunomodulador do antígeno recombinante rSm29 na regulação de uma resposta imune do tipo Th1 (BAFICA, et al 2012; BAFICA, et al. 2011; LIMA, et al. 2013). Em adição, evidências vêm sendo acumuladas demonstrando que a infecção crônica por helmintos, particularmente pelo *Schistosoma sp* ou produtos do parasita, são capazes de modular a resposta inflamatória do tipo Th2 das doenças de base alérgica, a exemplo da asma (ARAUJO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012). Estudos realizados pelo Serviço de Imunologia têm demonstrado que asmáticos infectados pelo *S. mansoni* residentes em áreas endêmicas em esquistossomose não respondem aos testes cutâneos de alergia (LIMA et al., 2013; ARAUJO et al., 2000), possuem uma forma branda da doença (MEDEIROS et al., 2003) e que células desses pacientes produzem concentrações mais baixas de citocinas do perfil Th2 e mais elevadas da citocina regulatória IL-10 em resposta a alérgenos, quando comparado com asmáticos não infectados (ARAUJO et al., 1994; ARAUJO et al., 2004). Considerando o desconhecimento sobre qualquer efeito desse antígeno na hanseníase e a importância da descoberta de novas moléculas que possam auxiliar no manejo clínico da hanseníase e episódios reacionais, avaliamos se este antígeno seria um promissor candidato à modulação do intenso processo inflamatório da doença.

5. REVISÃO DA LITERATURA

5.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HANSENÍASE

5.1.1. PANORAMA GLOBAL DA HANSENÍASE

A hanseníase afeta predominantemente a pele e os nervos periféricos, podendo levar a deformidades e deficiências. Apesar de no ano 2000, a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública ser alcançada ao atingir uma prevalência pontual abaixo de 1 caso por 10.000 habitantes, ela ainda permanece endêmica em países tropicais e, principalmente, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (WHO, 2018; WHO, 2016).

Em 2018, foram registrados casos em 159 países e territórios. São eles :41 na região africana, 34 na região das Américas, 33 na região do Pacífico Ocidental, 23 na União Europeia, 17 na região leste da região do Mediterrâneo e 11 na região do Sudeste Asiático, conforme Figura 1. Foram mundialmente registrados 184 212 indivíduos com hanseníase sendo alocados como “em tratamento” e 208 619 novos casos de hanseníase, correspondendo, respectivamente, a uma taxa mundial de prevalência de 0,24 por 10.000 habitantes e a uma taxa de detecção de casos novos de 2,74 por 100 000 habitantes, respectivamente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), isso mostra uma diminuição de 8501 casos em relação a 2017 (WHO, 2019)

Os dados dos programas nacionais de hanseníase definiram 23 países prioritários, que são Angola, Bangladesh, Brasil, Comores, Costa do Marfim, República Democrática do Congo, Egito, Etiópia, Estados Federados da Micronésia, Índia, Indonésia, Kiribati, Madagascar, Moçambique, Myanmar, Nepal, Nigéria, Filipinas, Sudão do Sul, Siri Lanka, Somália, Sudão, República Unida da Tanzânia. Estes somaram 199.400 novos casos, representando 96% do total de casos em todo o mundo (WHO, 2016).

A região das Américas ocupa o segundo lugar em número registrado de casos (34.358 que corresponde a 18,65% do total de casos) e também em casos novos (30.957, cerca

de 14,83% do montante global). O Brasil registrou 28.660 casos detectados em 2018 contribuindo com 93% dos novos casos de hanseníase na região das Américas, e juntamente com Índia e Indonésia, representaram 79% da incidência global da hanseníase. (WHO, 2018)

Em 2018, 11 323 novos casos de hanseníase apresentaram grau 2 de incapacidade física (GIF 2), o que representa aqueles indivíduos com deformidades visíveis ao diagnóstico da doença. Destes, o Brasil reportou 2109, Índia 3666 e Indonésia 1118 casos . Sendo classificados GIF2 em 141 países e registrado em 78 países, conforme Figura 2 (WHO, 2019).

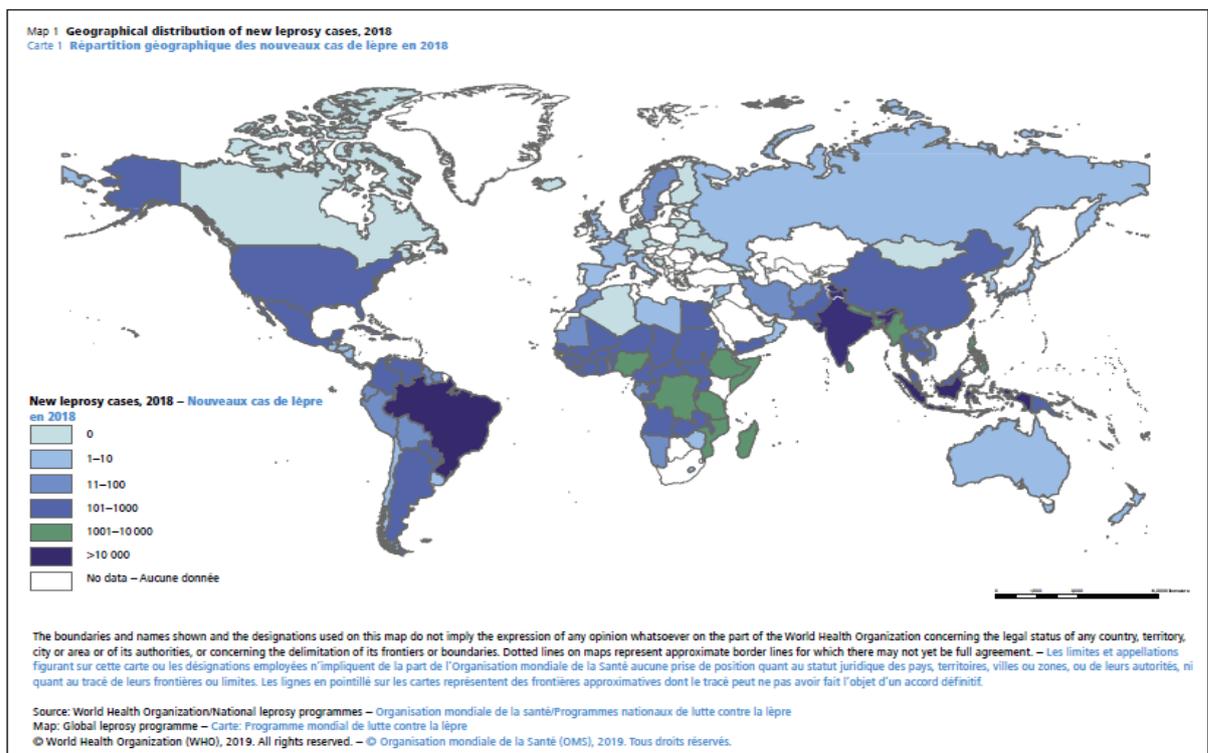


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase no ano de 2018. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)

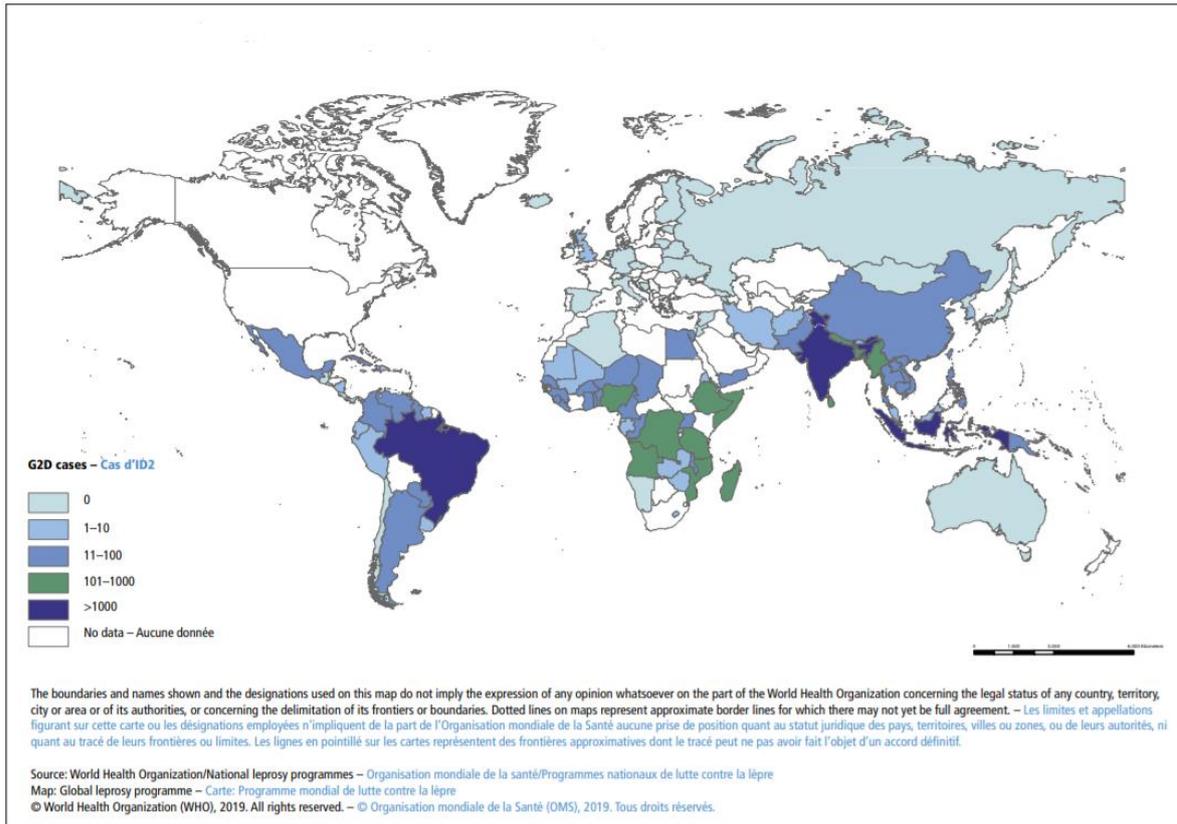


Figura 2. Mapa da distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase com grau 2 de incapacidade física no ano de 2018. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)

5.1.2. A HANSENÍASE NO BRASIL

Analisando a cronologia da taxa de detecção e número de casos novos de hanseníase no Brasil de 2003-2018, o seu maior pico ocorreu em 2003, atingindo 29,37 por 100 mil habitantes. Durante todo este período, foram registrados um total de 586.112 casos novos sendo destes 43.479 casos novos em menores de 15 anos e 37.790 casos novos com grau 2 de incapacidade física (GIF 2) no diagnóstico. A partir de 2009, observa-se uma alteração do indicador de endemicidade de “muito alto” para “alto”, com 19,64 casos novos por 100 mil habitantes. O ano mais promissor foi observado em 2016, com 12,23 casos novos por 100 mil habitantes. Porém, nos anos seguintes 2017 e 2018, as taxas elevaram ligeiramente para 12,94 e 13,74 casos novos por 100 mil habitantes, respectivamente, mostrado na Figura 3 (Ministério Da Saúde, 2019; DATASUS/Tabnet, 2019)

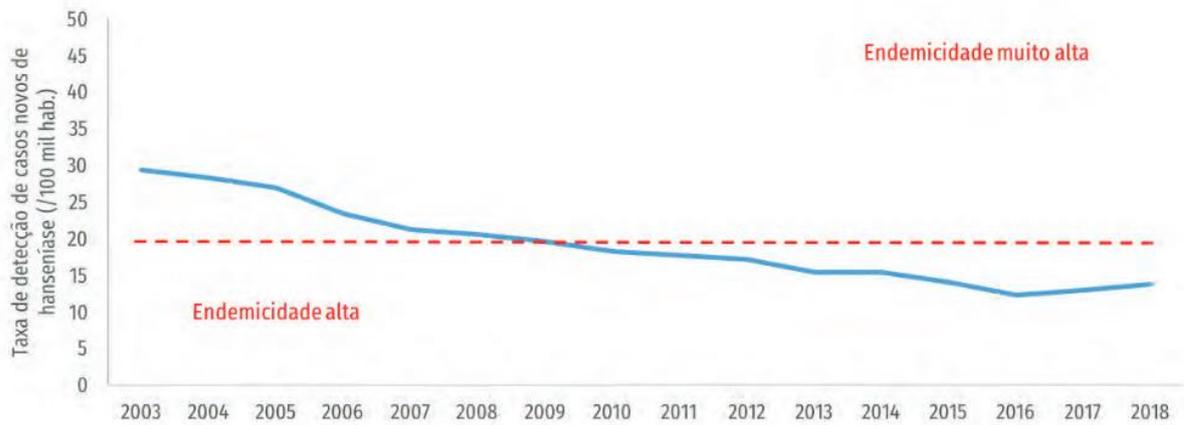


Figura 3. Série histórica da taxa de detecção de casos novos de hanseníase nos anos de 2003-2018. Segundo o Ministério da Saúde (MS-BR)

5.1.3. A HANSENÍASE NA BAHIA

No estado da Bahia em 2018, foram notificados 2.119 casos novos de hanseníase, atingindo um coeficiente de detecção anual de 14,31/100.000 hab. Entre os menores de 15 anos, o estado notificou 126 casos novos, representando um coeficiente de detecção de 4,0 por 100.000 hab. Ambos considerados de “alta” e “média” endemicidade segundo parâmetros nacionais. (Sesab Ba, 2019). Dos 417 municípios baianos, em 2017, 60 (14,4%) diagnosticaram casos de hanseníase em menores de 15 anos e destes, 35 são considerados hiperendêmicos, ou seja, possuem coeficiente de detecção $\geq 10/100.000\text{hab.}$ (Boletim Epidemiológico de Hanseníase em menores de 15 anos/2018 Diretoria de Vigilância Epidemiológica Divep N° 02, Ano 2018). Ao analisar o número de casos na série histórica apresentada para a população geral nota-se uma diminuição, apesar de em 2017 ter havido um pequeno aumento do número de casos independente da faixa etária (Sesab Ba, 2018), conforme **Figura 4**

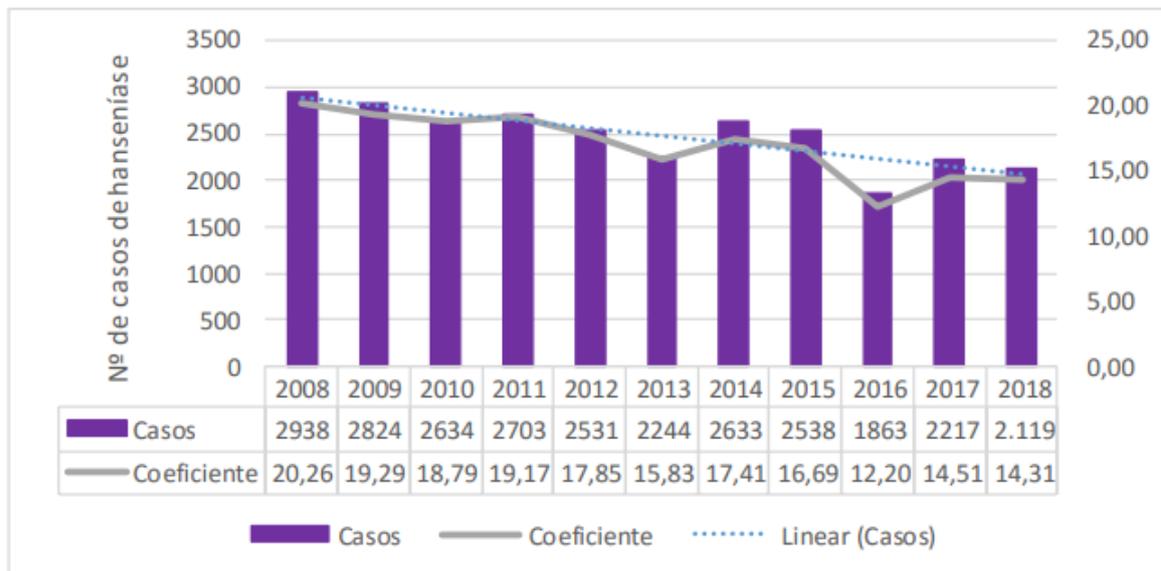


Figura 4. Coeficiente de Detecção Geral de Hanseníase (por 100.000 hab.), Bahia - 2008a 2018. A figura retrata uma série histórica do coeficiente na linha azul acima das barras e número de casos novos de hanseníase em barras laranja nos anos de 2006-2017 na Bahia. Segundo Sinanet DIVEP/SESAB. Banco de Dados 04/12/2019

A taxa de detecção de casos novos, taxa de detecção de casos novos em menores de 15 anos e taxa de casos novos com GIF 2 no diagnóstico são os principais dados que expressam a magnitude da endemia e apontam a real situação do agravo. A taxa de detecção geral mede a força da morbidade da doença (Brasil, 2016; Brasil, 2019). Quando essas taxas apresentam-se elevadas evidenciam a persistência na transmissão do bacilo, as fragilidades dos programas governamentais para o controle, evidenciando a necessidade de uma intervenção de vigilância mais efetiva. Esses também são indicadores indiretos dos níveis de conscientização sobre os sinais iniciais, do acesso a serviços de saúde e das habilidades da equipe de atenção à saúde no diagnóstico da hanseníase (DIVEP, 2018; WHO, 2016)

5.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença crônica, infecto-contagiosa, de lenta progressão com longo período de incubação causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório sendo encontrado, preferencialmente, em macrófagos e células de Schwann (LASTÓRIA; ABREU, 2014). A doença ocupa o segundo lugar em severidade entre as doenças humanas causadas por micobacterias, perdendo apenas para a tuberculose (GELUK, 2018). Os principais locais atingidos pelo bacilo são: A pele, nervos periféricos, trato respiratório, olhos e outros órgãos vitais, progredindo por granulomas nos nervos periféricos (WHO, 2012; MUHAMMAD et al, 2018). Sabe-se que a grande maioria dos indivíduos, cerca de 90%, expostos ao *M. leprae* são assintomáticos e não irão desenvolver a hanseníase (ALTER et al., 2008), sendo diversas condições de risco como fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro além de fatores ambientais importantes no desfecho patológico. (MAZINI et al 2016) A transmissão da hanseníase dá-se pelo contato próximo e prolongado do indivíduo infectado pelo bacilo, expelindo a bactéria pelas vias aéreas superiores através de secreções e gotículas as quais são inaladas pela mesma via pelo próximo hospedeiro (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

A resposta imunológica montada por um indivíduo infectado está diretamente relacionada a qual forma clínica o mesmo desenvolverá (WALKER; LOCKWOOD , 2006; MODLIN, 1994). Dois tipos de classificação clínica são mais utilizadas no Brasil, são elas: Escala de Madri (1953) e Ridley & Jopling, proposta em 1966 .A classificação de Madri divide as formas clínicas da doença em indeterminada, tuberculóide, virchowiana e dimorfa. A classificação de Ridley e Jopling correlaciona as formas clínicas com diversos aspectos apresentados pelo doente, são eles: características histopatológicas, índice bacteriológico (IB), e o tipo de resposta imune do hospedeiro, conforme **Figura 5**. Assim utilizaram as designações para grupos polares: tuberculóide (TT) e lepromatoso (LL), e para os grupos

intermediários: *boderline-tuberculóide* (BT), *boderline-boderline* (BB) e *boderline lepromatoso* (BL), além da forma indeterminada. (RIDLEY; JOPLING ,1966; WALKER; LOCKWOOD, 2006)

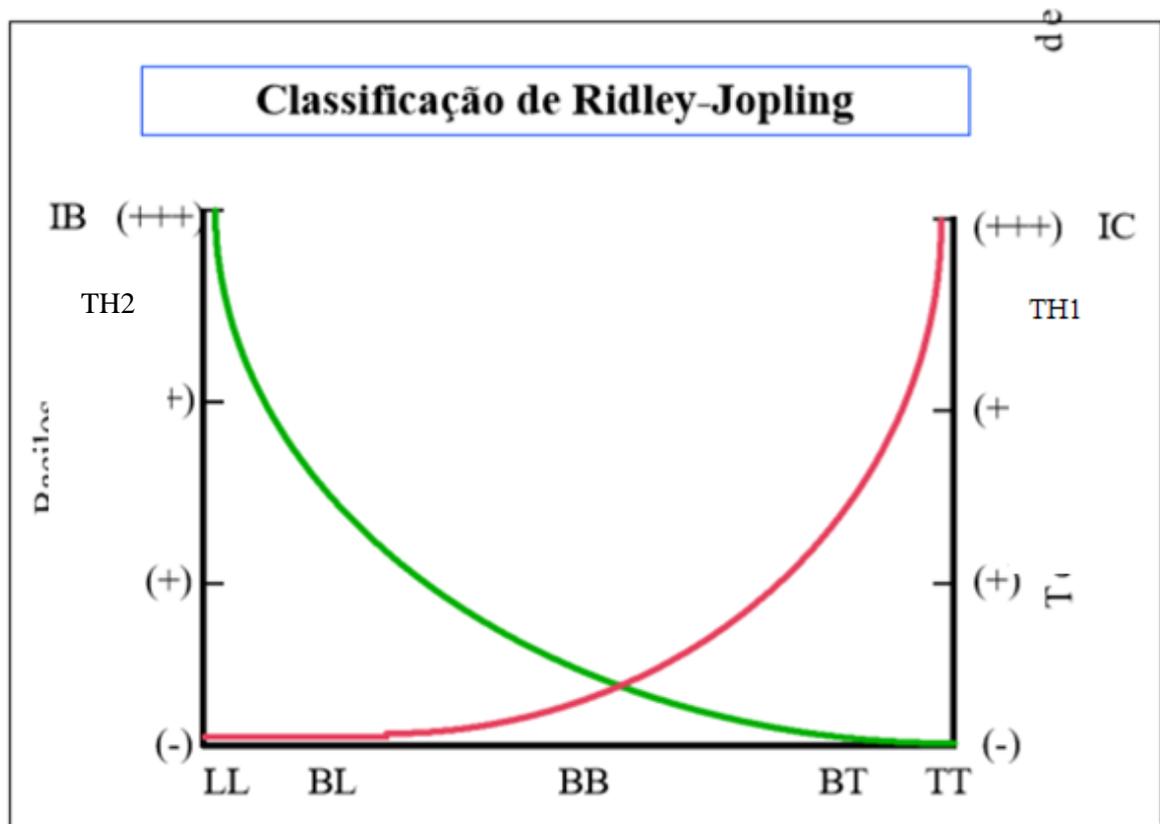


Figura 5. A classificação de Ridley – Jopling e a relação com a imunidade do hospedeiro. A imunidade celular é inversamente proporcional à carga bacilar medida pelo índice baciloscópico. TT- forma polar Tuberculóide (estável); LL- forma polar Virchowiana ou Lepromatosa (estável); BT, BB e BL – Grupo Borderline (Instável). Fonte: GOULART, 2002 (adaptado)

Em um lado do espectro clínico, temos o polo TT caracterizado pela presença de uma resposta celular efetiva, com a presença de células Th1, bem como células Th17, levando ao controle do bacilo, e a uma forma mais branda da doença. No outro polo do espectro, temos a forma LL, onde o sistema imune do hospedeiro não monta uma resposta efetiva para conter a infecção, favorecendo a multiplicação e disseminação do bacilo pela falta de uma resposta de células T efetoras e altos títulos de anticorpos específicos para *M. leprae* sendo caracterizada por baixa imunidade celular e uma resposta Th2 humoral pronunciada (SAINI; RAMESH; NATH, 2013; BARNES et al , 1993;WALKER;

LOCKWOOD, 2006). Entre as formas polares, são descritos espectros limítrofes ou borderlines (BT, BB e BL) que apresentam resposta imune instável, oscilando entre os pólos, representando a forma clínica da maioria dos pacientes acometidos e podendo ser agravadas pelos episódios reacionais. A forma indeterminada aparece no início e pode evoluir para uma cura espontânea ou para o desenvolvimento de uma das formas clínicas (SCOLLARD,2004 ;MAZINI et al 2016)

A classificação do espectro clínico dos pacientes é importante para determinar o tratamento a ser administrado, permitindo também, que a equipe multiprofissional possa prever aqueles em risco de complicações e fornecer um prognóstico mais preciso (WALKER; LOCKWOOD, 2006). Para a classificação operacional de tratamento, a OMS estratificou o tipo de tratamento de acordo com as lesões e o índice baciloscópico (IB). No regime paucibacilar (PB) enquadram-se pacientes com uma a cinco lesões hipopigmentadas ou eritematosas, com distribuição assimétrica, perda de sensibilidade e comprometimento apenas um tronco nervoso, e IB negativo. Em contrapartida, no regime multibacilar (MB), os indivíduos apresentam IB positivo, mais de 5 lesões com distribuição assimétrica, perda de sensibilidade e pode haver comprometimento de vários troncos nervosos . (GONCALVES et al, 2014; BRASIL, 2008; WHO, 1994)

A OMS preconizou o uso da multidrogaterapia (MDT) ou poliquiomioterapia (PQT) na década de 1970, e o tratamento em regime ambulatorial começou no início dos anos 1980. Entretanto a PQT foi utilizada oficialmente e extensivamente efetivamente no Brasil a partir de 1993(WHO, 1982; CAVALIERE; COSTA, 2011). A adesão a PQT é crucial para assegurar tratamento correto e possível eliminação da hanseníase (NAAZ et al, 2017). Regimes padrão de PQT para paucibacilar (PB) são – rifampicina e dapsona- incluindo 1 dose de rifampicina 600 mg/mês e dapsona 100 mg/dia e, multibacilar (MB)- onde além das medicações do esquema PB, inclui-se 1 dose de 300 mg/mês e 50 mg/dia, com uma duração

de tratamento de 6 meses para PB e 12 meses para MB (BRASIL, 2009). No caso de efeito adverso e contraindicação a alguma droga, utiliza-se o esquema alternativo com ofloxacina e/ou minociclina (LASTÓRIA; ABREU, 2012; BRASIL, 2010)

Além do aspecto crônico e de todas as repercussões da doença, seu impacto clínico é agravado por episódios inflamatórios agudos, conhecidos como reações: reação reversa (RR) ou reação hansênica tipo 1 e eritema nodoso hansênico (ENH) ou reação hansênica tipo 2 (KAHAWITA, et al 2008; LOCKWOOD et al. 2008). Essas complicações imunológicas são caracterizadas por quadro inflamatório exacerbado, representando a principal causa de danos nervosos e deformidades anatômicas irreversíveis, podendo surgir espontaneamente antes, durante e até anos após o tratamento com a poliquimioterapia (PQT) (SEHGAL; SHARMA, 1988). Por serem mais instáveis do ponto de vista imunológico, as formas do espectro *boderline* da doença são mais susceptíveis à ocorrência de reações hansênicas (GELUK, 2017). A reação reversa (RR), ou de tipo 1, representa reações de hipersensibilidade tardia local que ocorrem nos pólos instáveis (BT/BB/BL), e, em menor número em pacientes LL (NERY et al, 2013). São caracterizadas por infiltrações de células T CD4+ de lesões cutâneas e nervosas, levando à inflamação granulomatosa que destrói os nervos (KAHAWITA et al, 2008). Os sintomas neurológicos sensoriais mais frequentes variam de hiperestesia cutânea difusa, parestesia e alodinia, a comprometimento do nervo motor associado ou não à sensibilidade e aumento neurais, que são os aspectos clínicos clássicos da neurite relacionados a RR. Outros sintomas podem ser edema, eritema acentuado, ulceração ou lesões de pele (TURNER; MCGUINNESS; LEDER, 2015; ANDRADE et al, 2015). O eritema nodoso hansênico (ENH), conhecido como reação hansênica tipo 2, está associado imunidade humoral a antígenos bacilares com a circulação e deposição tecidual de complexos imunes semelhante à reação tipo III de Coombs e Gell, processo inflamatório sistêmico com manifestações clínicas inflamatórias agudas e com infiltrações neutrofílicas intralesionais .

Ocorrem em pacientes com resposta imune do tipo Th2 (BL-LL) (GELUK, 2018; SOUZA, 1997; LASTÓRIA; ABREU, 2012). Suas manifestações clínicas incluem vários nódulos dolorosos de pele vermelha, neurite, sintomas sistêmicos de febre e letargia, irite, linfadenite, artrite, orquite e / ou proteinúria. (SUZUKI et al, 2012). Vários fatores de riscos estão associados ao desenvolvimento dos episódios reacionais, são eles: gravidez, estresse, PQT, sinusopatia, coinfeções, como: infecções orais, infecções de vias urinárias , HIV, hepatite B e C (MOTTA et al.,2012;BRITTON, 1998; LIENHARDT ; FINE , 1994)

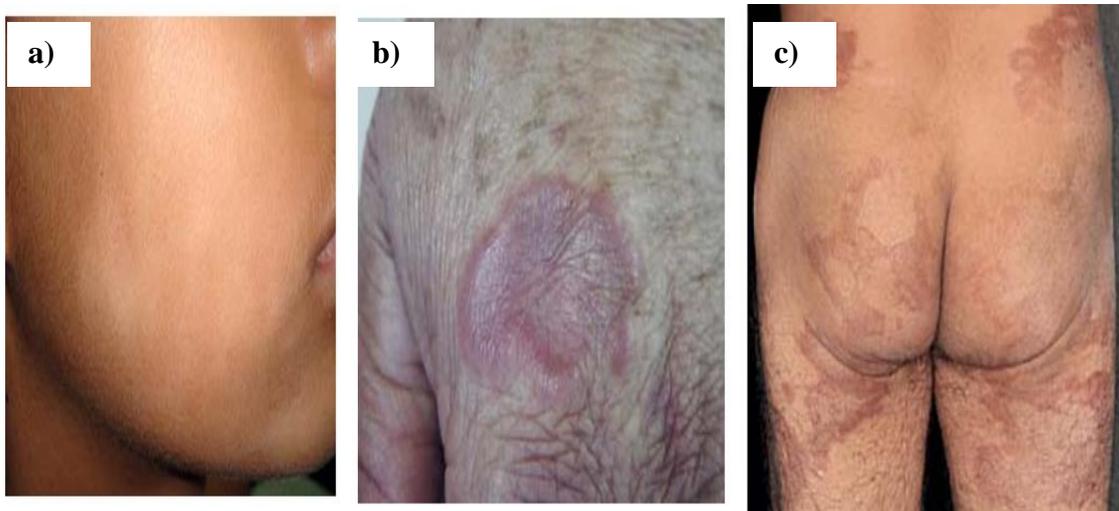


Figura 6 (a-f). Imagens das lesões causadas pela hanseníase e seus respectivos espectros a) Lesão da forma indeterminada; b) Lesão da forma tuberculóide; c) Lesão da forma *boderline*. Fonte: LASTÓRIA; ABREU, 2014.



d) Infiltração da face e madarose da forma lepromatosa; e) Lesões de pele causadas pelo ENH; f) Lesão de pele causadas pelo RR. Fonte: KAHAWITA; LOCKWOOD, 2008; LASTÓRIA e ABREU, 2014.

Finalmente, o dano tecidual associado a lesão nervosa é a consequência clínica mais preocupante da hanseníase podendo levar a sequelas irreversíveis (FACER, et al 2000) A presença de bacilos nas terminações nervosas e células de Schwann leva a uma resposta mediada por macrófagos e outras células que podem levar o aparecimento de lesões imunomediadas (AARÃO et al 2018). Nos troncos nervosos ficam acomodados milhões de bacilos que estão espalhados ao redor de cada compartimento e camada do nervo inicialmente sem qualquer aparente reação tecidual do nervo. Há geralmente algum edema. Porém, a manutenção contínua da proliferação de fibroblastos gera cicatrização difusa no nervo, e consequentemente, fibrose tecidual e perda da função nervosa (DUERKSEN, 2004).

5.3. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença cujo complexo mecanismo de resposta imune do hospedeiro influencia de forma determinante a apresentação clínica da doença (DE SOUSA et al 2017; MODLIN, 1994) Assim, a polarização da resposta imune específica ao *M. leprae* entre o espectro Th1 / Th2 é um elemento importante na patogênese da hanseníase. A resposta Th1 está relacionada ao perfil TT da doença, enquanto a resposta Th2 ao espectro clínico LL. Ambos os perfis desempenham papel fundamental na resposta imune, uma vez que participam de mecanismos que levam à uma de resposta celular ou humoral contra a doença (DE SOUSA; SOTTO; SIMÕES QUARESMA, 2017)

A primeira linha da interação entre o *M. leprae* e o hospedeiro é mediada pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), sendo expressos em células fagocíticas, principalmente por macrófagos e células dendríticas (POLYCARPOU et al. 2013; MODLIN, 2010). Os PRRs

não apenas atuam como sensores inatos, mas também moldam as respostas imune inata e adaptativa (MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU, 2016). Outro papel desempenhado pelo *M. leprae* é a ativação da expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (CPH), moléculas co-estimulatórias e mediadores inflamatórios na forma de citocinas e quimiocinas por células como macrófagos, células dendríticas (DCs), neutrófilos e outras células imunes não profissionais (PANDEY; KAWAI; AKIRA, 2014; JIMÉNEZ-DALMARONI; GERSWHIN; ADAMOPOULOS, 2016).

Entre os PRRs, estão os receptores tipo *Toll-like* (TLRs), que são uma classe de proteínas de transmembrana tipo 1 com um domínio extracelular consistindo em um domínio repetido rico em leucina (LRR), que participam do reconhecimento de PAMPs (KAWAI; AKIRA, 2010; AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001). Os receptores Toll-like altamente conservados (TLRs) na superfície dos monócitos e macrófagos reconhecem lipoproteínas micobacterianas (WALKER; LOCKWOOD, 2006)

Ao interagir com o bacilo, os heterodímeros TLR1/2 levam à diferenciação de monócitos em macrófagos e DCs (KRUTZIK et al., 2003). As DCs apresenta antígenos e promove a ativação de células T naïve pela produção de IL-12. Os linfócitos Th1 expressam o receptor para IL-12, deslocando preferencialmente a resposta imune em direção a uma resposta Th1 (WALKER; LOCKWOOD, 2006). A sinalização de TLR1/2 também é responsável pelo reconhecimento das lipoproteínas micobacterianas, ativando uma resposta pró-inflamatória e liberando peptídeos antimicrobianos dependentes da vitamina D (LIU et al. 2012)

Os TLR2 e TLR4 tem grande relevância devido ao seu potencial de identificar padrões moleculares distintos de patógenos invasores, e também patógenos intracelulares capturados em endossomos ou lisossomas. Entre os receptores expressos pelas células fagocíticas, TLR2 e TLR4 estão os dois principais receptores envolvidos no desenvolvimento

da resposta imune pelo reconhecimento dos PAMPs de *M. leprae* (MODLIN, 2010; POLYCARPOU; WALKER; LOCKWOOD, 2013). Além disso, eles também desempenham um papel fundamental na regulação do equilíbrio entre o perfil Th1 e Th2 na resposta imune do hospedeiro frente ao agente infeccioso. Estudos relatam o papel destes TLRs envolvidos em várias doenças (MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU, 2016), conforme **Figura 7**

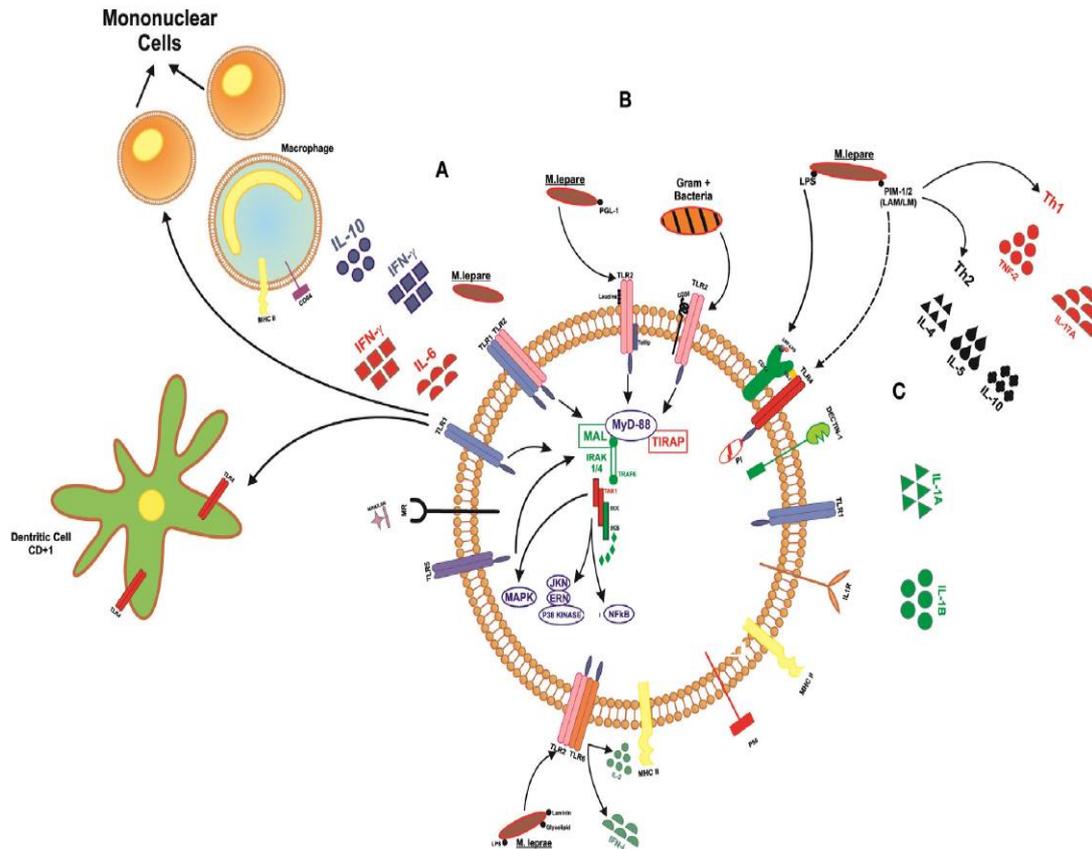


Figura 7. Sinalização de receptores toll-like e interação com células do sistema imunológico. (a) Atuação do TLR1 na diferenciação celular - células mononucleares para macrófagos, liberando citocinas como IFN- γ e IL-6, e quando ativados, liberam IFN- γ e IL-12. Este receptor também auxilia na maturação de células dendríticas; (b) O TLR2, assim como outros receptores são capazes de identificar padrões na superfície de bactérias Gram+ e Gram - (c) Em resposta ao LPS, o TLR4 forma um complexo com MD2 auxiliando no início da cascata de sinalização intracelular. Fonte: Mazini et al, 2016

A resposta imune em indivíduos que desenvolveram o polo tuberculóide (TT) é caracterizada por uma resposta de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-15 e TNF), respostas vigorosas das células T aos antígenos do *M. leprae* e contenção dos bacilos em granulomas bem formados. Nas lesões TT, os macrófagos são ativados para se parecerem com células epiteliais e as células T CD4 + são o tipo de célula predominante. (SALGAME et al 1992; LASTORIA et al 2014).

Em contraste, a resposta imune dos pacientes com LL é caracterizada por um perfil imune Th2 com produção de IL-4 e IL-5, além de IL-10 e ativação de células reguladoras T (Treg), com produção importante embora não protetora de anticorpos, incluindo a formação de complexos imunes, e falha em conter a multiplicação de *M. leprae*. Comparadas ao TT, as lesões de pacientes com LL são relativamente deficientes em células T CD4+, mas possuem numerosas células T CD8+ e macrófagos fortemente infectados com bacilos que desenvolvem uma aparência espumosa característica (YAMAMURA, 1991; YAMAMURA et al 1992; PALERMO et al 2012), conforme Figura 8. As formas clínicas ‘borderline do espectro da hanseníase são imunologicamente dinâmicas, oscilando entre as duas formas polares (TT-LL) (MENDONCA, et al. 2008).

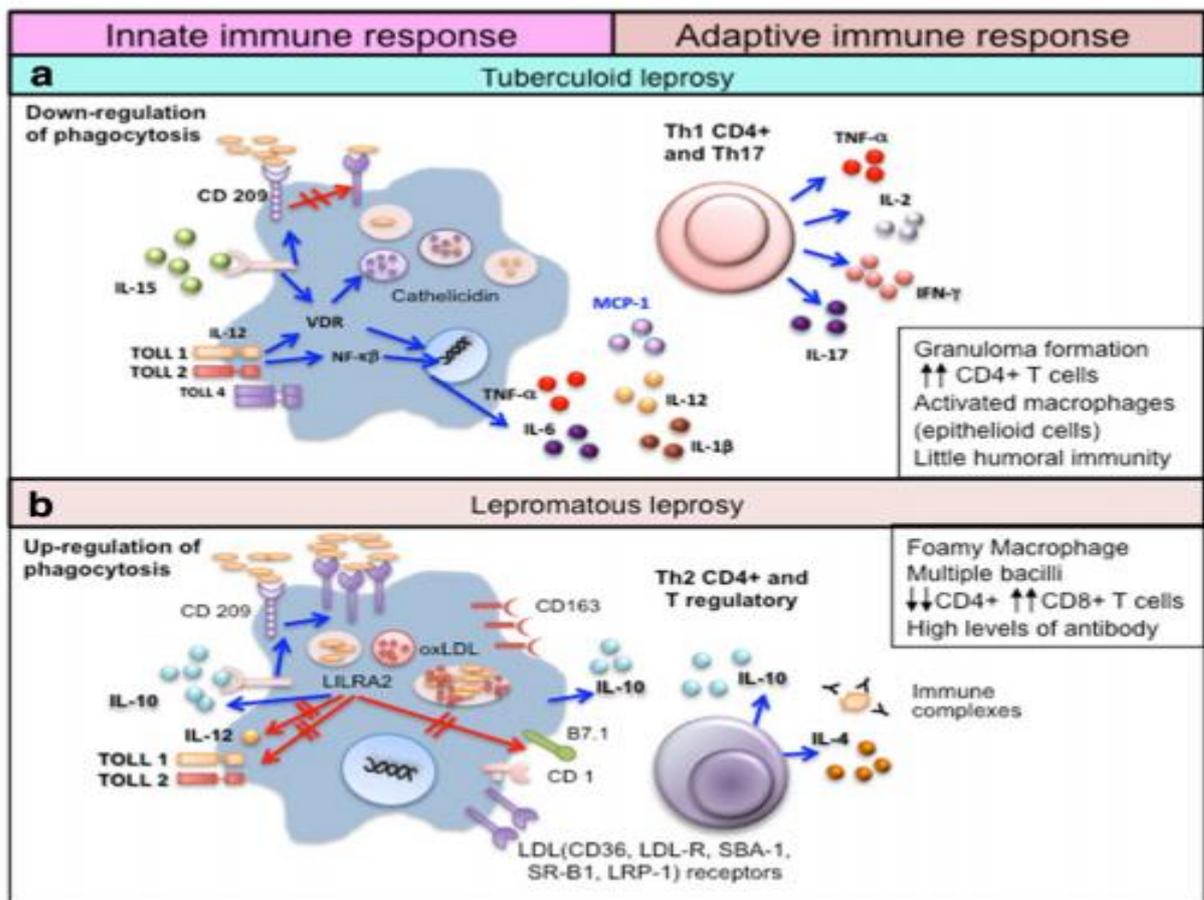


Figura 8. Resposta imune nas formas clínicas polares da hanseníase. a) Resposta imune inata e adaptativa em pacientes com hanseníase tuberculóide (TT). **b)** Resposta imune inata e adaptativa em pacientes com hanseníase lepromatosa (LL) (Fonseca et al, 2017)

Outro importante alvo da infecção por *M. leprae* são as células de Schwann (SCs), essa interação se dá pela ligação bacteriana direta ao receptor de neuregulina, ErbB2 e ativação do Erk1/2 e subsequente sinalização e proliferação de MAP-quinase podendo levar a perda de conduta axonal, desmielinização, lesão do nervo e, conseqüente, incapacidade (TAPINOS et al, 2006). Os macrófagos são uma das células hospedeiras em maior número em contato com micobactérias. A fagocitose do bacilo, realizado por macrófagos derivados de monócitos pode ser mediada pelos receptores de complemento CR1 (CD35), CR3 (CD11b / CD18), e CR4 (CD11c / CD18) e é regulado pela proteína quinase K. (PRABHAKARAN et al, 2000)

A reação do tipo 1 ou RR ocorre em 30% dos pacientes e está associada a uma reação de hipersensibilidade tipo IV. Trata-se de uma súbita ativação da resposta inflamatória aos antígenos de *M. leprae* (RANQUE et al 2007; FONSECA et al. 2017), refletindo uma mudança de uma resposta predominante Th2 para uma resposta Th1 (SCOLLARD et al. 2006; MISCH et al, 2010). As respostas imunes inatas e adaptativas participam da patogênese da RR. A via antimicrobiana dependente de vitamina D (FABRI, et al 2011) é ativada e concentrações de IL-1, IL-2, IL-6, IL8, IL-12 p40, IFN- γ , TNF, receptor de IL-2 e da quimiocina CXCL10 são detectados na circulação e lesões cutâneas (STEFANI, , et al 2003; ANDRADE, et al 2015; TUNG, et al 1987; FONSECA et al. 2017), conforme **Figura 9a** .

A reação do tipo II ou ENH geralmente é iniciado por deposição de complexos imunes e ativação da cascata do complemento, resultando em vasculite ou reação de hipersensibilidade tipo III (KAHAWITA; LOCKWOOD,2008) Trata-se de um processo inflamatório sistêmico com as manifestações clínicas de uma reação inflamatória aguda; essa reação é caracterizada por infiltrações neutrofílicas intralésionais e resposta Th2 (MOTTA et al 2012), que estimula a formação de células plasmáticas e a produção de imunoglobulinas (CUEVAS, et al 2007). No ENH há níveis significativamente mais altos de IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 e TNF e da

reguladora IL10, no plasma dos indivíduos. As reações mais graves estão associadas ao aumento da produção de TNF e IFN- γ ativando lesões do ENH (VIEIRA et al 2016; SCOLLARD et al .2015). No ENH, níveis séricos elevados de TNF são significativamente reduzidos durante o tratamento com talidomida, droga de escolha para tratamento (SAMPAIO et al.,1993) conforme **Figura 9b** .

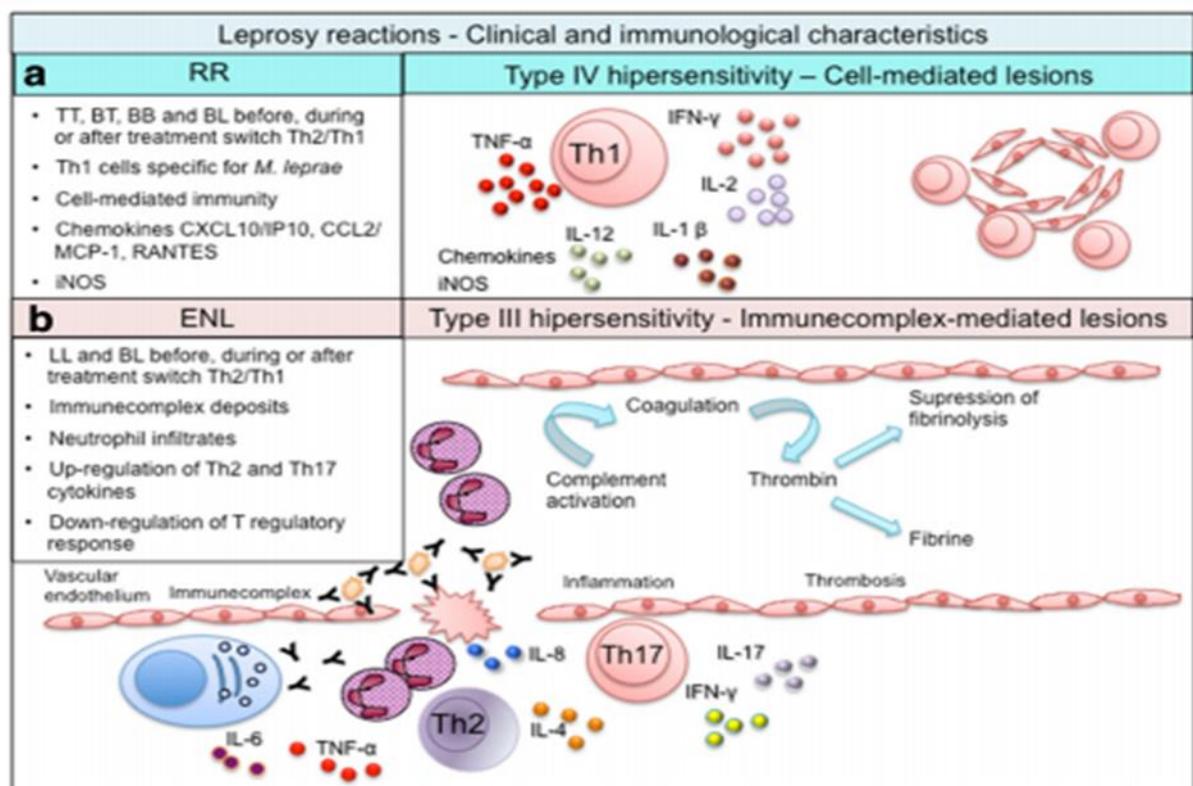


Figura 9. Aspectos imunológicos das reações hansênicas. a) A RR representa uma reação de hipersensibilidade do tipo IV. Ativação repentina de uma resposta inflamatória para antígenos de *M. leprae*, geralmente após o início do tratamento, desencadeia uma conversão transitória de uma resposta Th2 para uma resposta Th1. O padrão de expressão de citocinas nas lesões indica aumento da resposta Th1 juntamente com a ativação da resposta inata e de produtos inflamatórios. **b)** ENH envolve altos níveis de TNF, vasculite associada ao complexo imune e infiltração intralésional de neutrófilos, eosinófilos e células T CD4⁺. ENH é iniciado por deposição de imunocomplexos e ativação de complemento, desencadeando elevação de várias citocinas pró-inflamatórias, infiltrados neutrofílicos, e vasculite (Fonte: Fonseca et al, 2017)

5.4 ANTIGENO RECOMBINANTE rSM29

Nos últimos anos, estudos demonstram que as infecções com helmintos que colonizam a rede vascular e/ou tecidos do hospedeiro e os produtos resultantes deste parasitismo a exemplo do *Schistosoma spp.* e outros parasitas tem efeitos moduladores importantes na

resposta imune do ser humano e animais experimentais, sendo associado à proteção de doenças como asma, alergia, diabetes tipo 1, artrite (ZACCONE et al.,2003; MEDEIROS et al, 2003; COOPER et al, 2003 ; ARAUJO et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2016; LEONARDI-BEE; PRITCHARD; BRITTON.,2006; ALCÂNTARA-NEVES et al 2014; SMITS E YAZDANBAKHS, 2007; KAMRADT; GOGGEL; ERB, 2005)

O Sm29 é uma proteína localizada na parede do pulmão dos esquistossômulos, e no tegumento do helminto *Schistosoma mansoni* na fase adulta. A estrutura molecular é composta por uma glicoproteína da membrana de superfície com sinal peptídico N-terminal, três locais de glicosilação e uma hélice transmembranar C-terminal. O antígeno recombinante do *S. mansoni*, o rSm29, é proveniente do cDNA do Sm29 produzido em *Escherichia coli* (CARDOSO et al, 2006a; CARDOSO et al, 2006b)

Não foi identificada semelhança com proteínas de funções conhecidas nas bases de dados, exceto a similaridade com proteínas desconhecidas do genoma do *Schistosoma japonicum*, sendo as proteínas SJCHGC03008, SJCHGC05668, SJCHGC05578 e SJCHGC02532 com 53%, 52 %, 49% e 37% de similaridade , respectivamente. (CARDOSO, F.C. et al, 2006a)

Em estudos avaliando o papel do rSm29 na leishmaniose cutânea (LC), quando adicionado o antígeno às culturas de PBMC de pacientes infectados com *L. braziliensis* estimulada com o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) ocorreu redução de IFN- γ e TNF- α e o aumento da concentração de IL-10 produzido pelas células (BAFICA,2011). Com o mesmo estímulo em células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) e linfócitos , as frequências de IL-10 e seu receptor (IL-10R), foram maiores na adição rSm29 em comparação às células não estimuladas, e reduziram os níveis de IL-12p40 e IFN- γ sem alterar os níveis de TNF (MOTA,2014; MOTA, 2019). Estes estudos demonstram um papel

indutor de resposta regulatória controlando a resposta imune exacerbada encontrada na LC por este Ag.

Em locais endêmicos para esquistossomose, ocorre uma menor prevalência de atopia de asma (MEDEIROS et al, 2003;PACIFICO, 2008). Almeida e colaboradores (2017) analisaram a capacidade de antígenos do *Schistosoma mansoni* em resposta ao alérgeno do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1) nas culturas de células de indivíduos com asma. A adição de Sm29, reduziu a frequência de células TCD4⁺ CD25^{low}, enquanto observou-se maior frequência de população TCD4⁺ CD25^{high} em comparação com culturas não estimuladas. Aditivamente, decresceu a frequência de células TCD4⁺ CD69⁺ e TCD4⁺ IL-5⁺ e aumentou os níveis de IL-10 nos sobrenadantes das culturas mostrando que o Sm29 é capaz de diminuir a ativação celular e estimular mecanismos regulatórios para o controle da resposta inflamatória na asma.

No modelo experimental de indução de asma por ovoalbumina (OVA) em camundongos BALB/C, a injeção com antígenos do *Schistosoma mansoni*, incluindo o rSm29, a frequência de células TCD4⁺ e células TFoxP3⁺ foram maiores no grupos imunizados, bem como, o número de total de células e eosinófilos e, os níveis de IgE específica para OVA foram reduzido nos animais imunizados. Corroborando com os alguns achados de Pacifico et al. 2008 que utilizaram cercárias e ovos do *S. mansoni* para infectar os camundongos BALB/C. Assim, demonstrando a redução da resposta imune Th2 envolvida com a imunopatogênese da doença (CARDOSO et al. 2010)

Em estudos avaliando o rSm29 como alvo vacinal em um modelo animal foi observado que a imunização com rSm29 em camundongos gerou uma resposta imune do tipo Th1 caracterizada por níveis elevados de IFN- γ , TNF e IL-12, bem como, 51% de redução da carga parasitária de vermes adultos, 60% de redução dos ovos no intestino e 50% de redução

na quantidade de granulomas hepáticos quando comparados ao grupo controle (CARDOSO et al 2008). Outro estudo, também em modelo murino, utilizou camundongos BALB/C previamente infectados com *Schistosoma mansoni* e posteriormente tratados com Praziquantel, droga de 1ª escolha para o tratamento da doença. Os resultados mostraram uma proteção significativa (26%-48%) com três doses da vacina utilizando o rSm29 na composição com estímulo da produção de anticorpos específicos e citocinas IL-2, IFN- γ , IL-17, IL-4, bem como a quantidade de células TCD4+ de memória em comparação a camundongos BALB/C não infectados. Esses dados reforçam o potencial do antígeno recombinante como molécula vacinal (ALVES et al.2015)

Em PBMC de pacientes infectados com HTLV-1 estimulados com o rSm29, verificou-se a diminuição dos níveis de IFN- γ em 50% e o aumento expressivo de 74% dos níveis de IL-10 dos indivíduos, assim sendo capaz *in vitro* de modular a resposta imune TH1 da doença (LIMA et al, 2013). Além disso, em um estudo mais recente do mesmo grupo, na presença do antígeno houve a depleção da produção da quimiocina CXCL9, associada aos processos de recrutamento de mediadores pró-inflamatórios na doença, em comparação as condições sem estímulo (LIMA et al, 2017)

7. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.

7.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Trata-se de um estudo piloto, modelo corte transversal com o período de coleta de agosto de 2018 a julho de 2019. Pacientes com hanseníase foram convidados a participar do estudo após confirmação diagnóstica realizada pela equipe dos centros de referência no tratamento da doença no Estado da Bahia localizados na cidade de Salvador, Bahia. São eles: Ambulatório de hanseníase do Ambulatório Magalhães Neto pertencente ao Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES) e do Instituto Couto Maia (ICOM), de acordo com as orientações do Ministério da Saúde.

Para este estudo foram incluídos pacientes de ambos os sexos, acima dos 18 anos e menores que 60 anos, diagnosticados com hanseníase e podendo ter ou não reação hansênica do tipo 1 ou 2. Os indivíduos que preencheram estes critérios de inclusão, e que aceitaram participar, foram encaminhados para obtenção de autorização formal mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), questionário e coleta de sangue total. Estas etapas foram realizadas no Ambulatório de Hanseníase do AMN e ICOM. Foram excluídos pacientes com outras doenças infecciosas concomitantes, portadores de doenças autoimunes ou genéticas, história auto-relatada de infecção pelo *Schistosoma mansoni*, gestantes e pacientes que já tenham iniciado a terapia antireacional ou em uso de imunossupressores. No Serviço de Imunologia da UFBA, localizado no COM-HUPES ocorreu o processamento do material, armazenamento em biorepositório, montagem do banco de dados e realização dos experimentos laboratoriais.

7.2.OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO E CULTURA DE CÉLULAS

Realizamos punção venosa para coletar 20 mL de sangue periférico em tubo heparinizado e 8,5 mL de sangue periférico em tubo seco para obtenção do soro dos participantes. As células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) foram obtidas através do gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences ©) e ajustadas para concentração de 1×10^7 células/ml em RPMI 1640 (Life technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), adicionado a 10% de soro humano AB+ inativado, gentamicina (100 U/ml), L-glutamina (2mM) e HEPES (25mM).

As culturas foram estimuladas com antígeno sonicado de *Mycobacterium leprae* e rSm29 nas seguintes condições : 1- Meio (sem estímulo); 2- antígeno sonicado de *Mycobacterium leprae*; 3- antígeno sonicado de *Mycobacterium leprae* e o rSm29 juntos e 4- apenas rSm29 e cultivadas a 37°C, e 5% de CO₂ em tubos de propileno com fundo “U” por 72 h. Nas culturas de células onde o rSm29 está presente foi adicionado 15µl de polimixina B na incubação para eliminar possíveis efeitos do LPS. As células foram armazenadas com TRIzol e conservadas a -70°C .A partir daí realizamos a extração de RNA, conversão para cDNA e avaliação da expressão gênica. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e mantidos a -70°C para posterior dosagem das citocinas.

7.3.EXTRAÇÃO DE RNA

As CMSPs pós cultura foram ressuspensas em 400µl de TRIzol (Life Technologies) e conservadas a -70 °C até a extração de RNA. O RNA foi extraído de acordo com o seguinte protocolo: Inicialmente, as células eram transferidas para um tubo de microcentrifuga (1,5mL) e adicionado ao TRIzol 200µl de clorofórmio. O mix era homogeneizado por inversão,

incubado por 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugado à 12000 rpm por 25 minutos a 4°C. A fase aquosa era então transferida para um novo tubo de microcentrifuga (1,5mL) e o RNA cuidadosamente aspirado. Nessa etapa, eram adicionados 500µl de isopropanol e 2µl de glicogênio. O material era centrifugado à 12000 rpm por 10 minutos a 4°C, com o descarte do sobrenadante e posterior adição de 1mL de etanol, e realizada última centrifugação a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C. Removemos cuidadosamente o sobrenadante por inversão e secamos o tubo por aproximadamente 30 minutos. Adicionamos água livre de RNase (20µl) ao pellet e incubamos por 10 minutos a 55~60°C. As concentrações e a pureza das amostras foram estimadas por densidade óptica (260 a 280 nm) utilizando o espectrofotômetro L-Quant (Loccus Biotecnologia®).

7.4.CONVERSÃO PARA cDNA E EXPRESSÃO GÊNICA

A obtenção de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit comercialmente disponível High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher®), de acordo com as instruções do fabricante. O ensaio contendo primers e sondas específicas para TLR2 (Hs00152932_m1), TLR4 (Hs00152939-m1), IL10(Hs00961622_m1) e TNF (Hs00174128_m1) foram pré-desenhados pela Thermo Fisher®. A avaliação da expressão gênica foi feita pela técnica de TaqMan® por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), a partir das reações preparadas como descrito a seguir: 2µl de cDNA, 5 ul de TaqMan Universal Mastermix, 2,5µ de água ultra pura livre de RNase e 0,5µl de ensaio em um volume final de 10 µl. As condições de amplificação obedeceram a seguinte ciclagem (I) 5 minutos a 50°C, (II) 10 minutos a 95°C, (III) 15 segundos a 95°C e (IV) 1 minuto a 60°C, sendo os ciclos 3 e 4 repetidos 40 vezes. Todas as amostras foram utilizadas em duplicatas. A β-actina foi utilizado como gene endógeno para normalização.

A comparação dos padrões de expressão dos genes analisados foi realizada utilizando o método de Ct comparativo, através da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde ΔCt corresponde ao valor de Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene endógeno, e $\Delta\Delta Ct$ corresponde ao valor de ΔCt de cada condição subtraído da mediana do ΔCt do grupo controle (meio sem estímulo).

7.5.DOSAGEM DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS

Foram avaliadas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β) no sobrenadantes das culturas utilizando o imunoensaio multiplex (Bioplex®) conforme especificações do fabricante

7.6.OBTENÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO *S. mansoni* - rSM29 E DO *M. leprae*

O antígeno rSm29 foi gentilmente cedido pelo Dr. Sérgio Costa Oliveira do Laboratório de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas/ICB - Universidade de Minas Gerais (UFMG) para utilização em pesquisas que avaliam o efeito dos antígenos de *S. mansoni* sobre as doenças inflamatórias que cursam com a exarcebação da resposta imune do tipo Th1 e Th2. O Serviço de Imunologia possui antígeno sonicado de *M. leprae* em seus estoques como parte de suas pesquisas na área de hansenologia.

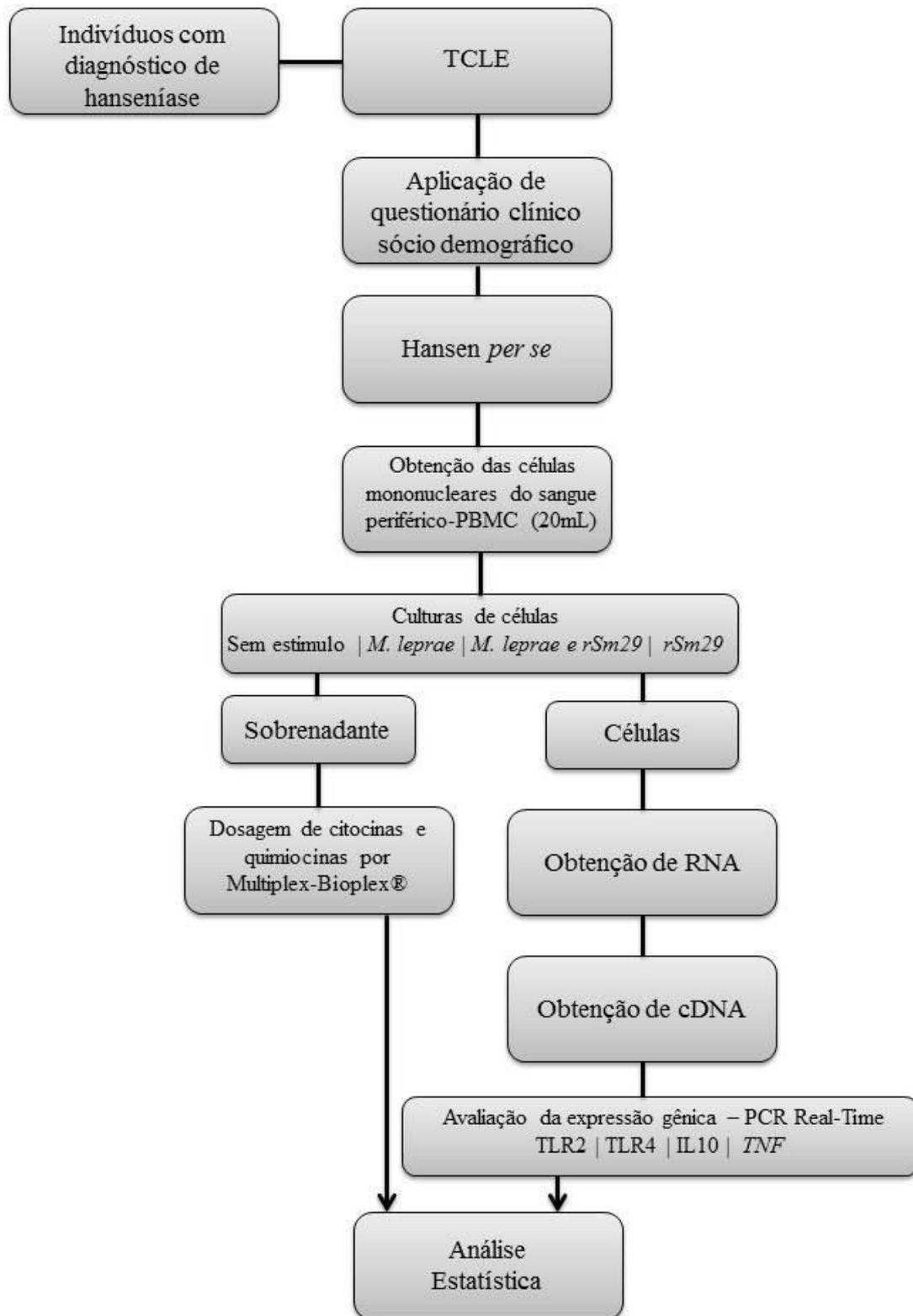
7.7.APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, sob o cadastro, e da Comissão de Ética em Pesquisa (CEP2.432.555). Todos os pacientes convidados aceitaram o convite e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

7.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias dos valores dos marcadores imunológicos (Bioplex) foram analisados pelos testes não paramétricos de Kruskal Wallis seguido teste t não paramétrico par-a-par (Wilcoxon). Na comparação das medianas dos valores de expressão normalizada conforme método de Ct comparativo foi utilizado Kruskal wallis, seguido por comparação das medianas por teste t não paramétrico par-a-par. Em todos os testes, o nível de confiança foi de 95%, e considerando significativamente um valor de p menor que 0,05 ($p < 0,05$). As análises e gráficos foram feitos utilizando o programa Graphpad 5

7. FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DO ESTUDO



8. RESULTADOS GERAIS

8.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA AVALIADA

Os indivíduos participantes desse estudo foram convidados nos dois ambulatórios de referência descritos na metodologia. De modo geral, a proporção na distribuição entre o sexo masculino e feminino foi de 10:7. Sessenta e quatro por cento (64%) apresentaram índice baciloscópico negativo, enquanto 36% apresentaram índice baciloscópico positivo. Cerca de 76% dos pacientes foram alocados no tratamento como multibacilares. A maioria, 71% foi procedente do ambulatório de hanseníase do Couto Maia e 29% do Ambulatório Magalhaes Neto, sendo que aproximadamente 65% foram diagnosticados com o espectro clínico *borderline*. Apenas 3 pacientes (18%) estavam em episódio reacional no dia da coleta, sendo 2 em RR e 1 em ENH. A média de idade com desvio padrão foi de $39,29 \pm 10,39$, descritos na tabela 1.

TABELA 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com hanseníase incluídos no estudo.

Características (n=17)	Valores
Idade (em anos) (Média±Desvio padrão)	39,29±10,39
Sexo (masculino/feminino)	10/7
Características Clínicas da amostra	
Tratamento	n(%)
PB	4(23,52)
MB	13(76,47%)

Índice Baciloscópico negativo	64%
Índice Baciloscópico positivo	36%
Fenótipo Clínico	n(%)
Tuberculoide (TT)	0
<i>Boderline</i> tuberculoide (BT)	4 (23,52)
<i>Boderline boderline</i> (BB)	5(29,41)
<i>Boderline</i> lepromatosa (BL)	2(11,78)
Lepromatosa (LL)	3(17,74)
Indeterminada (I)	1(5,88)
Outras formas (Neural)	2(11,78)
Reação Hansênica 1 ou 2	3(17,65)

Resultados foram mostrados por numero (n) e (%). Abreviações: *PB* - paucibacilar, *MB*- multibacilar. Pacientes foram classificados conforme seu espectro clínico da doença de acordo com a classificação de Ridley & Jopling

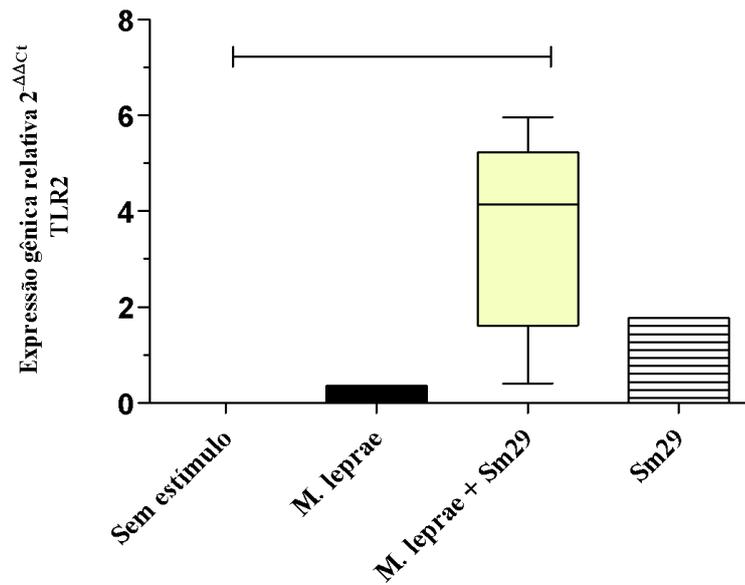
8.2.RESULTADOS DO OBJETIVO 1: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE DE *TLR2*, *TLR4*, *TNF* E *IL10* DE PACIENTES COM HANSENÍASE EM DIFERENTES ESTÍMULOS

A expressão dos genes *TLR2* e *TLR4* foi analisada em pacientes com hanseníase nas seguintes condições: sem estímulo, antígeno do *M. leprae* sonicado, antígeno do *M. leprae* sonicado + rSm29 e apenas rSm29.

Foi observada uma maior expressão do gene de *TLR2* na condição co-estimulada *versus* ao sem estímulo (p= 0,0139). Ao observarmos a condição apenas rSm29, apesar de haver um aumento da expressão do gene em comparação ao sem estímulo, este não foi estatisticamente significativo. Esse resultado mostra que quando adicionado o antígeno rSm29 a expressão relativa de *TLR2* aumenta, como demonstrada na **Figura 10 A**.

Na expressão gênica relativa de *TLR4*, ocorreu uma maior expressão do gene quando as células estimuladas com antígeno sonicado de *M. leprae* foram comparadas às sem

estímulo ($p= 0,0042$). Ocorreu ainda uma diminuição estatisticamente significativa quando adicionado o estímulo do antígeno rSm29 ao *M. leprae* ($p= 0,0317$) em comparação a condição apenas *M. leprae*, e, ainda que não significativa, na comparação de rSm29 puro e *M. leprae* conforme mostrado na **Figura 10 B**. Isso mostra que o antígeno rSm29 tem um efeito antagônico sobre os genes de *TLR2* e *TLR4*, aumentando a expressão de um e reduzindo a do



outro, respectivamente.

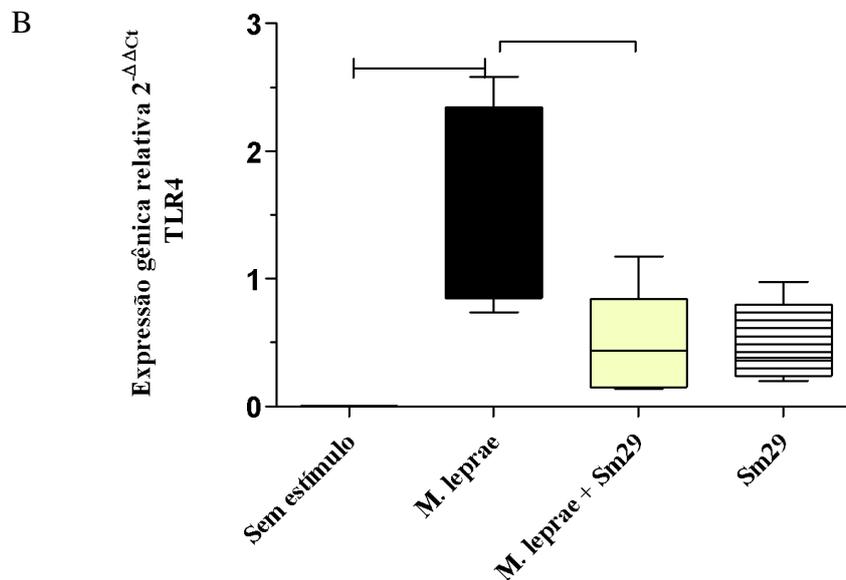
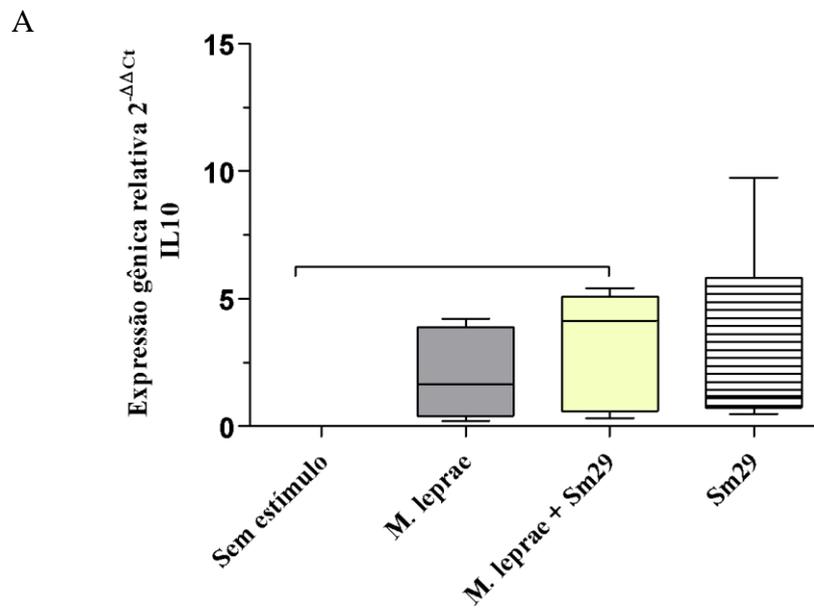


Figura10 (A-B). Expressão gênica relativa para *TLR2* (A) e *TLR4* (B) entre diferentes estímulos em pacientes com hanseníase. PCR em tempo real utilizando cDNA a partir do RNA das células mononucleares do sangue periférico dos pacientes estimuladas nas condições sem estímulo, antígeno do *M. leprae* sonicado, antígeno do *M. leprae* sonicado + rSm29 e o rSm29. Os dados foram apresentados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo sem estímulo após normalização da expressão gênica da β -actina. Os dados foram analisados usando o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Wilcoxon.

No gene de *IL10*, observamos um aumento significativo da expressão genica relativa na condição co-estimulada (*M. leprae* + rSm29) em comparação a cultura sem estímulo ($p=0,0254$), a adição de apenas rSm29 à cultura eleva a expressão de *IL10* embora esse aumento não tenha sido estatisticamente significativo, conforme mostrado na **Figura 11 A**. Já em relação a *TNF*, não encontramos diferenças estatísticas significativas na expressão relativa, conforme a **Figura 11 B**.



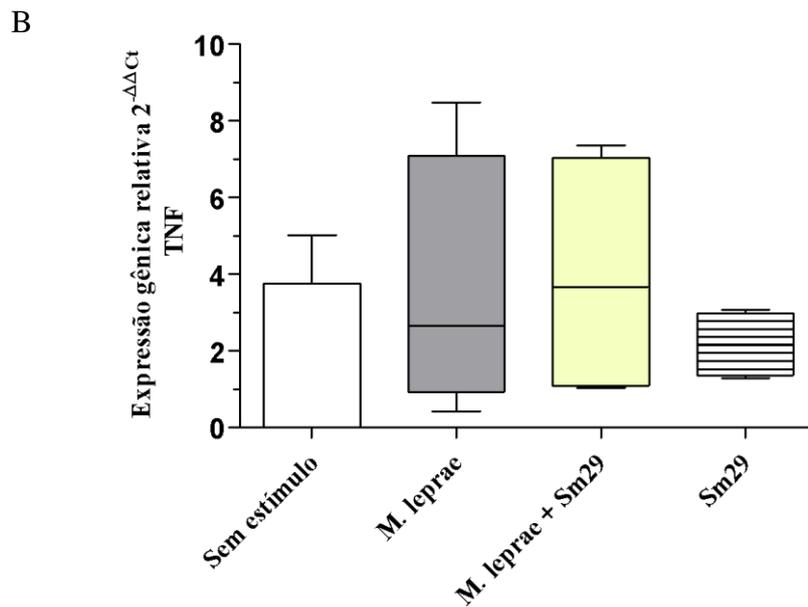


Figura 11 (A-B) . Expressão gênica relativa para *IL10* (A) e *TNF* (B) entre diferentes estímulos em pacientes com hanseníase . PCR em tempo real utilizando cDNA a partir do RNA das células mononucleares do sangue periférico dos pacientes estimuladas nas condições sem estímulo, antígeno do *M. leprae* sonicado, antígeno do *M. leprae* sonicado + rSm29 e o rSm29. Os dados foram apresentados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo sem estímulo após normalização da expressão gênica da β -actina. Os dados foram analisados usando o teste Kruskal-Wallis seguido de teste de Wilcoxon.

8.3.RESULTADOS DO OBJETIVO 2: ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE PACIENTES COM HANSENÍASE EM DIFERENTES ESTÍMULOS

Utilizamos o método Multiplex para a quantificação das citocinas e quimiocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β) nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com o antígeno do *M. leprae* e *M. leprae* + rSm29 dos pacientes hanseníacos de acordo com sua classificação operacional paucibacilar (PB) e multibacilar (MB). Os valores de p de cada análise são descritas na Tabela 2. Os resultados mostram diferenças significativas nas concentrações dos marcadores nos sobrenadantes co-estimulados com os dois antígenos em comparação ao *M. leprae* sonicado no grupo PB observadas em G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α nas **Figuras 12 (A, B, J, L)**. Nas citocinas e quimiocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-17 nas **Figuras 12 (C, D, E, N)**, além das diferenças significativas observadas nos mediadores da resposta imune anteriores, foram observados também diferença

significante na estimulação apenas com o antígeno recombinante *versus* a condição *M. leprae* + rSm29 no grupo PB. Não foram observada diferenças nas citocinas e quimiocinas IL-7, IL-10, CCCL4, IL-13 nas **Figuras 12 (G, H, I, M)** em nenhuma das condições. Não foi possível realizar as análises IL-12 e MCP-1. Em pacientes MB, não encontramos diferença significativa entre as concentrações de estímulo. Detectamos que as concentrações de citocinas e quimiocinas são quantitativamente mais elevados no grupo PB para maioria dos marcadores.

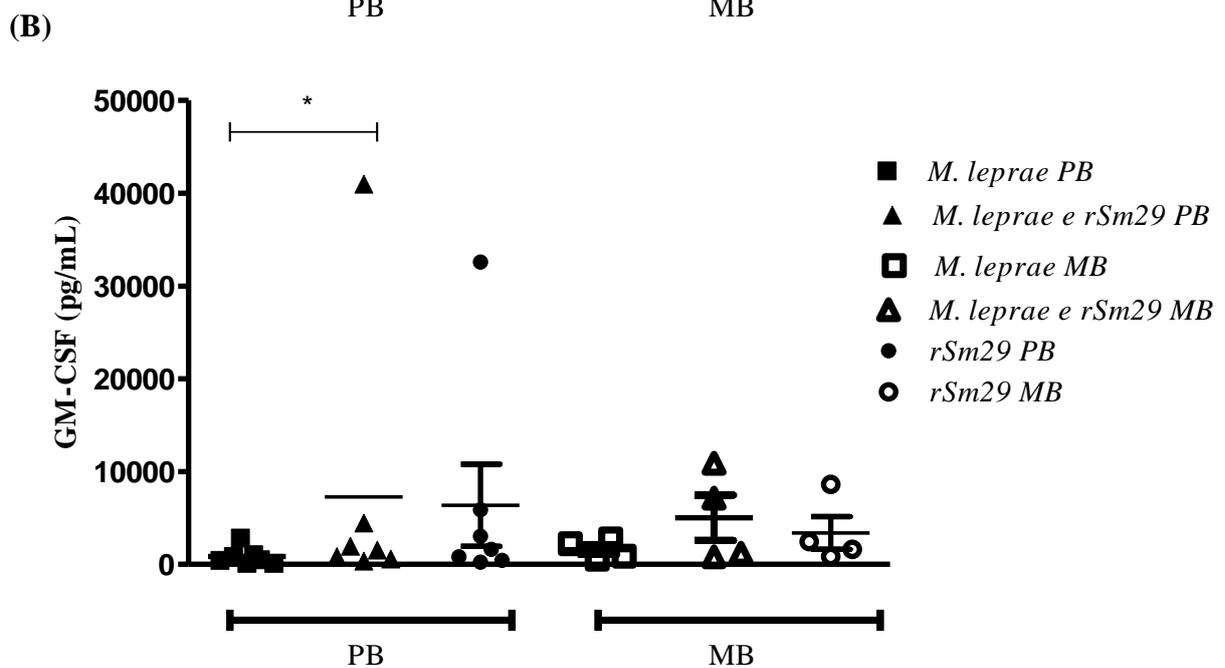
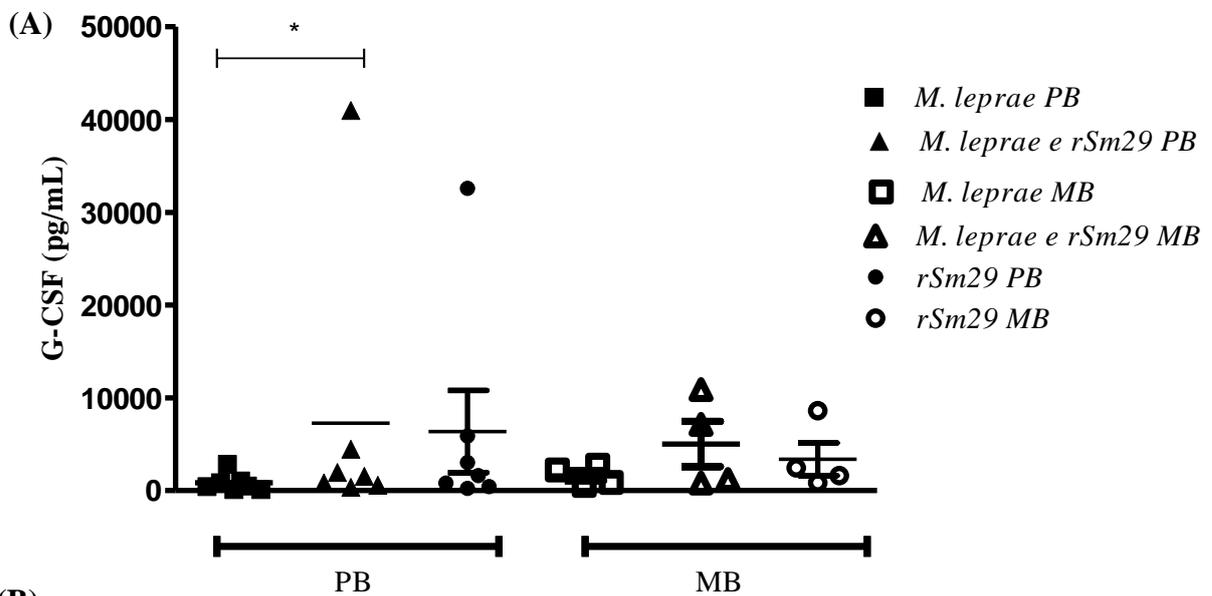
TABELA 2- Comparação das concentrações dos sobrenadantes estimulados com *M. leprae*, *M. leprae* + rSm29 e rSm29 em pg/mL no grupo de indivíduos paucibacilares (n=7) e multibacilares (n=4).

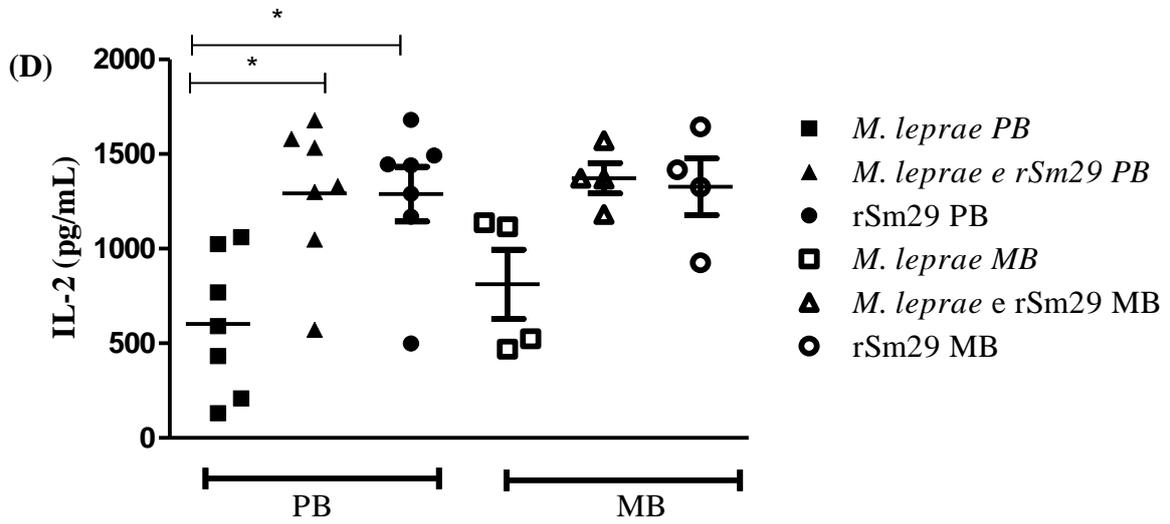
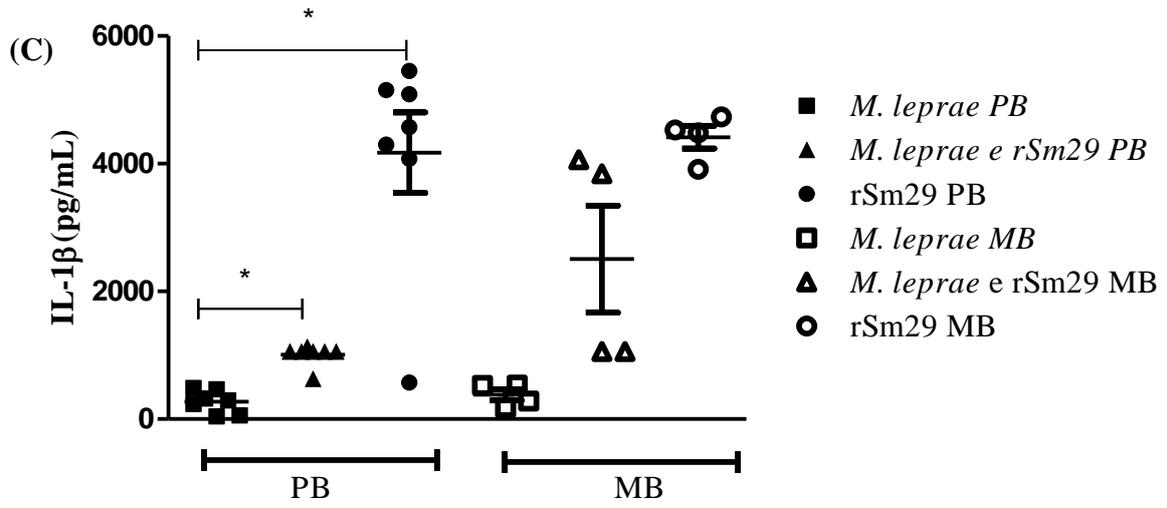
Citocinas e Quimiocinas (pg/mL)								
		Quartis (25%-75%)	<i>M.</i> <i>leprae</i> +	Quartis (25%-75%)	p valor M. leprae vs. M. leprae +rSm29	<i>rSm29</i>	Quartis (25%-75%)	p valor M. leprae vs. rSm29
GM-CSF- PB	38,64	24,27- 250,1	514,8	341,2-548,2	0,0041	310,3	234,1- 418,7	0,0313
GM-CSF- MB	94,67	29,22-343,8	416,3	198,0-873,0	0,1143	312,5	116,6- 684,8	0,1250
IL1 β -PB	292,5	56,80-465,4	1060	1060-1060	0,0156	4573	4079-5150	0,0313
IL1 β -MB	403,0	206,4- 531,4	2450	1060-4005	0,1250	4506	4053-4682	0,1250
IL2-PB	591,2	209,3-1023	1331	1049-1581	0,0156	1441	1170-1492	0,0240
IL2-MB	820,0	483,1-1132	1370	1227-1521	0,1250	1372	1025-1587	0,1667
IL4-PB	102,7	33,26-132,6	229,4	185,9-244,6	0,0156	223,2	213,0-240,3	0,0331
IL4-MB	127,5	79,51-162,3	231,2	214,7-242,2	0,1250	232,3	207,6-241,2	0,3750

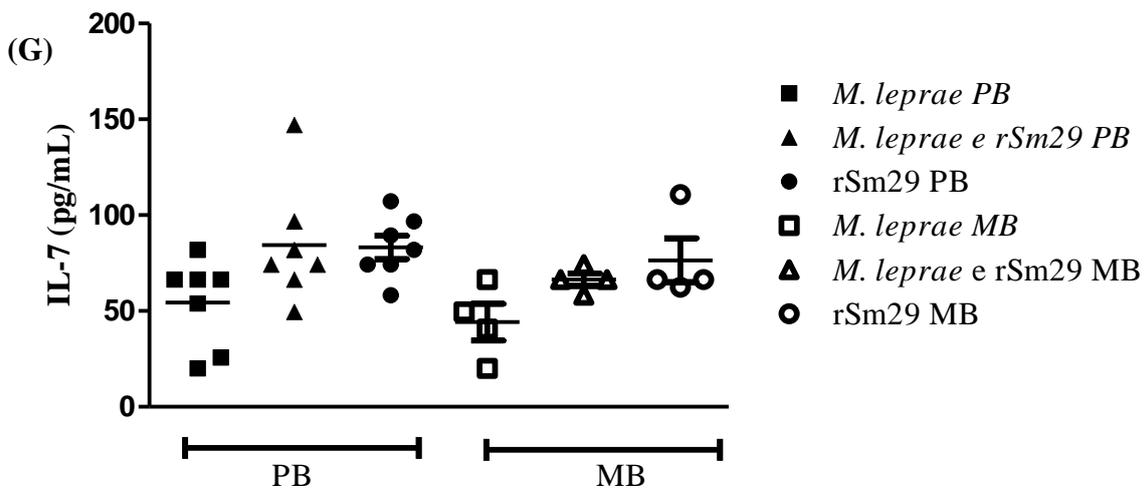
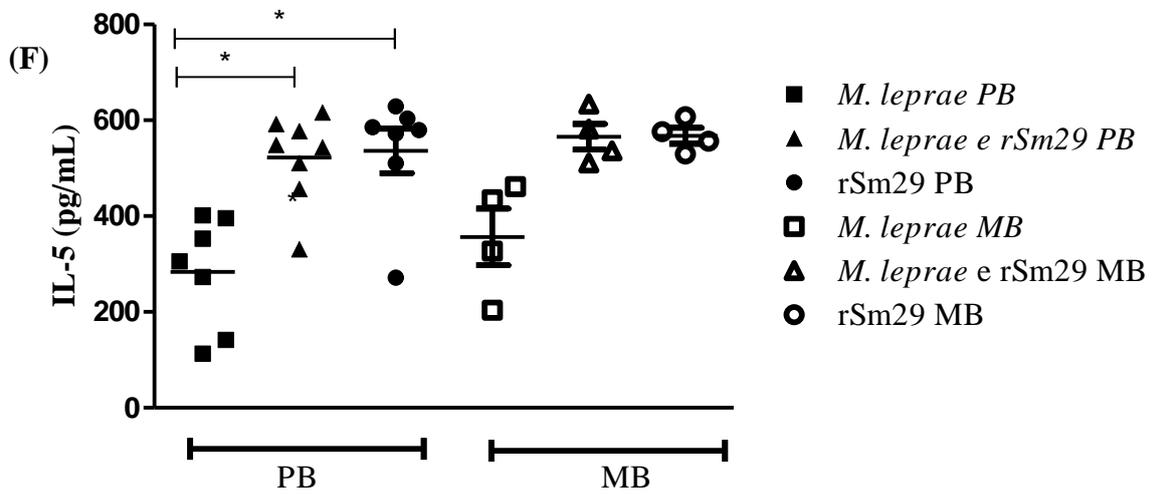
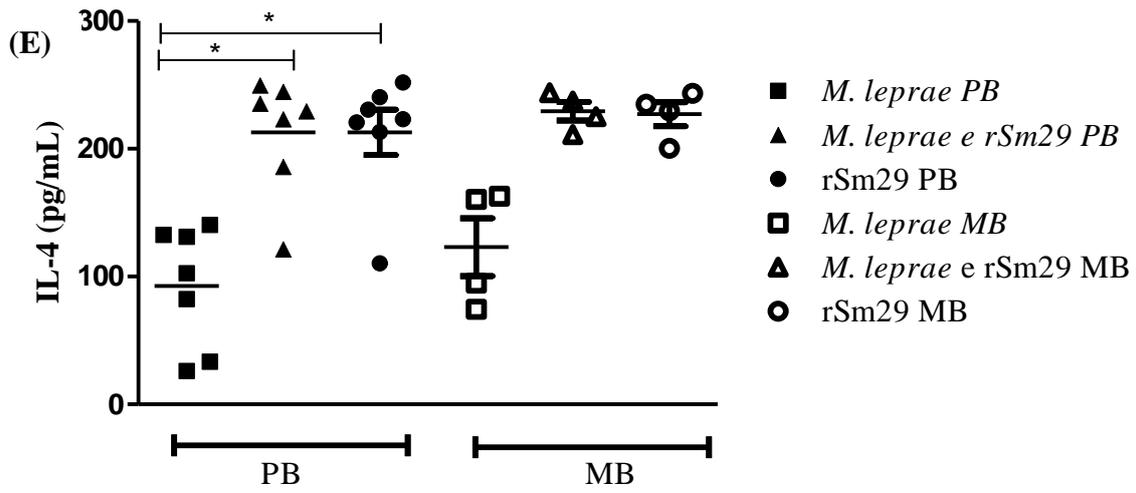
IL5-PB	305,4	142,0-395,9	548,9	457,1-592,5	0,0156	579,7	510,3-603,4	0,0440
IL5-MB	380,7	234,4-454,8	559,0	517,3-620,6	0,1250	566,5	536,3-599,9	0,1667
IL7-PB	66,41	25,69-66,41	74,32	66,41-96,71	0,1978	81,98	74,32-96,71	0,1667
IL7-MB	45,11	25,26-62,22	66,41	60,25-72,34	0,2500	66,41	63,37-99,70	0,2083
IL10-PB	416,8	200,3-1199	644,8	248,7-1901	0,1250	660,6	161,4-1639	0,3575
IL10-MB	808,8	424,6-1227	2556	736,9--5432	0,2500	1226	341,3-2324	0,1250
CCL4-PB	4085	3553-10520	9224	7509-17700	0,0469	13030	9750-18360	0,1512
CCL4-MB	12380	5476-22680	12200	8681-12210	0,8750	13690	6903-48080	0,8750
TNF-PB	17970	13380-50190	55080	49140- 162900	0,0156	65550	59160- 132000	0,5781
TNF-MB	39930	18950-58340	75530	55160- 130800	0,1250	74210	47560- 154200	0,8750
GCSF-PB	494,8	112,0-1034	1548	607,5-4476	0,0156	1635	418,9- 5893	0,0156
GCSF-MB	1561	629,1-2618	4170	925,2-9962	0,1250	2050	1054- 7070	0,6250
IFN γ -PB	563,0	296,7-598,1	1405	726,6-2348	0,0156	65550	59160- 132000	0,5781
IFN γ -MB	511,7	282,8-1314	608,3	574,2-773,5	0,8750	74210	47560- 154200	0,3750
IL-13 PB	33,23	13,90-166,3	41,77	19,60-97,98	0,1250	14,72	11,64-31,80	0,8750

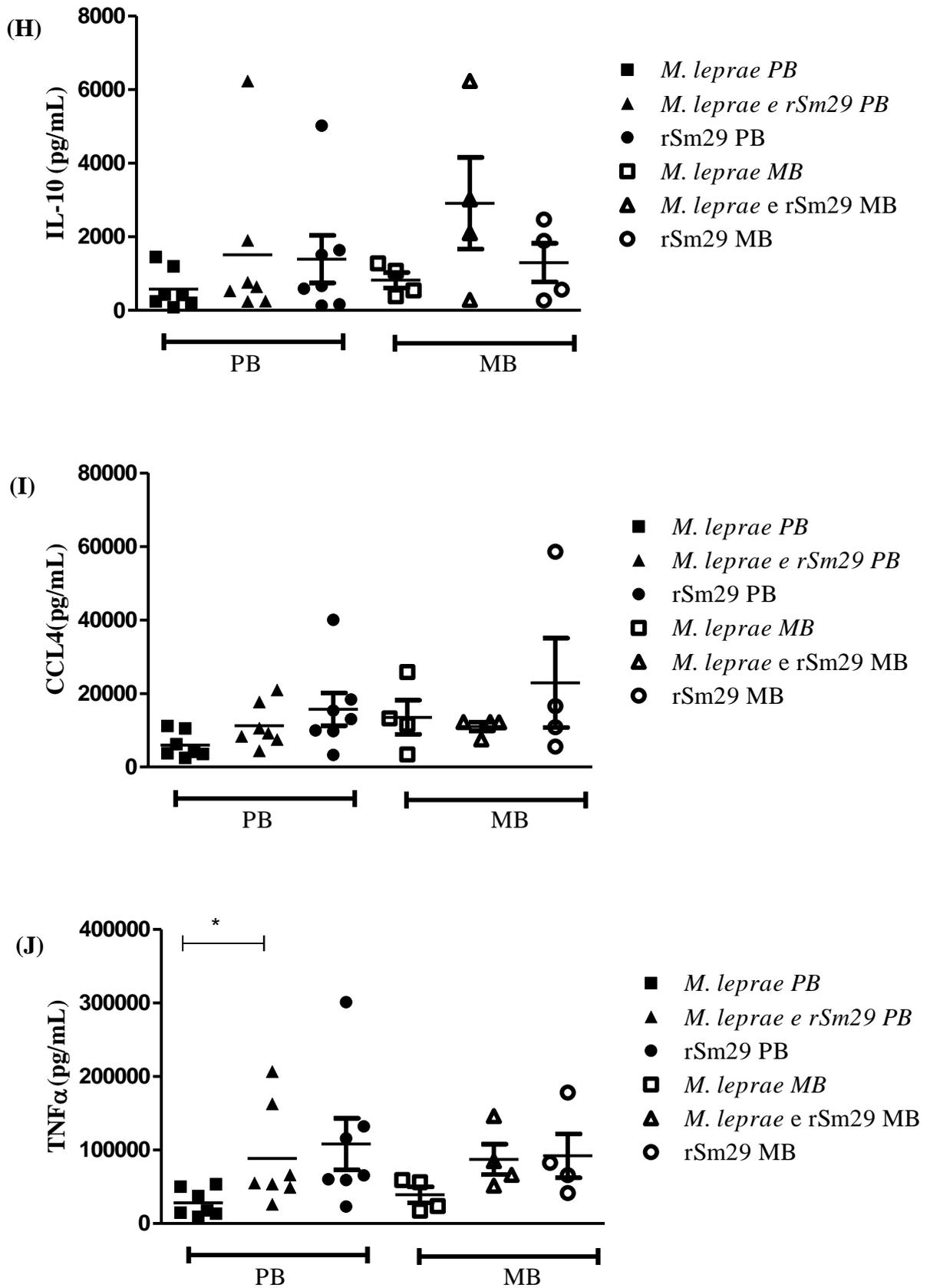
IL-13 MB	26,49	3,533-64,24	33,58	9,643-91,40	0,6250	25,08	11,94-46,69	0,1250
IL-17 PB	446,5	198,1-634,2	1293	1042-1440	0,0062	1349	1279-1441	0,0156
IL-17 MB	584,1	198,0-849,3	1399	1261-1451	0,8750	1388	1291-1444	0,3750

- A tabela mostra os resultados das comparações entre os grupos paucibacilar (n=7) e multibacilar (n=4). A avaliação dos níveis de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes das culturas foi feita pelo imunensaio Multiplex. Os valores destacados em negrito são os resultados que foram estatisticamente significante; Teste de Mann-Whitney –GraphPadPrism5.









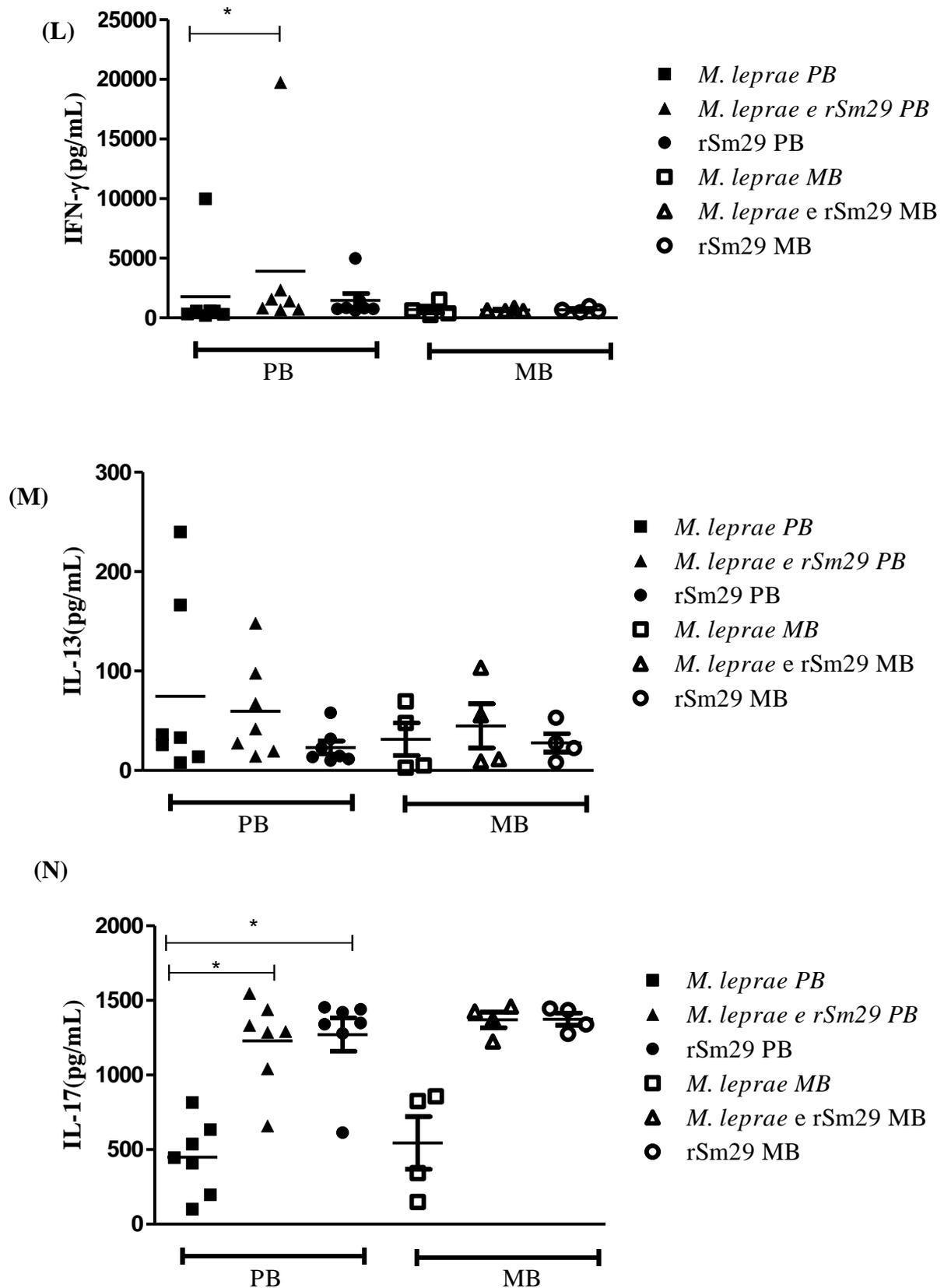


Figura 12 (A-N). Produção de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de células estimuladas com antígeno *M. leprae* sonicado, *M. leprae* sonicado + rSm29 e rSm29 no grupo paucibacilar e multibacilar. A dosagem foi realizada por imunoenensaio multiplex no sobrenadante das culturas e os resultados expressos em

pg/mL. Os valores que são estatisticamente significantes são sinalizados como: * $p < 0.05$; Teste de Kruskal wallis seguido teste de Wilcoxon

A análise exploratória das variações intragrupo MB e PB nos marcadores imunológicos entre os antígenos (**Figura 13**) mostrou o aumento do boxplot quando inserido o antígeno recombinante rSm29 em ambos os grupos. O gráfico de visualização t-SNE (**Figura 14**) mostrou a divisão entre dois clusters distintos, sendo a menor concentração na condição apenas *M. leprae* e o aumento quando adicionado o antígeno recombinante. Reforçando, nossos achados nas citocinas e quimiocinas de maneira individual.

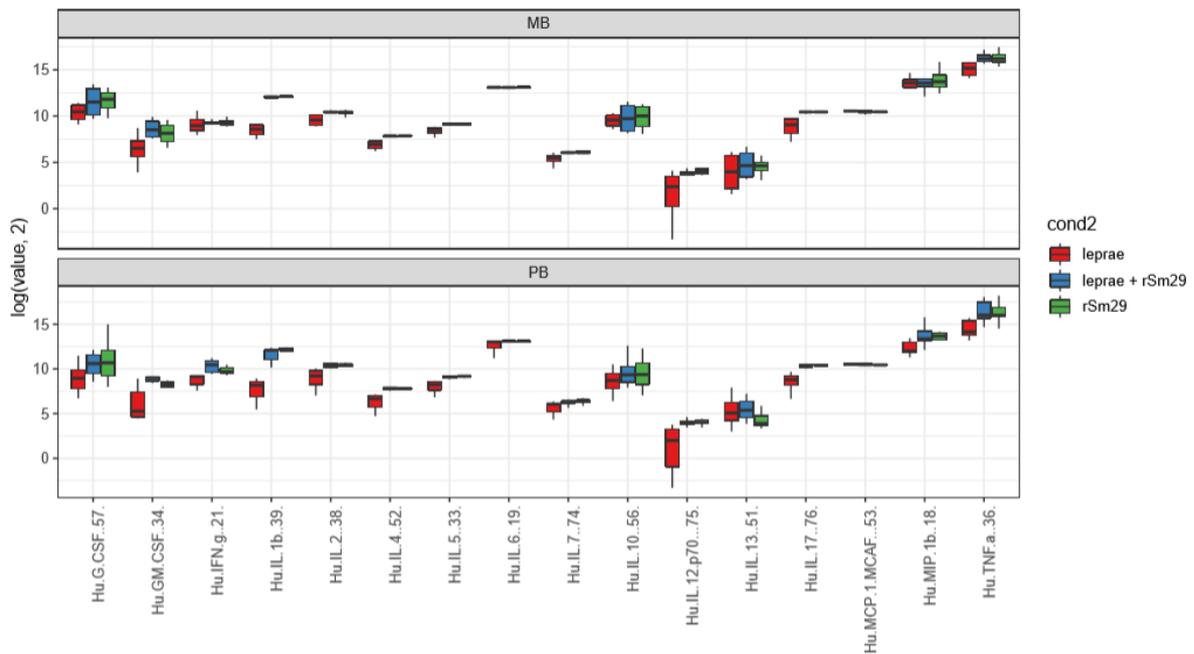


Figura 13. Análise exploratória das variações intragrupo MB e PB nos marcadores imunológicos entre os antígenos. As condições dos antígenos foram *M.leprae* (boxplot cor preta), *M.leprae* + rSm29 (boxplot cor azul) e rSm29 (boxplot cor verde)

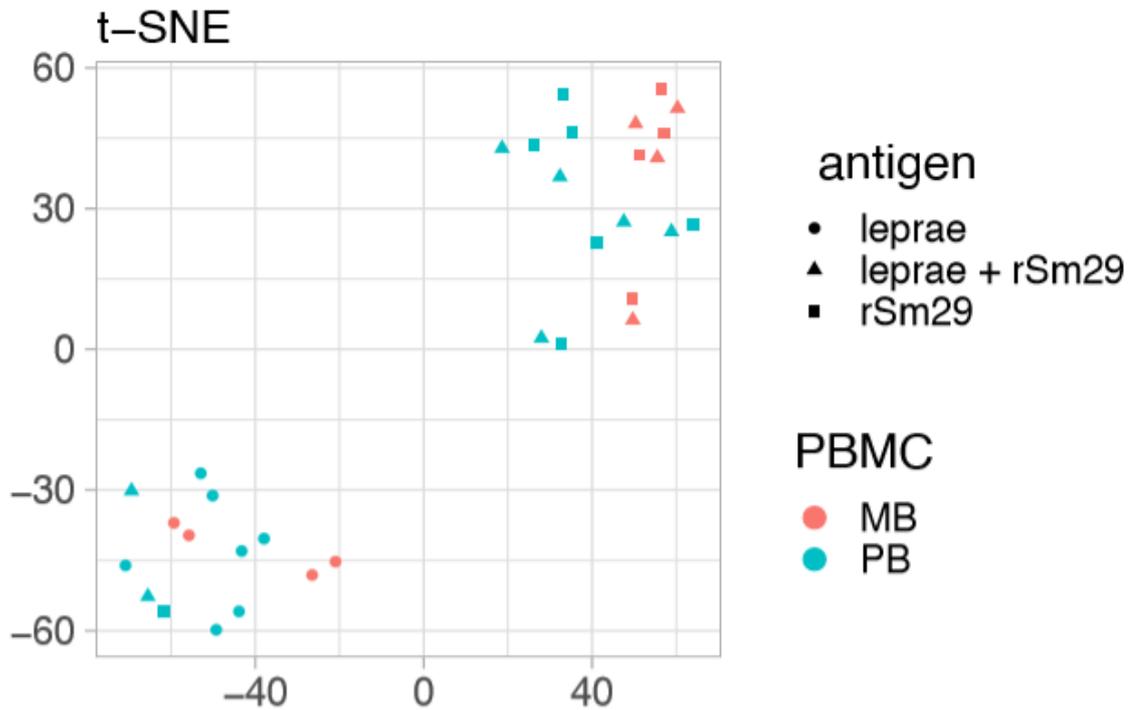


Figura 14. Gráfico de visualização t-SNE (Machine Learning) utilizando as concentrações dos pacientes MB (esfera cor vermelha) e PB (esfera cor azul) nas condições *M.leprae* (esfera cor preta), *M.leprae* + rSm29 (triângulo cor preta) e rSm29 (quadrado cor preta)

9. DISCUSSÃO

A hanseníase, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* continua sendo um desafio em saúde pública nos países em desenvolvimento (SAINI, RAMESH, NATH, 2013). Aspectos genéticos e imunológicos do hospedeiro estão associados ao desenvolvimento da doença, que possui apresentação espectral. Assim, em indivíduos suscetíveis, o resultado da infecção por *M. leprae* coincide estreitamente com a capacidade do hospedeiro de estabelecer uma imunidade inata e adaptativa eficaz ao bacilo, resultando no desenvolvimento de manifestações clínicas polares.

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos documentaram o papel da infecção helmíntica como sendo capaz de modular a resposta imune (RI) de hospedeiros portadores de outras infecções, além de distúrbios metabólicos e autoimunes (GAZZINELLI-

GUIMARAES E NUTMAN, 2018). A imunorregulação induzida por helmintos ocorre principalmente através da indução de células T reguladoras e citocinas, a exemplo da IL-10, ou do desvio da RI para o pólo Th2 induzida pela infecção ou por produtos derivados dos helmintos, que são capazes de induzir uma imunidade por mecanismos inatos, a exemplo da estimulação via receptores tipo toll (TLR). (SHU MIN et al. 2011; LUDWIG-PORTUGALL E LAYLAND,2012;GAZZINELLI-GUIMARAES E NUTMAN, 2018; MAIZELS, 2005).

Dentre os helmintos indutores de uma forte resposta reguladora, o *Schistosoma mansoni* tem um papel de destaque uma vez que, apesar de ser um parasito que habita na sua forma adulta o sistema porto-mesentérico, é capaz de sobreviver por longos períodos sem causar uma ativação excessiva da RI que impeça sua sobrevivência (LAMBERTUCCI, 2010). Neste contexto, antígenos derivados do tegumento do verme adulto têm sido extensivamente investigados, pelo seu grande potencial indutor de uma resposta regulatória. Estes trabalhos forneceram o racional para a escolha do antígeno Sm29, como possível indutor de regulação da resposta imune exacerbada encontrada na infecção pelo *M. leprae*. Estudos realizados no Serviço de Imunologia tem avaliado a RI *in vitro* induzida pela estimulação com Sm29 tanto em doenças que cursam com uma resposta exacerbada do tipo Th1, a exemplo da leishmaniose e da infecção pelo HTLV-1, como na resposta Th2, observada na asma alérgica. (BAFICA et al, 2012; LOPES et al, 2014;CARDOSO, et al 2016 ; CARDOSO, et al 2010). Sendo a hanseníase uma doença que apresenta os dois perfis de envolvimento imunológico no seu espectro clínico e por não haver dados anteriores na literatura, avaliamos o comportamento do antígeno Sm29 recombinante em células de pacientes com hanseníase.

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a expressão dos receptores *TLR2* e *4* e a produção de citocinas em PBMC de indivíduos com hanseníase. **Observamos um aumento na expressão de *TLR2* nas culturas estimuladas pelos antígenos de *M.leprae* e rSm29, comparados às culturas estimuladas apenas com *M. leprae*.** O TLR2 heterodimeriza com o

TLR1 para reconhecer principalmente lipoproteínas triaciladas expressas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, detectando glicolipídios, glicoproteínas, lipopeptídeos além de outros componentes da parede celular (TAKEUCHI 2002; TAPPING 2003). Em adição, o TLR2 também possui agonistas para vários antígenos de helmintos, inclusive antígenos da membrana do tegumento do *Schistosoma mansoni*, como Lisofosfatidilserina (liso-PS) e também antígeno de ovo (SEA) (DIAZ, A 2007). Assim, é possível que esse aumento na expressão do *TLR2* das culturas co-estimuladas seja justificado pelo efeito potencializado destes dois antígenos em adição, o que pode estar refletido em uma elevação geral da resposta inflamatória observada nos sobrenadantes destas culturas.

Estudos relatam que o TLR2 é o principal mediador da ativação de macrófagos em resposta a micobactérias, e o mecanismo de sinalização é claramente distinto da sinalização induzida por lipopolissacarídeo (LPS) que ocorre via TLR4 (UNDERHILL 1999a e b). **Ao contrário do ocorreu com TLR2, nós observamos uma redução da expressão do gene de *TLR4* quando adicionado o rSm29 às culturas estimuladas pelo *M. leprae*.** As evidências sugerem que muitas moléculas derivadas do *Schistosoma*, particularmente ligantes do TLR4 e várias glicoproteínas, são imunossupressoras e regulam negativamente as respostas Th1 por LPS, promovendo ativamente a imunidade do tipo Th2 (MARSHALL 2008; VAN LIEMPT 2007). É possível que a queda na expressão de *TLR4* observada após a adição do rSm29 seja o resultado da neutralização de componentes imunossupressores primados pelo *M. leprae*. Hipotetizamos que ambos, o aumento da expressão de *TLR2* e a redução da expressão de *TLR4* seja o antígeno do helminto sustentando uma resposta pró-inflamatória, que é a desenvolvida nas formas mais brandas e melhor controladas da hanseníase.

Os helmintos pertencem a grupos de animais altamente divergentes e ainda induzem uma resposta estereotipada do hospedeiro: imunidade do tipo Th2. Há muito se debate se essa resposta beneficia o hospedeiro ou o parasita, mas sabe-se que a imunidade Th2 é uma

resposta evolutiva apropriada aos helmintos, tanto em termos de controle de parasitos quanto de reparação dos danos que eles causam. No entanto, “parasitos bem-sucedidos” induzem respostas regulatórias, que se sobrepõem e controlam as respostas Th2 (DIAZ, 2007). Nós dosamos um painel de marcadores moleculares em células de pacientes com hanseníase estimulados ou não com rSm29. **Observamos que, apenas nos pacientes paucibacilares, houveram diferenças estatisticamente significantes nas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento avaliados, quando as células estão sob co-estimulação (*M. leprae* sonicado + rSm29).** Esses resultados podem ser justificados de diferentes formas: 1- Inicialmente, devemos lembrar que a amostra de pacientes MB é inferior à de pacientes PB. Neste caso, a limitação amostral pode ter contribuído para um resultado não significativo no grupo MB, embora estes também tenham seguido o aumento ocorrido nos pacientes PB; 2- A hanseníase é uma doença de caráter crônico, o sistema imunológico está sempre sendo reativado pelo bacilo, o que pode ter levado a uma nova resposta inflamatória quando estimulado pelo rSm29; 3- os pacientes PB estão no polo tuberculóide da doença apresentando uma vigorosa resposta celular Th1 conservada com a liberação de mediadores pró- inflamatórios. Nesse último caso, quando co-estimuladas, as células tenderiam a reproduzir o mesmo padrão vigoroso inicial de resposta ao *M.leprae* e ainda, com a adição do antígeno rSm29 que pode na cultura imitar o que ocorre na fase inicial da infecção por *S.mansoni*, onde se observa um padrão de resposta Th1 inicial antes da migração e deposição dos ovos. Em adição, os nossos resultados de expressão gênica aumentada de *TLR2* e reduzida de *TLR4* nessa mesma condição, corrobora com esse aumento do perfil inflamatório. Já o aumento significativo das citocinas Th2 IL-4 e IL-5, podem ter ocorrido mais no contexto de modular o efeito do somatório antigênico. Interessantemente, mesmo nas culturas estimuladas apenas com o rSm29 (sem *M.leprae*) o padrão segue similar à cultura co-estimulada. Acreditamos que por serem células de pacientes com hanseníase, o fato de já estarem

primados pelo bacilo contribua para este comportamento similar. Ao apresentar o que parece ser um efeito aditivo do rSm29 ao *M. leprae sonicado*, poderíamos levantar a hipótese que poderia ter acontecido uma contaminação do antígeno rSm29 por LPS. Para afastar essa possível situação, visto que o antígeno é produzido utilizando a bactéria *E. coli*, nós adicionamos polimixina B, que tem ação bactericida, a todas culturas com rSm29. Como análise adicional, investigamos a presença de LPS por western blotting, do qual obtivemos resultado negativo

Sendo o antígeno Sm29 um indutor de IL-10, chama a atenção de que embora observando maiores concentrações desta citocina nas culturas com rSm29, essa diferença não foi estatisticamente significante em relação ao *M. leprae*. Em outros modelos de estudo com o mesmo antígeno uma não significância em relação a IL-10 já havia sido documentada (CARDOSO, et al 2016). De uma maneira geral, nossos achados nos levam a sugerir que a adição do antígeno rSm29 leva a uma resposta inflamatória que pode ajudar pacientes com hanseníase a fazer um melhor controle da infecção micobacteriana. Ainda nesse raciocínio, destacamos que o aumento de GM-CSG e G-CSF, fatores de crescimento com ação cicatricial, foi observado quando da adição do Sm29. O GM-CSF também promove a ativação de macrófagos, o que contribui para a eliminação do bacilo.

Como exposições finais, consideramos que é necessário investir mais no estudo de antígenos helmínticos na hanseníase e, principalmente, nos episódios reacionais, um grupo que não tivemos oportunidade de explorar neste trabalho. Precisamos investigar se é possível validar, no caso da hanseníase, uma doença tão espectral, crônica e insidiosa uma propriedade imunoreguladora dos antígenos helmínticos como promessa. Seria relevante trabalharmos na caracterização do perfil de ativação celular, produção de citocinas e mecanismos intracelulares decorrentes da ativação com o antígeno. Embora não tenhamos apresentado neste trabalho, possuímos os sobrenadantes de todas as culturas destes pacientes bloqueadas

para TLR2 e TLR4 e acreditamos que essa análise pode nos fornecer importantes respostas, nos ajudando a compreender melhor os dados que temos até agora. Em adição, admitimos que a estratégia de dosar marcadores em culturas estimuladas sem um estudo funcional celular conjugado, pode não ser a melhor forma inicial de esclarecer o papel do antígeno, mas este é um estudo piloto e a linha deve ter seguimento. Outro desdobramento desse projeto seria a comparação concomitante com outros antígenos helmínticos, a exemplo do SmKI, um inibidor de elastase que modula a função neutrofílica e a inflamação (Moraes SB 2018)

As principais limitações do estudo são o tamanho amostral, a não dosagem dos marcadores nas culturas bloqueadas para TLR2 e TLR4 e a falta de utilização de método laboratorial para investigar uma possível co-infecção, seja por *Schistosoma mansoni* ou outro helminto no momento da coleta, embora tenha sido realizada revisão de prontuários e anamnese. Este estudo é pioneiro em avaliar o papel do Sm29 na hanseníase. Por isso, a necessidade de estudos funcionais para identificar possíveis vias, células e seus mediadores envolvidos na interação deste antígeno em células de pacientes com a doença.

10. CONCLUSÃO

A adição do antígeno rSm29 ao *M. leprae* em cultura de pacientes com hanseníase levou ao desenvolvimento de uma resposta com características predominantemente pró-inflamatória. Essa resposta poderia ajudar pacientes com hanseníase a fazer um melhor controle da infecção micobacteriana, haja visto que esse é o tipo de resposta requerida na forma tuberculóide da doença. Entretanto, novos desdobramentos dessa pesquisa devem fornecer dados que ajudem a esclarecer melhor se há um papel regulatório deste antígeno na hanseníase.

11. REFERENCIAS

- ABEL, L.; DEMENAI, F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. **American journal of human genetics**, v. 42, n. 2, p. 256, 1988.
- ABEL, L. et al. Complex segregation analysis of leprosy in southern Vietnam. **Genetic epidemiology**, v. 12, n. 1, p. 63-82, 1995. ISSN 0741-0395.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000. ISSN 1476-4687.
- AKIRA, S. Takeda K, and Kaisho T. **Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.** **Nat Immun**, v. 2, p. 675-680, 2001.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006. ISSN 0092-8674.
- ALCAÏS, A. et al. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current opinion in immunology**, v. 17, n. 1, p. 44-48, 2005. ISSN 0952-7915.
- ALCÂNTARA-NEVES, N. M. et al. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. **BMC research notes**, v. 7, n. 1, p. 817, 2014. ISSN 1756-0500.
- ALTER, A. et al. Leprosy as a genetic disease. **Mammalian genome**, v. 22, n. 1-2, p. 19-31, 2011. ISSN 0938-8990.
- ALVARADO-ARNEZ, L. E. et al. Association of IL10 polymorphisms and leprosy: A meta-analysis. **PloS one**, v. 10, n. 9, 2015.
- ANDRADE, P. R. et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. **Expert review of clinical immunology**, v. 11, n. 3, p. 391-407, 2015. ISSN 1744-8409.
- AREESHI, M. Y. et al. Impact of TNF-308 G> A (rs1800629) gene polymorphism in modulation of leprosy risk: a reappraise meta-analysis of 14 case-control studies. **Bioscience reports**, v. 37, n. 5, p. BSR20170806, 2017. ISSN 0144-8463.
- ARTS, R. J. et al. BCG vaccination protects against experimental viral infection in humans through the induction of cytokines associated with trained immunity. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 1, p. 89-100. e5, 2018. ISSN 1931-3128.
- BAFICA, A. M. B. et al. Changes in T-cell and monocyte phenotypes in vitro by *Schistosoma mansoni* antigens in cutaneous leishmaniasis patients. **Journal of parasitology research**, v. 2012, 2012. ISSN 2090-0023.

- _____. Schistosoma mansoni antigens alter the cytokine response in vitro during cutaneous leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 856-863, 2011. ISSN 0074-0276.
- BARNES, P. et al. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 61, n. 8, p. 3482-3489, 1993. ISSN 0019-9567.
- BERRINGTON, W. R. et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 9, p. 1422-1435, 2010. ISSN 1537-6613.
- BOBOSHA, K. et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 4, p. e2773, 2014. ISSN 1935-2735.
- BOCHUD, P.-Y. et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 28, n. 9, p. 1055, 2009. ISSN 0934-9723.
- BOCHUD, P.-Y.; HAWN, T. R.; ADEREM, A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 7, p. 3451-3454, 2003. ISSN 0022-1767.
- BOCHUD, P.-Y. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 2, p. 253-261, 2008. ISSN 1537-6613.
- CARDOSO, C. C. et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 533-549, 2011. ISSN 1746-0913.
- _____. TNF-308G> A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 8, p. 1256-1263, 2011. ISSN 1537-6613.
- CARDOSO, F. et al. Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 144, n. 3, p. 382-391, 2006. ISSN 0009-9104.
- _____. Identification of a new Schistosoma mansoni membrane-bound protein through bioinformatic analysis. **Genet Mol Res**, v. 5, n. 4, p. 609-618, 2006.
- CARDOSO, L. S. et al. Schistosoma mansoni antigens modulate the allergic response in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 160, n. 2, p. 266-274, 2010. ISSN 0009-9104.

- CAVALIERE, I. A. D. L.; COSTA, S. G. Isolamento social, sociabilidades e redes sociais de cuidados. **Physis: revista de saude coletiva**, v. 21, p. 491-516, 2011. ISSN 0103-7331.
- COLE, S. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-1011, 2001. ISSN 1476-4687.
- COOPER, P. J. et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 5, p. 995-1000, 2003. ISSN 0091-6749.
- DA SILVA, S. A. et al. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. **BMC infectious diseases**, v. 9, n. 1, p. 134, 2009. ISSN 1471-2334.
- DE CARVALHO, J. C. et al. Phenotypic and functional features of innate and adaptive immunity as putative biomarkers for clinical status and leprosy reactions. **Microbial pathogenesis**, v. 125, p. 230-239, 2018. ISSN 0882-4010.
- DE SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; SIMÕES QUARESMA, J. A. Leprosy as a complex infection: breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1635, 2017. ISSN 1664-3224.
- DESSOUKEY, M. W.; EL-SHIEMY, S.; SALLAM, T. HLA and leprosy: segregation and linkage study. **International journal of dermatology**, v. 35, n. 4, p. 257-264, 1996. ISSN 0011-9059.
- DÍAZ, A.; ALLEN, J. E. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. **European journal of immunology**, v. 37, n. 12, p. 3319-3326, 2007. ISSN 0014-2980.
- ENRIGHT, R. D. et al. Distributive justice development: Cross-cultural, contextual, and longitudinal evaluations. **Child Development**, p. 1737-1751, 1984. ISSN 0009-3920.
- FABRI, M. et al. Vitamin D is required for IFN- γ -mediated antimicrobial activity of human macrophages. **Science translational medicine**, v. 3, n. 104, p. 104ra102-104ra102, 2011. ISSN 1946-6234.
- FAVA, V. M.; DALLMANN-SAUER, M.; SCHURR, E. Genetics of leprosy: today and beyond. **Human genetics**, p. 1-12, 2019. ISSN 0340-6717.
- FITNESS, J. et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 3, p. 330-340, 2004. ISSN 0002-9637.
- FOELL, D. et al. Proinflammatory S100A12 can activate human monocytes via Toll-like receptor 4. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 187, n. 12, p. 1324-1334, 2013. ISSN 1073-449X.

- FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 30, n. 3, p. 335-339, 1997. ISSN 2176-7262.
- FRANCESCHI, D. S. A. et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 493-498, 2009. ISSN 1201-9712.
- FRANCHESCHI, D. S. A. et al. Hanseníase no Mundo Moderno: O Que Sabemos Sobre a Influência Genética do Hospedeiro no seu Controle? **Arquivos de Medicina**, v. 23, n. 4, p. 159-165, 2009. ISSN 0871-3413.
- GAZZINELLI-GUIMARAES, P. H.; NUTMAN, T. B. Helminth parasites and immune regulation. **F1000Research**, v. 7, 2018.
- GELUK, A. **Correlates of immune exacerbations in leprosy**. Seminars in immunology: Elsevier, 2018. 111-118 p.
- GIBSON, A. W. et al. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. **The journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 3915-3922, 2001. ISSN 0022-1767.
- GOMES, A. O processo de Armauer Hansen. **Jornal do Conselho Regional de Medicina do Rio Grande do Sul**, p. 13, 2000.
- HAGEL, I. et al. Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. **Parasite immunology**, v. 15, n. 6, p. 311-315, 1993. ISSN 0141-9838.
- HUSSAARTS, L. et al. Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 7, p. 3027-3039, 2015. ISSN 0892-6638.
- I ARAUJO, M. et al. Immunomodulation of the allergic inflammatory response: new developments. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v. 9, n. 2, p. 73-82, 2010. ISSN 1871-5281.
- JANEWAY JR, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 1, p. 197-216, 2002. ISSN 0732-0582.
- JARDULI, L. R. et al. Role of HLA, KIR, MICA, and cytokines genes in leprosy. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. ISSN 2314-6133.
- JIMÉNEZ-DALMARONI, M. J.; GERSWHIN, M. E.; ADAMOPOULOS, I. E. The critical role of toll-like receptors—from microbial recognition to autoimmunity: a comprehensive review. **Autoimmunity reviews**, v. 15, n. 1, p. 1-8, 2016. ISSN 1568-9972.
- KAHAWITA, I. P.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 83, n. 1, p. 75-82, 2008. ISSN 0365-0596.

- KAHAWITA, I.; LOCKWOOD, D. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 4, p. 329-337, 2008. ISSN 1878-3503.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death & Differentiation**, v. 13, n. 5, p. 816-825, 2006. ISSN 1476-5403.
- _____. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011. ISSN 1074-7613.
- KLEINNIJENHUIS, J. et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 43, p. 17537-17542, 2012. ISSN 0027-8424.
- KRUTZIK, S. Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. **Activation and regulation of Toll-like receptors**, v. 2, p. 525-532,
- LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 422-435, 2010. ISSN 0074-0276. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000400012&nrm=iso >.
- LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. D. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects-part 1. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205-218, 2014. ISSN 0365-0596.
- LAYLAND, L.; LUDWIG-PORTUGALL, I. TLRs, Treg, and B Cells, an Interplay of Regulation during Helminth Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 8, 2012-February-01 2012. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00008> >.
- LEONARDI-BEE, J. et al. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 174, n. 5, p. 514-523, 2006. ISSN 1073-449X.
- LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF- β . **Annual review of immunology**, v. 16, n. 1, p. 137-161, 1998. ISSN 0732-0582.
- LI, G.-D. et al. Fine mapping of the GWAS loci identifies SLC35D1 and IL23R as potential risk genes for leprosy. **Journal of dermatological science**, v. 84, n. 3, p. 322-329, 2016. ISSN 0923-1811.
- LIMA, L. M. et al. Schistosoma antigens downregulate CXCL9 production by PBMC of HTLV-1-infected individuals. **Acta tropica**, v. 167, p. 157-162, 2017. ISSN 0001-706X.

- _____. Schistosoma antigens downmodulate the in vitro inflammatory response in individuals infected with human T cell lymphotropic virus type 1. **Neuroimmunomodulation**, v. 20, n. 4, p. 233-238, 2013. ISSN 1021-7401.
- LIU, P. T. et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D–dependent antimicrobial pathway in leprosy. **Nature medicine**, v. 18, n. 2, p. 267, 2012. ISSN 1546-170X.
- LOCKWOOD, D. N.; SAUNDERSON, P. R. Nerve damage in leprosy: a continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. **International health**, v. 4, n. 2, p. 77-85, 2012. ISSN 1876-3405.
- LOPES, D. M. et al. Dendritic cell profile induced by Schistosoma mansoni antigen in cutaneous leishmaniasis patients. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. ISSN 2314-6133.
- _____. Schistosoma mansoni rSm29 antigen induces a regulatory phenotype on dendritic cells and lymphocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 3122, 2019. ISSN 1664-3224.
- MAIZELS, R. M. Infections and allergy—helminths, hygiene and host immune regulation. **Current opinion in immunology**, v. 17, n. 6, p. 656-661, 2005. ISSN 0952-7915.
- MARSHALL, F. A.; PEARCE, E. J. Uncoupling of induced protein processing from maturation in dendritic cells exposed to a highly antigenic preparation from a helminth parasite. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 11, p. 7562-7570, 2008. ISSN 0022-1767.
- MAZINI, P. S. et al. Gene association with leprosy: a review of published data. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 658, 2016. ISSN 1664-3224.
- MCGETTRICK, A. F.; O'NEILL, L. A. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 1, p. 20-27, 2010. ISSN 0952-7915.
- MEANS, T. K. et al. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 12, p. 6748-6755, 1999. ISSN 0022-1767.
- _____. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 7, p. 3920-3927, 1999. ISSN 0022-1767.
- MEDEIROS JR, M. et al. Schistosoma mansoni infection is associated with a reduced course of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 5, p. 947-951, 2003. ISSN 0091-6749.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997. ISSN 1476-4687.

- MERLE, C. S.; CUNHA, S. S.; RODRIGUES, L. C. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. **Expert review of vaccines**, v. 9, n. 2, p. 209-222, 2010. ISSN 1476-0584.
- MIRA, M. T. et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 636-640, 2004. ISSN 1476-4687.
- MISCH, E. A. et al. Leprosy and the human genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 4, p. 589-620, 2010. ISSN 1092-2172.
- MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 828-832, 1994. ISSN 0022-202X.
- MONTENEGRO, S. M. et al. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **The Journal of infectious diseases**, v. 179, n. 6, p. 1502-1514, 1999. ISSN 1537-6613.
- MORAES, M. et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes & Immunity**, v. 5, n. 7, p. 592-595, 2004. ISSN 1476-5470.
- MORAIS, S. B. et al. Schistosoma mansoni SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 2, p. e1006870, 2018. ISSN 1553-7374.
- MORISATO, D.; ANDERSON, K. V. The spätzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. **Cell**, v. 76, n. 4, p. 677-688, 1994. ISSN 0092-8674.
- MOTTA, A. C. F. et al. Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. **Clinics**, v. 67, n. 10, p. 1145-1148, 2012. ISSN 1807-5932.
- MUKHERJEE, S.; KARMAKAR, S.; BABU, S. P. S. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 193-204, 2016. ISSN 1413-8670.
- NAAFS, B. Leprosy reactions: new knowledge. **Tropical and geographical medicine**, v. 46, n. 2, p. 80-84, 1994. ISSN 0041-3232.
- NAAZ, F. et al. Challenges beyond elimination in leprosy. **International journal of mycobacteriology**, v. 6, n. 3, p. 222, 2017. ISSN 2212-5531.
- NELWAN, M. L. Schistosomiasis: Life cycle, diagnosis, and control. **Current Therapeutic Research**, 2019. ISSN 0011-393X.
- OLIVEIRA, J. M. et al. The- 308 bp TNF gene polymorphism influences tumor necrosis factor expression in leprosy patients in Bahia state, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, p. 147-154, 2016. ISSN 1567-1348.

- OLIVEIRA, S. C. et al. A double edged sword: *Schistosoma mansoni* Sm29 regulates both Th1 and Th2 responses in inflammatory mucosal diseases. **Mucosal immunology**, v. 9, n. 6, p. 1366-1371, 2016. ISSN 1935-3456.
- OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 80, n. 3, p. 293-294, 2005. ISSN 0365-0596.
- PACÍFICO, L. G. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells independent of interleukin-10. **Infection and immunity**, v. 77, n. 1, p. 98-107, 2009. ISSN 0019-9567.
- PANDEY, S.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 1, p. a016246, 2015. ISSN 1943-0264.
- PARK, B. S.; LEE, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 12, p. e66-e66, 2013. ISSN 2092-6413.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002. ISSN 1474-1741.
- PEREIRA, A. et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. **Genes & Immunity**, v. 10, n. 2, p. 174-180, 2009. ISSN 1476-5470.
- POCATERRA, L. et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 74, n. 5, p. 868-879, 2006. ISSN 0002-9637.
- POLYCARPOU, A.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. New findings in the pathogenesis of leprosy and implications for the management of leprosy. **Current opinion in infectious diseases**, v. 26, n. 5, p. 413-419, 2013. ISSN 0951-7375.
- PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 451-459, 2007. ISSN 0365-0596.
- PROST, A.; NEBOUT, M.; ROUGEMONT, A. Lepromatous leprosy and onchocerciasis. **British medical journal**, v. 1, n. 6163, p. 589, 1979.
- RANQUE, B. et al. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. **Clinical infectious diseases**, v. 44, n. 1, p. 33-40, 2007. ISSN 1537-6591.
- RIDÉY, D.; JOPLING, W. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy**, v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966. ISSN 0148-916X.

- ROY, S. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 530-532, 1997. ISSN 1537-6613.
- SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 7, 2013.
- SALES-MARQUES, C. et al. Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005754, 2017. ISSN 1935-2735.
- SALGAME, P. et al. Evidence for functional subsets of CD4+ and CD8+ T cells in human disease: lymphokine patterns in leprosy. In: (Ed.). **Regulation and functional significance of T-cell subsets**: Karger Publishers, v.54, 1992. p.44-59.
- SAMPAIO, E. P. et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 2, p. 408-414, 1993. ISSN 1537-6613.
- SANTANA, N. D. L. et al. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017. ISSN 0074-0276.
- SANTOS, A. R. et al. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 11, p. 1687-1691, 2002. ISSN 1537-6613.
- SANTOS, N. G. L. et al. New therapeutic patents used for the treatment of leprosy: a review. **Epidemiology & Infection**, v. 146, n. 14, p. 1746-1749, 2018. ISSN 0950-2688.
- SAPKOTA, B. R. et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. **Human immunology**, v. 71, n. 10, p. 992-998, 2010. ISSN 0198-8859.
- SAUER, M. E. et al. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. **Clinics in dermatology**, v. 33, n. 1, p. 99-107, 2015. ISSN 0738-081X.
- SCHENK, M. et al. Human NOD2 recognizes structurally unique muramyl dipeptides from *Mycobacterium leprae*. **Infection and immunity**, v. 84, n. 9, p. 2429-2438, 2016. ISSN 0019-9567.
- SCHUENEMANN, V. J. et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. **Science**, v. 341, n. 6142, p. 179-183, 2013. ISSN 0036-8075.
- SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 338-381, 2006. ISSN 0893-8512.

- _____. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases**, v. 62, p. 559-559, 1994. ISSN 0148-916X.
- SCOLLARD, D. M.; TRUMAN, R. W.; EBENEZER, G. J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clinics in dermatology**, v. 33, n. 1, p. 46-54, 2015. ISSN 0738-081X.
- SHIELDS, E.; RUSSELL, D.; PERICAK-VANCE, M. A. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. **The Journal of clinical investigation**, v. 79, n. 4, p. 1139-1143, 1987. ISSN 0021-9738.
- SINGH, V. et al. Absence of nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 variants in patients with leprosy and tuberculosis. **International journal of immunogenetics**, v. 39, n. 4, p. 353-356, 2012. ISSN 1744-3121.
- SMITS, H. H.; YAZDANBAKHS, M. Chronic helminth infections modulate allergen-specific immune responses: Protection against development of allergic disorders? **Annals of medicine**, v. 39, n. 6, p. 428-439, 2007. ISSN 0785-3890.
- SOUSA, J. R. D. et al. Immunolabeling of TNF- α and TGF- β in lesions of patients in several clinical forms of leprosy by immunohistochemistry/Imunoexpressão de TNF- α e TGF- β em lesões de pacientes nas diversas formas clínicas da hanseníase por meio da técnica de imunistoquímica. **Rev Pan-Amaz Saude**, p. 45-53,
- SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 30, n. 3, p. 325-334, 1997. ISSN 2176-7262.
- SOUZA, L. et al. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose em área do sudoeste de Minas Gerais, Brasil. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 76, p. e1730, 2017.
- STEFANI, M. M. et al. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, n. 7, p. 1024-1031, 2003. ISSN 1537-6613.
- STOCKTON, J. C. et al. Polymorphism in NOD2, Crohn's disease, and susceptibility to pulmonary tuberculosis. **FEMS immunology & medical microbiology**, v. 41, n. 2, p. 157-160, 2004. ISSN 1574-695X.
- SURYADEVARA, N. C. et al. Influence of Intron II microsatellite polymorphism in human toll-like receptor 2 gene in leprosy. **Human immunology**, v. 74, n. 8, p. 1034-1040, 2013. ISSN 0198-8859.
- _____. Genetic association of G896A polymorphism of TLR4 gene in leprosy through family-based and case-control study designs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 12, p. 777-782, 2013. ISSN 1878-3503.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International immunology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005. ISSN 1460-2377.

- TAKEUCHI, O. et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 1, p. 10-14, 2002. ISSN 0022-1767.
- TAMAN, A.; EL-BESHBISHI, S. N. Laboratory diagnosis of schistosomiasis mansoni: Current status and future trends. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 12, n. 6, p. 243, 2019. ISSN 1995-7645.
- TAPPING, R. I.; TOBIAS, P. S. Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. **Journal of endotoxin research**, v. 9, n. 4, p. 264-268, 2003. ISSN 0968-0519.
- TOLEDO-PINTO, T. G. et al. Innate immunity and host metabolism in leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 806, 2018. ISSN 1664-3224.
- UNDERHILL, D. M. et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 811-815, 1999. ISSN 1476-4687.
- _____. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 25, p. 14459-14463, 1999. ISSN 0027-8424.
- VAN HOOIJ, A. et al. Application of new host biomarker profiles in quantitative point-of-care tests facilitates leprosy diagnosis in the field. **EBioMedicine**, v. 47, p. 301-308, 2019. ISSN 2352-3964.
- VAN LIEMPT, E. et al. Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. **Molecular immunology**, v. 44, n. 10, p. 2605-2615, 2007. ISSN 0161-5890.
- VIEIRA, A. P. et al. Development of type 2, but not type 1, leprosy reactions is associated with a severe reduction of circulating and in situ regulatory T-cells. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 4, p. 721-727, 2016. ISSN 0002-9637.
- WALKER, S.; LOCKWOOD, D. The clinical and immunological features of leprosy. **British medical bulletin**, v. 77, n. 1, p. 103-121, 2006. ISSN 1471-8391.
- GROUP, W. S. Chemotherapy of leprosy—Report of a WHO study group. **WHO, Technical Report Series**, v. 847, 1994.
- WONG, S. H. et al. Genomewide association study of leprosy. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 15, p. 1446, 2010. ISSN 0028-4793.

- YAN, R.; LIU, Z. LRRK2 enhances Nod1/2-mediated inflammatory cytokine production by promoting Rip2 phosphorylation. **Protein & cell**, v. 8, n. 1, p. 55-66, 2017. ISSN 1674-800X.
- YAZDANBAKHSI, M.; KREMSNER, P. van, Ree, R.(2002). **Allergy, parasites and the hygiene hypothesis. Science**, v. 296, n. 5567, p. 490-494,
- YOUNG, D. Prospects for molecular epidemiology of leprosy. **Leprosy review**, v. 74, n. 1, p. 11-17, 2003. ISSN 0305-7518.
- ZACCONE, P. et al. The *S. mansoni* glycoprotein ω -1 induces Foxp3 expression in NOD mouse CD4⁺ T cells. **European journal of immunology**, v. 41, n. 9, p. 2709-2718, 2011. ISSN 0014-2980.
- _____. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **European journal of immunology**, v. 33, n. 5, p. 1439-1449, 2003. ISSN 0014-2980.
- ZACKULAR, J. P.; CHAZIN, W. J.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: S100 proteins at the host-pathogen interface. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 31, p. 18991-18998, 2015. ISSN 0021-9258.
- ZHANG, X. et al. Meta-Analysis Identifies Major Histocompatibility Complex Loci in or Near HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-C as Associated with Leprosy in Chinese Han Population. **The Journal of investigative dermatology**, v. 139, n. 4, p. 957, 2019. ISSN 1523-1747.
- ZHONG, Y.; KINIO, A.; SALEH, M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 333, 2013. ISSN 1664-3224.
- ZODPEY, S. P. Protective effect of bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccine in the prevention of leprosy: a meta-analysis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 73, n. 2, p. 86, 2007. ISSN 0378-6323.

12. ANEXOS

ANEXO I

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do antígeno Sm29 como candidato a imunobiológico associado no tratamento de episódios reacionais da hanseníase

Pesquisador: LÉA CASTELLUCCI

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 79288017.0.0000.0049

Instituição Proponente: Hospital Universitário Prof. Edgard Santos-UFBA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.432.555

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um protocolo de desenho transversal, que busca identificar "novas estratégias terapêuticas no tratamento dos estados reacionais da hanseníase, trazendo um novo candidato na linha de imunobiológicos, um dos antígenos recombinantes do helminto *S. mansoni*, o Sm29".

Para tal, pretende-se coletar "40 mL de sangue dos indivíduos e as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) serão obtidas através do gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas para concentração de 3×10^5 células/mL. Após a separação, suspensões com 1×10^7 células serão incubadas em placas de 96 poços por 16 horas a 37°C, 5% de CO₂ na presença do antígeno de *M. leprae* e da combinação de antígenos *M. leprae* + Sm29 do *S. mansoni*.

Em seguida, as células serão marcadas com anticorpos conjugados com fluorocromos e adquiridos pelo citômetro de fluxo. Serão realizadas marcações de superfície nas células com anticorpos para os monócitos. Após a incubação, será feita marcação intracelular, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-citocinas (IL-6, IL-10, TNF e IL-1) e anti-TLRs (TLR 2 e 4) avaliadas pelos monócitos. A leitura será feita no FACSCanto (Becton Dickinson)*. Posteriormente será procedido a "

Extração de RNA e conversão em cDNA usando um kit disponível comercialmente. As amostras

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela **CEP:** 40.110-060
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-8043 **Fax:** (71)3283-8140 **E-mail:** cep.hupes@gmail.com

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA



Continuação do Protocolo: 3.433.555

serão avaliadas quanto a pureza e mantidas a - 70°C até a conversão em cDNA. A seguir, será procedida a "Análise do transcriptoma utilizando RNA-seq" que "será realizada na Central de Genômica Funcional (ESALQ-USP) em Piracicaba SP, sob a supervisão do Professor Luiz Coutinho". "O sequenciamento será feito em uma plataforma Illumina HiSeq 2500. Os dados brutos do RNA-seq serão filtrados e alinhados utilizando softwares específicos. Análise de enriquecimento de Ontologia de Gene (GO) será realizada usando o pacote topGO. O método Fisher e a taxa de descoberta falsa (FDR) será usada para ajustar o teste múltiplo. O pacote GSEA será usado para analisar o padrão de expressão diferencial entre grupos".

Os participantes serão selecionados "no Ambulatório de Dermatologia/Hanseníase do Ambulatório Magalhães Neto (AMN) e no Serviço de Imunologia do Com-HUPES. Serão incluídos pacientes de ambos os sexos, acima dos 18 anos, diagnosticados com hanseníase e reação hansênica do tipo 1 ou 2. Dos indivíduos que preencherem estes critérios de inclusão será obtido consentimento formal e uma amostra de sangue. Serão excluídos pacientes com outras doenças infecciosas, portadores de doenças autoimunes, gestantes e pacientes em terapia antireacional". Estima-se estudar 48 participantes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a capacidade imunomoduladora do antígeno Sm29 em células de pacientes com episódios reacionais do tipo 1 (RR) e 2 (ENH) na hanseníase.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar o perfil transcriptômico de células estimuladas com antígeno de *M. leprae* sozinho e co-estimuladas com o antígeno Sm29 em CMSPs de pacientes com reação hansênica do tipo I (RR) e do tipo II (ENH).

- Determinar o perfil de expressão de miRNAs reguladores da via TLR/NFkB de células estimuladas com antígeno de *M. leprae* sozinho e co-estimuladas com o antígeno Sm29 em CMSPs de pacientes com RR e ENH.

- Avaliar o efeito da estimulação pelo Sm29 na expressão dos receptores tipo Toll 2 e 4 (TLR2 e

Endereço:	Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar		
Bairro:	Camela	CEP:	40.110-000
UF:	BA	Município:	SALVADOR
Telefone:	(71)3283-8043	Fax:	(71)3283-8140
		E-mail:	cep.hupes@gmail.com

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA



Continuação do Parecer: 2.432.666

TLR4) induzidas pelo *M. leprae* nos monócitos de pacientes com RR e ENH.

- Avaliar a frequência da expressão intracelular de IL-10, IL-6, TNF e IL-1 in vitro em monócitos estimulados com *M. leprae* + Sm29 e os níveis das citocinas IFN- γ , IL-5, IL-13 e IL-17 nos sobrenadantes de culturas de CMSP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São descritos pelos pesquisadores:

Riscos:

Não há riscos potenciais pela participação do sujeito na pesquisa. A coleta de sangue pode causar um pequeno sangramento ou hematoma local e, raramente, desmaio ou mal-estar em pessoas sensíveis. Caso isso ocorra, providências imediatas serão adotadas pela equipe de pesquisa para restaurar o bem-estar do participante.

Benefícios:

Não há benefícios diretos pela participação na pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo transversal com predomínio de metodologia laboratorial, cuja participação do indivíduo corresponde ao fornecimento de 40 ml de sangue em coleta por punção periférica. O estudo prevê armazenamento de amostras durante a realização do protocolo (Biorrepositório). Os riscos descritos se devem ao procedimento de punção. Os benefícios são indiretos e, conforme revisão/racional teórico dos pesquisadores pode identificar o Sm29 como um potencial candidato a imunobiológicos para o tratamento de episódios recidivantes da hanseníase.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta Folha de Rosto, Carta de Modelo de Regulamento para Biorrepositórios, Termos de Compromisso dos pesquisadores e de uso de dados de prontuário. TCLE apresentado. Todos os documentos encontram-se assinados e datados.

Recomendações:

Recomenda-se rever o item Benefícios no arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1016233.pdf", informando que existe benefício direto.

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
Bairro: Canela CEP: 40.110-060
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3203-8043 Fax: (71)3203-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA



Continuação do Parecer: 2.432.555

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo atende o previsto nas Resoluções CNS 466/2012 e CNS 441/2011 e foi considerado, portanto, aprovado. Lembramos que o prazo de validade do Biorepósitoário pode ser de até dez anos. Se for de interesse do pesquisador principal, a extensão do prazo de validade pode ser solicitada através de emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, completamente assinado.

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ____/____/____ e ao término do estudo.

Situação: Projeto Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar			
Bairro: Canela	CEP: 40.110-060		
UF: BA	Município: SALVADOR		
Telefone: (71)3283-8043	Fax: (71)3283-8140	E-mail: cep.hupes@gmail.com	

**UFBA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO PROF.
EDGARD SANTOS DA**



Continuação do Parecer: 2.432.555

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1016233.pdf	24/10/2017 11:40:38		Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_assinada.pdf	24/10/2017 11:39:39	LÉA CASTELLUCCI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PPSUS_projetoLEA_18102017_CEP.docx	19/10/2017 09:21:32	LÉA CASTELLUCCI	Aceito
Outros	modelo_de_biorepositorio_PPSUS2017.pdf	19/10/2017 09:20:37	LÉA CASTELLUCCI	Aceito
Outros	encaminhamento_CEP.pdf	19/10/2017 09:18:13	LÉA CASTELLUCCI	Aceito
Outros	utilizacao_dados_prontuario.pdf	19/10/2017 09:17:41	LÉA CASTELLUCCI	Aceito
Outros	carta_anuencia_PPSUS_modif_assinada.pdf	19/10/2017 09:17:18	LÉA CASTELLUCCI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_pesqui_responsavel.pdf	19/10/2017 09:16:39	LÉA CASTELLUCCI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_consentimento_livre_esclarecido_PPSUS2017.pdf	19/10/2017 09:16:20	LÉA CASTELLUCCI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 12 de Dezembro de 2017

**Assinado por:
REGINA SANTOS
(Coordenador)**

Endereço: Rua Augusto Viana, s/nº - 1º Andar
 Bairro: Canela CEP: 40.110-060
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-8043 Fax: (71)3283-8140 E-mail: cep.hupes@gmail.com

Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: “Avaliação da capacidade imunomoduladora do antígeno SM29 na hanseníase e episódios reacionais”.

Pesquisador Responsável: Léa Cristina de Carvalho Castellucci

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar a capacidade imunomoduladora do antígeno SM29 nas manifestações da hanseníase. Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, que são métodos necessários para o diagnóstico da doença, você doará 40 ml de sangue para a pesquisa da influência dos genes nas manifestações da hanseníase. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico.

Duração do Estudo

A duração total do estudo é dois anos.

A sua participação no estudo será de apenas um (1) dia, ou de dois (2) dias caso o Senhor (a) durante ou após o tratamento venha a desenvolver um episódio inflamatório a que chamamos de *reações hansênicas*.

Descrição do Estudo

Participação do estudo: Aproximadamente 36 indivíduos.

Este estudo será realizado no Ambulatório de Hanseníase do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e no Hospital Couto Maia, ambos são centros de referência para o tratamento e acompanhamento da hanseníase no estado da Bahia.

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque é paciente matriculado no Ambulatório Magalhães Neto ou no Hospital Couto Maia e está em tratamento e acompanhamento por uma equipe médica. O (a) Senhor (a) não poderá participar do estudo se possuir alguma limitação física que o (a) impeça de participar como alguns tipos de doença ou gestação.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em você doará 40 ml de sangue venoso, que será coletado por profissional capacitado, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. Deste material, células e o soro serão avaliados. Este material ficará guardado em laboratório e será identificado por um código. Não será de forma alguma identificado pelo seu nome. Assim, seu material pode auxiliar o desenvolvimento desta e de outras pesquisas futuras nessa área. Como o material será coletado para fins de pesquisa, não há nenhuma influência dos procedimentos realizados no seu diagnóstico ou tratamento, não havendo, portanto, necessidade da liberação de laudo. Entretanto, se for do seu desejo, a equipe lhe fornecerá um relatório em que consta a utilização do material pelo tempo até então decorrido.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina e, em alguns casos pode provocar dor leve e sangramento ou pequeno hematoma após a retirada da agulha. Raramente podem acontecer desmaios. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados. Caso algum desses eventos ocorra você terá assistência imediata do médico e será tratado com medicamento ou procedimento adequado para cada caso, sem nenhum custo para você.

Benefícios para o participante

Não há benefícios diretos pela sua participação na pesquisa. Este estudo visa avaliar a capacidade imunomoduladora do antígeno SM29 na hanseníase e episódios reacionais. O conhecimento preciso dessa interação poderá resultar no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento da doença e principalmente dos episódios reacionais.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com você. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Se você decidir continuar nesse estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifiquem serão divulgados, a menos que seja exigido por lei. Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são Dra. Léa Castellucci e Dr. Paulo Roberto Machado que poderão ser encontrados no endereço: Rua Augusto Viana, S/N, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia, 5º andar ou nos respectivos telefones: 71-3234-7353 ou 3283-8114/8116

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: DRA. LÉA CASTELLUCCI

ENDEREÇO: Rua Augusto Viana, S/N. Hospital Universitário Professor Edgard Santos.

SALA: Serviço de Imunologia

ANDAR: 5º

HORÁRIOS DE ATENDIMENTO: SEGUNDA

A SEXTA DAS 9:00 AS 17:00HS

SALVADOR (BA) - CEP: 40110-170

FONE: (71) 3237-7353 / E-MAIL: SERVICODEIMUNO@GMAIL.COM

CEP/HUPES- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS- UFBA

SALVADOR (BA) - CEP: 4011060

FONE: (71) 3283-8043 / E-MAIL: cep.hupes@gmail.com

Declaração de Consentimento

Concordo em participar do estudo intitulado: "Avaliação da capacidade imunomoduladora do antígeno SM29 na hanseníase e episódios reacionais". Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar esse documento, não estou abdicando de nenhum dos meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização de meus registros médicos (prontuário médico) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição.

Nome do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina	Data
Assinatura do Sujeito de Pesquisa	
Nome do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina (quando aplicável)	Data
Assinatura do Representante Legal do Sujeito de Pesquisa (quando aplicável)	
Nome da pessoa obtendo o Consentimento	Data
Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento	
Nome do Pesquisador Principal	Data
Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal	

ANEXO II



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

**AValiação DA CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DO ANTÍGENO SM29 NA HANSENÍASE
E EPISÓDIOS REACIONAIS**

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-BACILOSCOPIA: 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? _____

9-CARACTERÍSTICAS DO SURTO REACIONAL TIPO 1:

- 1) Neurite: () Sim () Não
() Até 1 Nervos Periféricos () > 1 Até 3 Nervos Periféricos () > 3 Nervos Periféricos
- 2) Lesão Cutânea: () Sim () Não
Face () Tronco () MMSS () MMII () Outros ()
- 3) Outros Sintomas/Comprometimentos:
() Febre () Artrite () Edema MMII (nos Pés) () Edema MMSS (nas mãos)

10-CARACTERÍSTICAS DO SURTO REACIONAL TIPO 2:

- 1) Neurite: () Sim () Não
 () Até 1 Nervos Periféricos () > 1 Até 3 Nervos Periféricos () > 3 Nervos Periféricos
- 2) Lesão Cutânea: () Sim () Não
 Face () Tronco () MMII () MMSS () Outros ()
- Tipo: () ENH () Eritema Polimorfo
 Nº de lesões: () Até 5 () 6-10 () >10
- 3) Outros Sintomas/Comprometimentos:
 () Febre () Artrite () Edema MMII (nos Pés) () Edema MMSS (nas mãos)

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__ 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

RESPOSÁVEL PELA AVALIAÇÃO: _____
 DATA: ____/____/____



ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.

1 Aos 27 dias do mês de agosto de 2020, no horário das 09:00 horas, nas dependências do Programa de
2 Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da
3 Bahia - pela Plataforma Conferenciaweb, deu-se início à sessão pública para arguição e defesa da
4 dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOMODULADORA DO
5 ANTÍGENO RECOMBINANTE rSM29 NA HANSENÍASE" apresentada pela pós-graduanda
6 **Thailamar Silva Vieira**. A Comissão Examinadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-
7 graduação em Ciências da Saúde, conforme o que estabelecem o Regulamento Geral dos Cursos de
8 Pós-Graduação da Universidade Federal da Bahia e o Regimento do Programa de Pós-graduação em
9 Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia, foi composta por: Léa Cristina de Carvalho
10 Castellucci, Doutora em Imunologia/UFBA, Professor Pós-graduação em Ciências da Saúde/UFBA
11 (Presidente/orientador); Prof. Dra. Soraya Castro Trindade, Doutora em Imunologia/UFBA,
12 Professor titular/UEFS; Prof. Dra. Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo, Doutora em Bioquímica e
13 Imunologia/UFMG, Professora da Pós-graduação/UFBA e Prof. Lucas Pedreira de Carvalho, Doutor
14 em Patologia Humana/UFBA, Coordenador de Programa de Pós-graduação/UFBA (suplente). Após a
15 apresentação da dissertação, a Comissão Examinadora realizou a arguição que foi respondida
16 satisfatoriamente (satisfatoriamente ou insatisfatoriamente) pelo mestrando. A
17 dissertação apresentada foi considerada aprovada (aprovada ou reprovada). E, para
18 constar do processo de conclusão de curso e de colação de grau¹, a Comissão Examinadora lavrou a
19 presente Ata que é assinada por todos os seus membros. A Comissão Examinadora aprova a
20 dissertação:

21 (x) Com recomendações que devem ser incorporadas à versão final da dissertação.

22 () Sem recomendações de modificações da versão final.

23 Será dado prazo máximo de 60 (sessenta) dias para entrega da versão final de modo a ser concluído o
24 processo de outorga do título de mestre.

25 Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:

26
27

28 Léa Cristina de Carvalho Castellucci
29 _____ Léa Cristina de Carvalho Castellucci (Presidente/orientador)

30
31 Soraya Castro Trindade
32 _____ Soraya Castro Trindade

33 Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo
34 _____ Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo

35 _____ Lucas Pedreira de Carvalho (Suplente)

36
37
38

Ata Aprovada na Sessão do dia 27/08/2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Faculdade de Medicina da Bahia
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Largo do Terreiro de Jesus, s/n. Centro Histórico
40.026-010 Salvador, Bahia, Brasil.

Tel.: 55 71 3283.5582 | Fax: 55 71 3283.5567
www.possaude.ufba.br | pos.saude@ufba.br



2

-
- 1 ¹ A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica
2 do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, de quatro exemplares impressos da
3 dissertação, acompanhados de 2 versões completas em meio eletrônico (formato pdf) no prazo
4 máximo de 60 dias.