



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

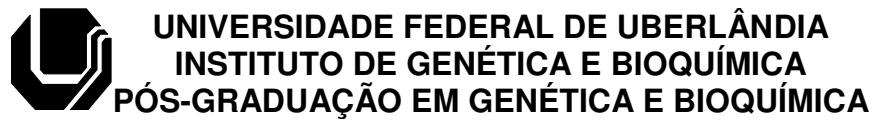
## **Resposta Imunológica na saliva aos antígenos de superfície do *M. leprae*: Implicações Clínicas**

**Aluno: André Alan Nahas**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart**

UBERLÂNDIA - MG  
2015



## **Resposta Imunológica na saliva aos antígenos de superfície do *M. leprae*: Implicações Clínicas**

**Aluno: André Alan Nahas**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**

**Co-Orientadora: Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart**

**Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética)**

**UBERLÂNDIA - MG  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

N153r Nahas, André Alan, 1973  
2015 Resposta imunológica na saliva aos抗ígenos de superfície do *M. leprae*: implicações clínicas / André Alan Nahas. - 2015.  
128 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.  
Coorientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Hanseníase - Teses. 3. Saliva - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962. II. Goulart, Isabela Maria Bernardes. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

## **Resposta Imunológica na saliva aos antígenos de superfície do *M. leprae*: Implicações Clínicas**

**ALUNO:** André Alan Nahas

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

**Examinadores:** Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino  
Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira  
Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior  
Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

**Data da Defesa:** 18 /11 /2015

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

*Dedico este trabalho a  
todos que acreditam  
que melhorar é  
possível.*

## **AGRADECIMENTOS**

“Agradeço a Deus por esta obra, por minha saúde, por minha família, por minha esposa, por meus filhos, por meus amigos e por me fazer diariamente um projeto de Pai, de Marido, de Filho, de Amigo e de Ser Humano que ainda quero ser”.

À minha família: minha admirável Mãe (Dona Lídia), Pai, Irmãos, Irmã (Ivana), Sobrinhos, Sobrinhas, Cunhadas, ao Sr. Angel e à Dona Conceição pelo valioso suporte e apoio à Talita; e a todos os amigos, pelo incentivo.

À minha esposa Talita agradeço carinhosamente por tudo, principalmente pela amiga e companheira comprometida (e apaixonante) que sempre foi.

Aos meus filhos João Bento e Felipe pelo constante incentivo e pela alegria que diariamente me proporcionam.

Ao prof. Luiz Ricardo minha imensa e sincera gratidão pelo aprendizado, por sua postura ética e profissional, pela paciência com minhas limitações e pela valiosa dedicação ao crescimento intelectual de seus alunos.

À profa. Isabela por possibilitar nosso franco acesso ao CREDESH/HC/UFU e pelo suporte na interpretação dos dados e confecção da tese.

Aos professores David, Ana Maria, Jair, Robinson, Paula e Letícia que gentilmente aceitaram fazer parte de minha banca de defesa.

Agradeço à dra. Cida, que com entusiasmo me tirou tantas dúvidas, à Dulcinéa, Rafaela, Maria Cristina, Josiela e à toda equipe do CREDESH/HC/UFU pelo exemplo de dedicação à causa da hanseníase.

Agradeço em especial aos pacientes e contatos que frequentemente contribuem e se comprometem com tantos importantes trabalhos científicos realizados no CREDESH/HC/UFU.

Às auxiliares e demais funcionários do Centro Integrado Odonto Médico (CIOM) em que trabalho, em especial à Cleonice, Julicéia e Cecília, pela torcida e incentivo.

Aos colegas de laboratório: à Mayara por ter feito meu treinamento no ELISA, e aos colegas Galber, Emília, Patrícia Terra, Patrícia Tieme, Cláudia, Jéssica, Victor, Aline, Paula, Karine, Roberta, Larissa, Bruna, Lorraine... por tantas dúvidas que me tiraram, pelo incentivo e pelo convívio sempre muito agradável.

À Luciana do Laboratório de Nanobiotecnologia/UFU por estar sempre comprometida com a gente.

À Janaina, secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU, que eficientemente nos auxilia em tudo.

A todos os professores do INGEB e, em geral, da UFU, que contribuíram para meu crescimento pessoal, intelectual e para o bom andamento deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia pelo fornecimento da infraestrutura adequada à realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos nesse trabalho.

...

*"Se vi mais longe foi  
por estar de pé sobre  
ombros de gigantes."*

*Isaac Newton*

...

*Cubra-me com seu manto de amor  
Guarda-me na paz desse olhar  
Cura-me as feridas e a dor me faz suportar*

*Que as pedras do meu caminho  
Meus pés suportem pisar  
Mesmo ferido de espinhos me ajude a passar*

*Se ficaram mágoas em mim  
Mãe tira do meu coração  
E aqueles que eu fiz sofrer peço perdão*

*Se eu curvar meu corpo na dor  
Me alivia o peso da cruz  
Interceda por mim minha mãe junto a Jesus*

*Nossa Senhora me dê a mão  
Cuida do meu coração  
Da minha vida, do meu destino*

*Nossa Senhora me dê a mão  
Cuida do meu coração  
Da minha vida, do meu destino  
Do meu caminho  
Cuida de mim (de nós)...*

Roberto Carlos/Erasmo Carlos

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	xiv
APRESENTAÇÃO .....	15
<b>CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>19</b>
1. Aspectos Gerais e Epidemiologia .....	19
2. Manifestações clínicas e Imunologia da hanseníase .....	25
3. Diagnóstico em hanseníase .....	28
4. Antígenos de superfície do <i>M. leprae</i> .....	30
5. Reações hansênicas .....	34
6. Vacina BCG e hanseníase .....	37
7. Valor diagnóstico da Saliva, Imunidade Mucosa e IgA .....	41
Referências Bibliográficas .....	44
OBJETIVOS .....	56
Objetivo Geral .....	56
Objetivos Específicos .....	56
JUSTIFICATIVA .....	57
<b>CAPÍTULO II</b>	
Análise de IgA secretória salivar anti-PGL-1 em pacientes com hanseníase e seus contatos .....	58
Resumo .....	59
Abstract .....	60
1. Introdução .....	61
2. Material e Métodos .....	64
2.1. Pacientes, Contatos Intradomiciliares e Controles Endêmicos .....	64
2.2. Apresentação dos Grupos .....	64

2.3. Dados Clínicos .....	65
2.4. Coleta da Saliva .....	67
2.5. ELISA Indireto para detecção de IgA salivar anti-PGL-1 Nativo .....	68
2.6. Índice ELISA .....	68
2.7. Análise Estatística .....	69
3. Resultados .....	69
3.1. Grupo 1 – Pacientes virgens de tratamento .....	69
3.2. Grupo 2 – Pacientes avaliados na alta da PQT .....	73
3.3. Grupo 3 – Contatos Intradomiciliares .....	76
3.4. Grupo 4 – Controles Endêmicos .....	78
4. Discussão .....	80
Referências Bibliográficas .....	86
Lista de Figuras .....	89
Lista de Tabelas .....	91
ANEXO A .....	92
ANEXO B .....	93
<b>CAPÍTULO III</b>	
IgA salivar anti-LAM em Pacientes com Hanseníase e Contatos .....	94
Resumo .....	95
Abstract .....	96
1. Introdução .....	97
2. Material e Métodos .....	102

2.1. Pacientes, Contatos Intradomiciliares e Controles Endêmicos	102
2.2. Apresentação dos Grupos .....	102
2.3. Dados Clínicos .....	103
2.4. Coleta da Saliva .....	105
2.5. ELISA Indireto para detecção de IgA salivar anti-LAM Nativo .....	106
2.6. Índice ELISA .....	106
2.7. Análise Estatística .....	107
3. Resultados .....	107
3.1. Grupo 1 – Pacientes virgens de tratamento .....	107
3.2. Grupo 2 – Pacientes avaliados na alta da PQT .....	111
3.2.1. Grupo 3 – Pacientes avaliados na alta da PQT que possuem dados de diagnóstico .....	111
3.3. Grupo 4 – Contatos Intradomiciliares .....	112
3.4. Grupo 5 – Controles Endêmicos .....	114
4. Discussão .....	115
5. Referências Bibliográficas .....	120
Lista de Figuras .....	122
Lista de Tabelas .....	123
ANEXO A .....	125
ANEXO B.....	126
RESUMO .....	127
ABSTRACT .....	128

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**°C** - Grau Célsius

**µl** - Microlitro

**BAAR** - Bacilo álcool ácido resistente

**BB** - Borderline-borderline

**BCG** - *Bacille Calmette - Guérin*

**BSA** - Soroalbumina bovina

**BL** - Borderline-lepromatosa

**BT** - Borderline-tuberculóide

**cBCG** - Cicatriz vicinal da vacina BCG

**CD** - Cotovelo direito

**CE** - Controles endêmicos

**CE** - Cotovelo esquerdo

**CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa

**cm** - Centímetros

**CO** - Classificação operacional

**CREDESH** - Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase

**D** - Diagnóstico

**D-BSA** - Dissacarídeo BSA

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**ELISA** - *Enzime Linked Immunosorbent Assay*

**ENH** - Eritema nodoso hansênico

**FC** - Forma clínica

**g** - Grama

**G2D** - Grau de incapacidade 2

**G2DR** - Grau de incapacidade 2 por 100.000 habitantes

**h** - Hora

**HC** - Hospital de Clínicas

**HI** - Hanseníase indeterminada

**HIV** - Vírus da imunodeficiência humana

**HLA-D** - Antígeno leucocitário humano D

- HSP** - *Heat shock protein*
- IB** - Índice baciloscópico
- IC** - Intervalo de confiança
- IE** - Índice ELISA
- IFN- $\gamma$**  - Interferon gama
- IgA** - Imunoglobulina A
- IgG** - Imunoglobulina G
- IgM** - Imunoglobulina M
- IL** - Interleucina
- iNOS** - Enzima óxido nítrico sintase induzível
- JD** - Joelho direito
- JE** - Joelho esquerdo
- LAM** - Lipoarabinomanana
- LD** - Lóbulo direito
- LE** - Lóbulo esquerdo
- LL** - Lepromatosa
- M. bovis** - *Mycobacterium bovis*
- M. leprae** - *Mycobacterium leprae*
- M. tuberculosis** - *Mycobacterium tuberculosis*
- MAC** - Complexo de ataque à membrana
- mAGP** - *Mycolyl arabinogalactan-peptidoglycan complexo*
- MB** - Multibacilar
- MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade
- min** – Minutos
- ml** - Mililitro
- mm** - Milímetros
- M-O-BSA** - Monossacarídeo-octil-BSA
- mRNA** - Ácido ribonucleico mensageiro
- MS** - Ministério da Saúde
- ND-O-BSA** - Dissacarídeo natural-octil-BSA
- ND-O-HSA** - Natural-octil-HSA
- NK** - Células *natural killer*
- nm** - Nanômetros

**NT-P-BSA** - Trissacarídeo natural-fenol-BSA

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OPD** - *o-phenylenediamine*

**OR** - *Odds ratio*

**p** - *p value*

**PB** - Paucibacilar

**PBS<sub>T</sub>** - *Phosphate Buffered Saline with Tween*

**PCR** - Reação em cadeia da polimerase

**PGL-1** - Glicolipídeo Fenólico 1

**pH** - Potencial Hidrogeniônico

**PQT** - Poliquimioterapia

**RNI** - Intermediários reativos do nitrogênio

**ROI** - Intermediários reativos do oxigênio

**rpm** - Rotações por minuto

**RR** - Reação reversa

**sIgA** - Imunoglobulina A secretora

**TLRs** - Receptores *Tool-like*

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa

**TT** - Tuberculóide

**UFU** - Universidade Federal de Uberlândia

## **LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

Figura 1: Mapa mundial da prevalência de hanseníase em 2013. Disponível em:  
[http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leprosy\\_2013\\_prevalence\\_rate\\_s.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leprosy_2013_prevalence_rate_s.png). Acessado: 19.10.2015.

Figura 2: Mapa mundial do número de casos novos de hanseníase em 2013.  
Disponível em:  
[http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leprosy\\_2013\\_detection\\_rates.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leprosy_2013_detection_rates.png). Acessado: 19.10.2015.

Figura 3: Estrutura química de PGL-1 do *M. leprae*. Trissacarídeo: 3,6-di-O-metila-D-glicopiranosil-(1→4)-2,3-di-O-metila- $\alpha$ -L-ramnopiranosil. Adaptado de Tabouret G *et al*, 2010.

Figura 4: Estrutura química da parede celular micobacteriana; os arranjos tridimensional e espacial das moléculas-chave são ainda desconhecidos. Pensa-se a maioria das paredes celulares micobacterianas conforme o presente modelo, com mAGP e LAM como os dois componentes principais. Extraído de Chatterjee & Khoo, 1998.

Tabela 1. Distribuição da população do Brasil, dos casos novos de hanseníase com G2D, e dos casos novos de G2D por 100.000 hab (G2DR) nos anos de 2010 e 2014.

## APRESENTAÇÃO

A hanseníase, considerada a doença mais antiga do mundo, é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um bacilo álcool ácido resistente que apresenta, em particular, uma predileção por nervos periféricos e pele. Uma das características mais impactantes dessa doença é a capacidade de gerar danos físicos em seus portadores, fato este responsável por elevado grau de estigma que ainda ocorre na população em geral. Na Grécia Antiga, o termo *estigma* se referia a um signo que era talhado ou queimado no corpo de um indivíduo considerado moralmente defeituoso e que deveria ser evitado a qualquer custo, e daí o efeito tão prejudicial deste rótulo.

O Brasil fica atrás somente da Índia em número de casos de hanseníase e, ainda, não atingiu a meta de eliminação da doença proposta para o ano 2000, de reduzir a sua prevalência global para 1 caso por 10.000 habitantes, e vem apresentando dados preocupantes associados ao aumento do número de casos novos, de casos novos com incapacidade grau 2 (G2D) e de menores de 15 anos acometidos pela doença.

A detecção precoce de casos de hanseníase e o tratamento de todos os casos com poliquimioterapia (PQT) ainda são os princípios fundamentais do controle da doença, sendo a qualidade e o alcance dos serviços básicos de saúde duas estratégias globais focadas em reduzir o impacto da hanseníase. Mas, apesar de melhora significativa no controle da doença, novos casos continuam a ocorrer em quase todos os países endêmicos e bolsões de alta carga podem existir num contexto de baixa carga. Dados epidemiológicos demonstram que a transmissão ativa está ocorrendo, mesmo com o uso da PQT como estratégia de eliminação da hanseníase. Esta transmissão pode ser causada pelo reservatório permanente de *M. leprae* em contatos infectados e pessoas com hanseníase subclínica, o que reforça a necessidade de métodos diagnósticos mais sensíveis, utilizando marcadores de exposição e risco de adoecimento.

O PGL-1 é um componente da parede celular específico do *M. leprae*, sendo encontrado em grandes quantidades em tecidos humanos infectados com a micobactéria. A molécula de LAM, outro importante antígeno de superfície do *M. leprae*, parece estar ligada firmemente à parede celular, mas não completamente. As arabinomananas de LAM têm se apresentado expostas na superfície celular e também estão diretamente ligadas à imunopatogênese da hanseníase. O anticorpo monoclonal LAM-específico reconhece a célula micobacteriana inteira em experimentos de ELISA, sugerindo que parte desta molécula está situada no exterior da célula, sendo acessível ao ambiente. Estes anticorpos vêm sendo explorados, com bastante expectativa, em testes sorológicos e salivares como possíveis indicadores de doença e como forma promissora de monitorar a poliquimioterapia utilizada no tratamento da hanseníase.

A saliva humana é um fluido oral complexo que executa várias funções fisiológicas. Em adição à importante função de manter a homeostasia do sistema da cavidade oral, o fluido oral é um importante meio a ser explorado como ferramenta predictiva de vigilância do processo saúde/doença. O valor da saliva como meio diagnóstico de doenças orais e sistêmicas tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores com o intuito de acrescentar uma possibilidade de exame complementar. As imunoglobulinas presentes na saliva são oriundas das glândulas salivares e do soro sanguíneo. A imunoglobulina A secretora (sIgA), que é derivada de plasmócitos nas glândulas salivares, é predominante e representa o principal mecanismo de resposta imune específica da saliva, apresentando-se na forma dimérica, ligada a outra proteína denominada peça secretora, que é produzida por células epiteliais. Esse componente facilita o transporte e impede a ação proteolítica sobre a IgA, tornando-a um importante mecanismo de defesa em mucosas.

A patogênese das reações hansênicas e lesão do nervo envolve tanto a imunidade mediada por células na reação tipo 1 ou reação reversa (RR) quanto a

precipitação de imunocomplexos de antígeno/anticorpos na reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansônico (ENH). Devido à associação direta das reações que lesam nervos com as incapacidades físicas, identificar pacientes que estão em risco de desenvolver reações é um desafio-chave na hanseníase. Anticorpos e citocinas presentes na resposta imune contra *M. leprae* no soro e saliva vêm sendo investigados como potenciais marcadores de exposição e risco para a ocorrência de reações hansênicas e danos à função neural.

Esta tese mostrou o comportamento de dois marcadores salivares e sua implicação em hanseníase, avaliando o comportamento da IgA salivar secretória (sIgA) contra os抗ígenos PGL-1 e LAM nos pacientes com hanseníase, no momento do diagnóstico e alta da poliquimioterapia, e em contatos intradomiciliares.

O capítulo 1 apresenta uma revisão do quadro de hanseníase abordando tópicos como: Aspectos Gerais e Epidemiologia, Manifestações clínicas e Imunologia da hanseníase, Diagnóstico em hanseníse, Antígenos de superfície do *M. leprae*, Reações hansênicas, Vacina BCG e hanseníase, Valor diagnóstico da saliva, Imunidade Mucosa e IgA.

No capítulo 2 sIgA salivar anti-PGL-1 de pacientes e contatos foi avaliada. Nos pacientes, dados foram colhidos no momento do diagnóstico, alta e os resultados foram investigados quanto à relação do Índice ELISA com o surgimento de reações hansênicas. Nos contatos foi correlacionado o resultado do teste ELISA salivar com o teste Mitsuda e a presença ou não da cicatriz da vacina BCG. Nas formas clínicas TT e TT+BT e na classificação operacional PB os resultados foram estatisticamente significantes quanto à correlação do Índice ELISA positivo e o surgimento de reações hansênicas.

No capítulo 3 avaliamos a sIgA salivar anti-LAM detectada pelo teste ELISA e apresentamos os resultados dos pacientes no momento do diagnóstico e alta, além da apresentação dos resultados dos contatos com os testes Mitsuda e vacina BCG.

Expressivas relações deste antígeno com as reações hansênicas foram observadas nos pacientes PB e, ainda, quando avaliada a variação do Índice ELISA em pacientes no momento do diagnóstico e na alta.

Assim, esta tese apresenta dois potenciais biomarcadores salivares com capacidade de serem utilizados no monitoramento de reações hansênicas.

## CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1. Aspectos Gerais e Epidemiologia

A hanseníase é uma doença infeciosa crônica, dermatoneurológica e incapacitante, que tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*)<sup>1; 2</sup>. O *M. leprae*, também definido como bacilo de Hansen, é um bacilo gram-positivo, álcool-ácido resistente (BAAR), que até hoje não é cultivável *in vitro*, sendo um parasita intracelular obrigatório atuando principalmente nas células de *Schwann*, ligando ao domínio G da cadeia de laminina- $\alpha 2$ <sup>3</sup>, e às células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos)<sup>2</sup>.

O *Mycobacterium leprae* tem o tempo de duplicação mais longo de todas as bactérias conhecidas, aproximadamente 14 dias, o que pode ser um dos motivos de frustrar todos os esforços para a cultura em laboratório. A comparação dos 3.27 Mb da seqüência do genoma isolado do bacilo do *M. leprae* derivado do tatu indiano com o do *M. tuberculosis* (4.41 Mb) revela um caso extremo de evolução redutiva. Esse processo pode ter resultado na perda de 2.000 genes com consequente comprometimento das vias metabólicas essenciais, contribuindo para que o *M. leprae* se tornasse um parasita intracelular obrigatório para garantir sua sobrevivência<sup>4</sup>.

O *M. leprae* é a única espécie de micobactéria que infecta nervos periféricos e não cresce em meios de cultura artificiais<sup>5</sup>, gerando um obstáculo na pesquisa de novos testes diagnósticos pela dificuldade na obtenção de抗ígenos naturais. O bacilo é considerado de alta infectividade, porém de baixa patogenicidade<sup>2</sup>. A infectividade pelo *M. leprae* pode resultar em danos progressivos, com padrões característicos de deficiência que incluem ulceração

da pele e deformidades nos nervos, provocando um problema de saúde pública especial devido ao fato de poder causar incapacidades permanentes, bem como por suas consequências sociais, tais como discriminação e estigma. As formas clínicas da hanseníase são definidas por padrões imunológicos, formando um amplo espectro intimamente proporcional à potencialidade de resposta do hospedeiro ao parasita<sup>1</sup>. Apesar de ser a doença mais antiga do mundo, os mecanismos imunopatológicos continuam pouco entendidos e necessitam de um esforço concentrado no sentido de esclarecer as relações entre o parasita e o hospedeiro<sup>6</sup>.

A principal via de eliminação dos bacilos dos pacientes multibacilares (MB) é a via aérea superior, sendo o trato respiratório a mais provável via de entrada do *M. leprae* no corpo<sup>7; 8</sup>. Os doentes paucibacilares (PB), com poucos bacilos, não são considerados importantes como fonte de transmissão da doença devido à baixa carga bacilar. Os pacientes MB, no entanto, constituem o grupo contagiente, assim se mantendo como fonte de infecção, enquanto o tratamento específico não for iniciado<sup>5; 9</sup>.

Entre as doenças transmissíveis a hanseníase continua sendo uma das principais causas de neuropatia periférica e incapacidades no mundo. O sucesso da poliquimioterapia (PQT), introduzida em 1981, incentivou a Assembleia Mundial da Saúde a se esforçar para eliminar a hanseníase, ou seja, reduzir a sua prevalência global para 1 caso por 10.000 habitantes até o ano de 2000<sup>10</sup>. O Brasil ainda não atingiu esta meta (Fig. 1) e ocupa o segundo lugar no mundo em casos de hanseníase, com taxa de prevalência de 1.27 casos por 10 mil habitantes, 25.738 casos na população de 202.768.562<sup>11</sup>. Porém, alguns estados apresentam taxas de prevalência bem superiores à média, como por exemplo:

Rondônia (3.07), Pará (3.12), Tocantins (4.53), Maranhão (4.26) e Mato Grosso (10.19).

Registered cases of leprosy per 10 000 population (prevalence rates), 2013

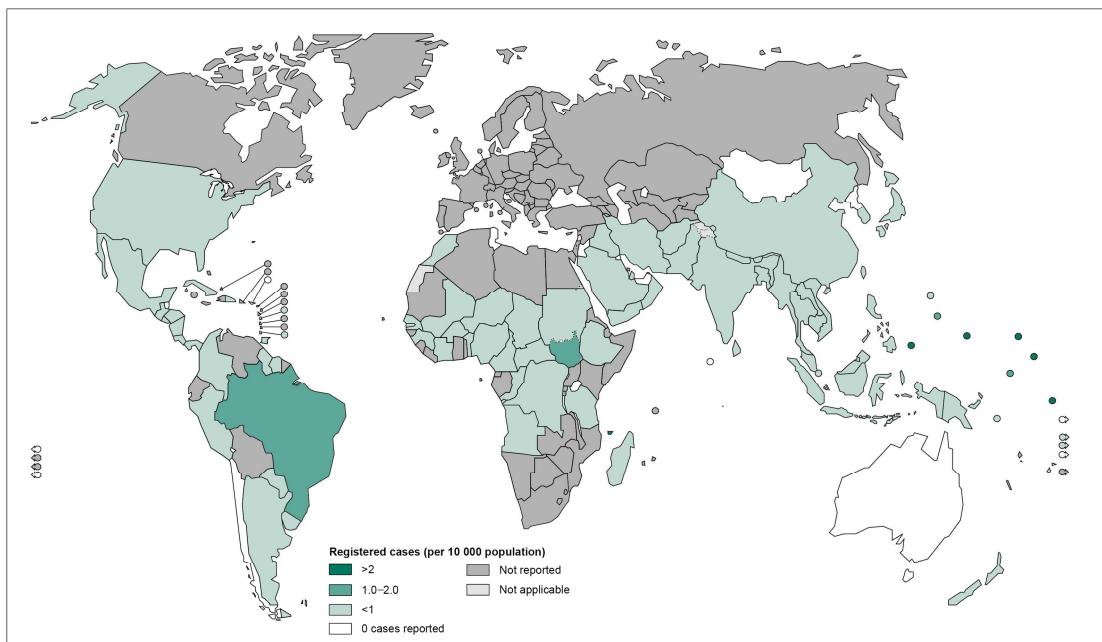


Figura 1: Mapa mundial da prevalência de hanseníase em 2013. Disponível em: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leprosy\\_2013\\_prevalence\\_rates.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leprosy_2013_prevalence_rates.png). Acessado: 19.10.2015.

O número de casos novos (Fig. 2) que apresentava redução desde 2007 voltou a subir, representando um aumento de 20 casos em relação a 2013<sup>12</sup>, sendo que dos 33.789 casos novos registrados em 2014 nas Américas, 31.064 (91.9%) foram notificados no Brasil. O coeficiente de detecção de casos novos em menores de 15 anos foi de 4.88, configurando um coeficiente de detecção muito alto. Em alguns estados esses valores são alarmantes, como: Pará (17.54), Tocantins (22.43), Maranhão (16.73) e Mato Grosso (24.05). Como a hanseníase possui um longo período de incubação (de 2 a 10 anos, algumas vezes mais)<sup>13</sup>, a detecção de casos em crianças indica exposição precoce ao bacilo. A redução de casos de hanseníase em crianças menores de 15 anos deve ser prioridade,

porque este é o principal indicador de monitoramento endêmico, sendo que casos nesta faixa etária sugerem transmissão recente com focos de infecção ativos e área altamente endêmica, revelando, ainda, uma deficiência operacional<sup>14</sup>.

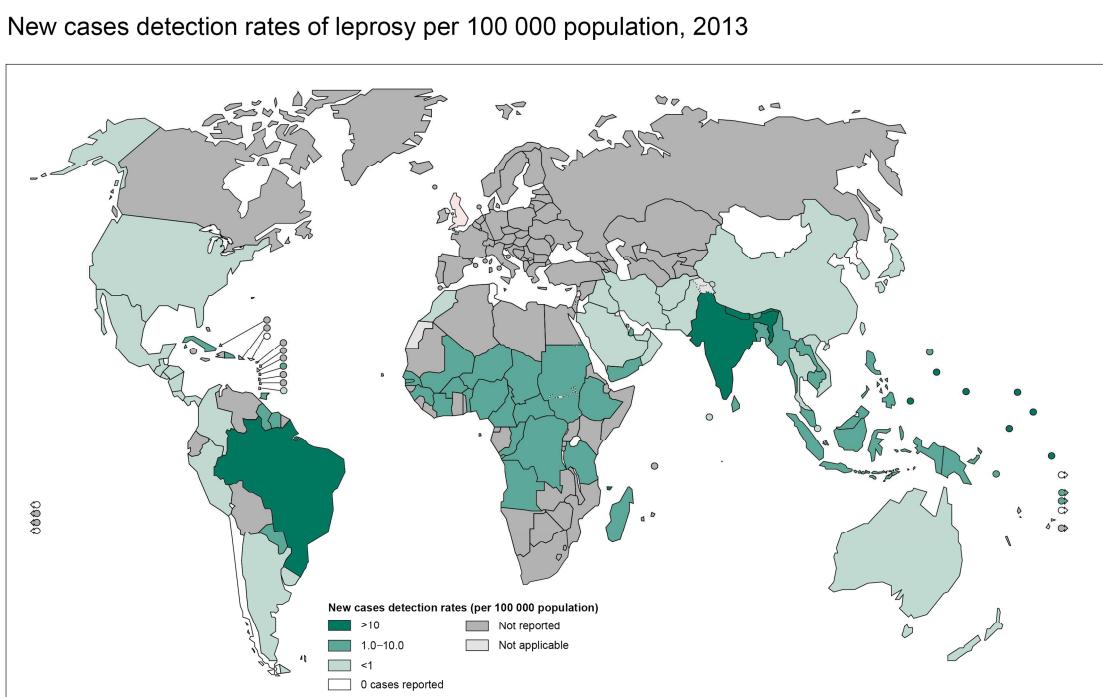


Figura 2: Mapa mundial do número de casos novos de hanseníase em 2013. Disponível em: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leprosy\\_2013\\_detection\\_rates.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leprosy_2013_detection_rates.png). Acessado: 19.10.2015.

A taxa de prevalência é muito sensível a fatores tais como a duração do tratamento e a metodologia de identificação de casos. Como resultado, indicadores alternativos como a fração de pessoas com hanseníase que têm grau de incapacidade 2 (G2D) têm sido sugeridos para monitorar os resultados das atividades de controle da hanseníase, conforme classificação pela Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>10</sup>:

## Mãos e pés:

Grau 0 - Nenhuma anestesia, nenhuma deformidade ou dano visível:

Grau 1 - Anestesia presente, mas nenhuma deformidade ou dano visível:

Grau 2 - Deformidade ou dano visível presente.

Olhos:

Grau 0 - Nenhum problema; nenhuma evidência de perda visual;

Grau 1 - Problemas oculares devido à hanseníase, mas a visão não está gravemente afetada como resultado (visão 6/60 ou melhor, podendo contar dedos a seis metros);

Grau 2 - Deficiência visual grave (visão pior do que 6/60; incapacidade de contar os dedos a seis metros); também inclui lagoftalmia, iridociclite e opacidades corneanas.

A estratégia lançada pela OMS em 2009 (“The enhanced global strategy for further reducing disease burden due to leprosy 2011–2015”)<sup>10</sup>, tem como alvo a redução do número de casos novos de hanseníase com G2D em pelo menos 35%, entre o final de 2.010 (dados de referência) e o final de 2015. A OMS espera que usando G2D como um indicador e pela concentração das intervenções em sua redução, a detecção e tratamento tardio dos pacientes também serão reduzidos, assim como o número de casos novos de hanseníase na população. Foram selecionados quatro países com hanseníase endêmica em diferentes fases da epidemia e para os quais os dados disponíveis estavam razoavelmente consistentes durante um longo período: Brasil, pois tem o maior G2DR (Grau 2 incapacidade por 100.000); China, porque tem o mais alto G2D%; Índia, pois tem a prevalência mais alta G2D; e Tailândia, porque é conhecida por ter um longo e confiável programa de prevenção à hanseníase. Estes países podem servir de modelo para outros países com perfis semelhantes<sup>10</sup>. O número de casos novos de hanseníase com G2D aumentou no Brasil com relação a 2013 (1.996 casos)<sup>15</sup>, sendo registrados 2.034 casos em 2014<sup>12</sup>.

A tabela 1 apresenta o posicionamento do Brasil em relação à meta proposta pela OMS para redução dos casos novos com G2DR. O coeficiente atingido pelo Brasil em 2010 foi 1.17, ficando então a redução de 35% estipulada até 2015 em 0.41 G2DR. O Brasil se encontra em 2014 com o G2DR de 1.00 e dificilmente conseguirá a redução para 0.76 (meta proposta) em 2015 (Tab.1).

Tabela 1. Distribuição da população do Brasil, dos casos novos de hanseníase com G2D, e dos casos novos de G2D por 100.000 hab (G2DR) nos anos de 2010 e 2014.

BRASIL	População	Casos novos G2D	G2DR
2010	190.755.799	2.241	1.17
2014	202.768.562	2.034	1.00

Fonte IBGE<sup>11; 16</sup>/WHO<sup>12; 17</sup>. Redução 35% de 1.17(G2DR/2010) = 0.41. Meta para 2015 = 0.76.

A detecção precoce de casos de hanseníase e o tratamento de todos os casos com poliquimioterapia ainda são os princípios fundamentais do controle da hanseníase, sendo a qualidade e o alcance dos serviços básicos de saúde duas estratégias globais focadas em reduzir o impacto da doença<sup>15</sup>.

Apesar de melhora no controle da hanseníase, novos casos continuam a ocorrer em quase todos os países endêmicos e bolsões de alta carga podem existir num contexto de baixa carga. Dados epidemiológicos demonstram que a transmissão ativa está ocorrendo, mesmo com o uso da PQT como estratégia de eliminação da hanseníase<sup>18</sup>. Esta transmissão pode ser causada pelo reservatório permanente de *M. leprae* em contatos infectados e pessoas com hanseníase subclínica<sup>8; 19; 20; 21</sup>, o que reforça a necessidade de métodos diagnósticos mais sensíveis, utilizando marcadores de exposição e risco de adoecimento.

## **2. Manifestações clínicas e Imunologia da hanseníase**

Em 1966, Ridley e Jopling<sup>22</sup> propuseram um espectro clínico caracterizando a hanseníase em duas formas polares e estáveis (com diferenças evolutivas, clínicas e imunológicas), e em formas intermediárias chamadas de dimorfas ou “*borderlines*”. Dentre as formas polares temos a hanseníase denominada tuberculóide (TT) e a lepromatosa (LL); e dentre as formas intermediárias estão a borderline-tuberculóide (BT), a borderline-borderline (BB) e a borderline-lepromatosa (BL)<sup>22</sup>. A hanseníase caracterizada como indeterminada (HI) é um estágio precoce e instável da doença e, dependendo da relação parasita/hospedeiro, pode migrar para uma das formas definitivas ou, ainda, caminhar para cura espontânea<sup>23; 24</sup>.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1982 estabeleceu uma classificação operacional que direciona o regime de tratamento a ser empregado, na qual os pacientes são divididos em paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB). Essa classificação é baseada no número de lesões cutâneas, de modo que os pacientes com até cinco lesões de pele são classificados como paucibacilares, e aqueles com mais de cinco lesões como multibacilares<sup>5</sup>. Objetivando tornar o tratamento mais eficiente, todos os casos com bacilosscopia positiva são classificados como multibacilares<sup>25</sup>. A OMS passou a recomendar também o tratamento de todos os pacientes com poliquimioterapia<sup>26; 27</sup>. Atualmente, recomenda-se o regime de tratamento por 6 meses com rifampicina e dapsona para pacientes paucibacilares (PB), enquanto os multibacilares devem ser tratados por 12 meses com rifampicina, dapsona e clofazimina<sup>28</sup>.

A hanseníase é uma doença considerada espectral, na qual as manifestações clínicas correlacionam-se com a resposta imune do hospedeiro ao patógeno. Em um polo encontram-se os pacientes com hanseníase TT que apresentam forte resposta imune celular, com formação de granulomas, restrição da infecção e eliminação do parasita, apresentando uma resposta típica de resistência e controle do crescimento do patógeno. Em oposição, pacientes LL representam o extremo suscetível à infecção pelo *M. leprae*, caracterizado por tolerância imunológica com disseminação do bacilo<sup>22</sup>. Essas apresentações clínicas correlacionam-se com o grau de imunidade mediada por células<sup>29</sup>.

A primeira barreira à infecção com *M. leprae* é a imunidade inata, representada pela integridade do epitélio, secreções, e a imunoglobulina de superfície A (IgA). Além disso, as células *natural killer* (NK), linfócitos T citotóxicos e macrófagos ativados podem destruir bacilos, independentemente da ativação da imunidade adaptativa<sup>14</sup>. Os receptores *Toll-like* (TLRs) são essenciais para o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas durante a resposta da imunidade inata. Os receptores TLRs, especialmente o TLR-2, são ativados por lipoproteínas do *M. leprae*, e a capacidade de iniciar a resposta protetora está diretamente relacionada com a secreção de IL-12/23 e a diferenciação de macrófagos e células dendríticas<sup>30</sup>. Estas últimas apresentando o antígeno promovem a ativação de células T naïves e o aumento da secreção de IL-12. Esse processo leva à expansão e diferenciação de células Th1 produtoras de interferon (IFN-γ), que induzem os elementos da resposta imune responsáveis pela eliminação do bacilo, controlando assim a evolução da doença<sup>30; 31</sup>.

A avaliação da resposta humoral em pacientes LL e BL evidencia altos títulos de anticorpos específicos contra o glicolipídeo fenólico 1 (PGL-1),

componente da parede celular do *M. leprae*, refletindo uma acentuada carga bacilar nesses pacientes. Nas formas tuberculóides os níveis desse anticorpo apresentam-se semelhantes aos dos controles normais<sup>2; 32</sup>. Apesar da produção aumentada de anticorpos específicos nas formas multibacilares, esta é ineficaz para a eliminação dos bacilos de Hansen (*M. leprae*). A defesa é efetuada pela resposta imunológica celular, capaz de fagocitar e destruir os bacilos, mediada por citocinas e mediadores da oxidação como os intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), fundamentais na destruição bacilar no interior dos macrófagos<sup>32</sup>.

Nas lesões tuberculóides há predominância de células T auxiliares CD4+ e citocinas da resposta Th1, como interleucina 12 (IL-12), interferon gama (IFN-  $\gamma$ ), IL-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-2. Em contraste, nas lesões lepromatosas o predomínio é de células T supressoras, CD8+ e citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10. A citocina IL-12 estimula diretamente células NK (*Natural Killer*), que passam a produzir IFN- $\gamma$ , o qual estimula o macrófago. IFN- $\gamma$  associado à ação de TNF- $\alpha$  atuam incrementando a ativação macrofágica. Ao contrário, as citocinas Th2, juntamente com a citocina TGF- $\beta$ -1, são supressoras da atividade Th1<sup>24; 32; 33</sup>.

A classificação de células T helper tipo 1 (Th1) ou tipo 2 (Th2) produzidas em resposta ao *M. leprae* é baseada na produção exclusiva ou predominante de IFN- $\gamma$  ou IL-4, respectivamente. O perfil de secreção restrita de citocinas pode não refletir o complexo papel regulatório das células T *in vivo*<sup>34</sup>. Portanto, dependendo da subpopulação de células T e da atividade macrofágica, haverá predominância de mecanismos de defesa ou de disseminação da doença, expressos

clnicamente pelas formas tuberculóide e lepromatosa, respectivamente. A produção dos antígenos PGL-1 e lipoarabinomanana (LAM) pelo bacilo no interior do macrófago favorece o escape à oxidação intramacrofágica, ficando favorecida a disseminação do bacilo<sup>24</sup>.

### **3. Diagnóstico em hanseníase**

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico, realizado por meio da análise da história e condições de vida do paciente e do exame dermatoneurológico, para identificar lesões ou áreas da pele com alteração de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos sensitivo, motor e/ou autonômico<sup>35</sup>. O exame clínico dermatoneurológico e a baciloscopy, ainda, são considerados o padrão ouro de diagnóstico em hanseníase. Os exames complementares têm papel auxiliar na caracterização da extensão e gravidade do acometimento cutâneo e neurológico, e ainda para classificação do paciente. Os exames complementares mais amplamente utilizados são: baciloscopy, histopatológico, intradermorreação de Mitsuda e testes sorológicos.

A baciloscopy é realizada para determinar a carga bacilar presente nos esfregaços dérmicos do paciente, retirados dos lóbulos das orelhas (LD e LE), cotovelos (CD e CE), joelhos (JD e JE) e uma das lesões, com resultados descritos como Índice Baciloscópico (IB) de acordo com a Escala Logarítmica de Ridley<sup>36</sup>, que varia de IB=0 a IB=6.

No exame histopatológico são necessários no mínimo 100.000 bacilos por grama de tecido para que a detecção pela coloração de BAAR seja confiável<sup>37</sup>. Este exame apresenta baixa sensibilidade, principalmente em pacientes com

características tuberculóides da doença, na qual os bacilos são raros ou ausentes<sup>38</sup>.

A intradermorreação de Mitsuda indica o grau de imunidade celular do paciente contra o *M. leprae*. Não é um teste diagnóstico, já que pode ser positivo em indivíduos sem doença que tiveram contato com pacientes com hanseníase e negativo em pacientes LL que possuem baixo grau de imunidade celular<sup>24</sup>. A inoculação intradérmica de suspensão de bacilos mortos pelo calor resulta, após 3 ou 4 semanas, em reação positiva com formação de pápula infiltrada (forma TT) ou reação negativa com ausência de alteração cutânea (forma LL). O resultado desta reação associado à carga bacilar (baciloscopia) pode assinalar a potencialidade de resposta imune celular do paciente<sup>2</sup>.

Exames sorológicos têm sido usados para auxiliar no diagnóstico e na classificação dos pacientes e sugeridos no acompanhamento pós-tratamento. Estão disponíveis testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos contra lipoarabinomana, PGL-1 e antígenos proteicos do *M. leprae*<sup>39; 40</sup>, sendo que o teste mais amplamente usado é o ELISA anti-PGL-1. Vários estudos encontraram uma correlação entre níveis de anticorpos detectados por ELISA e índices bacterianos (IB), justificando estudos utilizando a sorologia como ferramenta auxiliar na classificação dos pacientes<sup>41</sup>.

A imunidade humoral apresenta-se mais evidente nos pacientes LL e BL, sendo que os pacientes mais próximos ao polo TT apresentam respostas ausentes ou com baixa intensidade. Assim, os testes sorológicos possuem baixa sensibilidade em pacientes PB, que muitas vezes têm respostas indetectáveis<sup>39</sup>. Os exames sorológicos normalmente apresentam correlação positiva com a baciloscopia e costumam ser positivos nos pacientes MB. Pacientes MB com

ELISA sorológico anti-PGL1 positivo apresentam maiores riscos de desenvolvimento de incapacidades neurológicas<sup>42</sup>.

Em estudo que avaliou anticorpos no soro de pacientes MB, foi observado que os níveis de anticorpos IgM e IgG anti-PGL-1 no soro foram mais baixos em pacientes com hanseníase BT e mais altos em pacientes LL; que os níveis de anticorpos IgM anti-PGL-1 foram elevados em pacientes com lesões mistas (pele e comprometimento da função neural); que o comprometimento da função nervosa sensorial diagnosticada há mais de seis meses está associado com elevação significativa de anticorpos IgG anti-PGL-1. Foi relatado, ainda, que os níveis de todos os anticorpos testados e TNF $\alpha$  foram mais baixos em pacientes que apresentaram somente reação na pele. Um padrão de associações entre os marcadores e danos nos nervos foi apresentado, sendo sugerido que a associação de múltiplos marcadores em lesões mais antigas (mais que 6 meses) poderia apresentar quadros distintos de alterações nos nervos<sup>40</sup>.

#### **4. Antígenos de superfície do *M. leprae***

A descoberta e elucidação da estrutura química do glicolipídeo específico do *Mycobacterium leprae* em 1981<sup>43</sup>, e o achado de que era antigênico em 1982<sup>44</sup>, foram grandes inovações na pesquisa em hanseníase. O PGL-1 tem sido usado em muitos estudos mostrando que pacientes LL formam grandes quantidades de imunoglobulinas do tipo IgM reagindo contra este antígeno, enquanto pacientes TT apresentam imunoglobulinas específicas em níveis baixos de detecção<sup>41</sup>.

O PGL-1 é um componente da parede celular específico do *M. leprae*, sendo encontrado em grandes quantidades em tecidos humanos infectados com

a micobactéria<sup>45</sup>. Sua estrutura é composta de um trissacarídeo (principal determinante antigênico) e por uma extremidade lipofílica (Fig. 3). Este antígeno não apresenta reação cruzada com *M. tuberculosis* ou outras micobactérias, sendo único para *M. leprae*. A elucidação da estrutura química do glicolipídeo PGL-1, específico do *M. leprae*<sup>43; 46</sup>, e a comprovação da sua antigenicidade<sup>44</sup> possibilitaram grandes inovações na pesquisa em hanseníase<sup>41</sup>, uma vez que esse componente antigênico tem sido explorado no soro diagnóstico por ELISA e ML-Flow<sup>47; 48; 49</sup>.

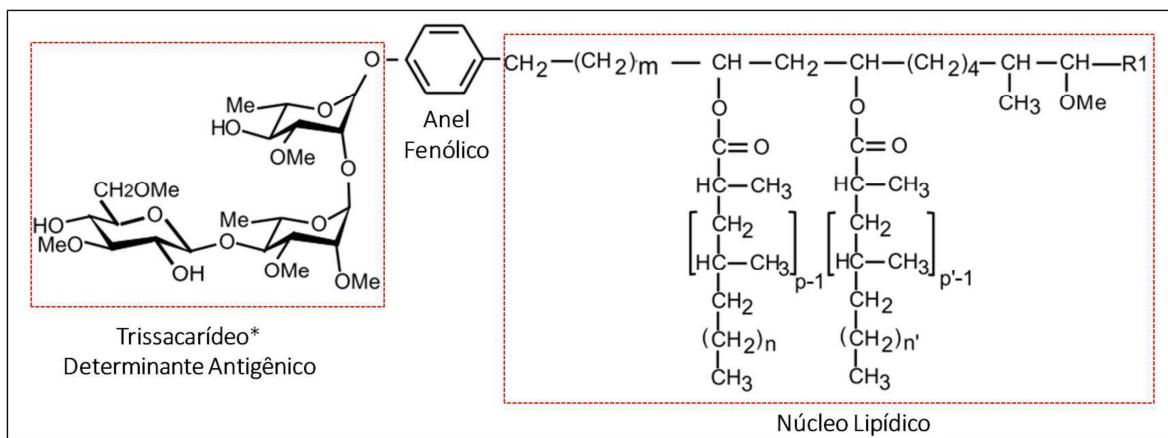


Figura 3: Estrutura química de PGL-1 do *M. leprae*. Trissacarídeo: 3,6-di-O-metila-D-glicopiranosil-(1→4)-2,3-di-O-metila- $\alpha$ -L-ramnopiranosil. Adaptado de Tabouret G et al, 2010<sup>50</sup>.

O PGL-1 tem sido utilizado em ensaios de ELISA e também no teste ML-Flow, um teste imunocromatográfico simples que pode ser executado sem equipamentos e fora de laboratórios<sup>51; 52</sup>.

Devido à limitação da obtenção da molécula nativa do PGL-1, restrita ao crescimento de *M. leprae* em tatus<sup>53</sup> e camundongos<sup>54</sup>, como alternativa têm sido produzidas moléculas sintéticas, tais como: monossacarídeo-octil-BSA (M-O-

BSA); dissacarídeo-BSA (D-BSA)<sup>55</sup>; dissacarídeo natural-octil-BSA e natural-octil-HSA (ND-O-BSA e ND-O-HSA)<sup>56</sup>; e trissacarídeo natural-fenol-BSA (NT-P-BSA)<sup>57</sup>.

As arabinomananas de LAM têm demonstrado ser expostas na superfície celular e também estão diretamente ligadas à imunopatogênese da hanseníase e tuberculose<sup>58</sup>. A molécula de LAM parece estar ligada firmemente à parede celular, mas não completamente. O anticorpo monoclonal de LAM reconhece a célula micobacteriana inteira em experimentos de ELISA, sugerindo que parte desta molécula está situada no exterior da célula, sendo acessível ao ambiente<sup>59</sup>. A essência da parede celular micobacteriana é a mycolyl arabinogalactan-peptidoglycan complexo (mAGP) e a lipoarabinomanana associado (LAM) (Fig. 4). A mAGP constitui o núcleo subjacente da parede, ao passo que o LAM tem demonstrado exercer profundos efeitos fisiológicos<sup>60</sup>. Além disso, o LAM tem demonstrado ser exposto na superfície da parede celular e estar diretamente implicado na imunopatogênese da hanseníase e da tuberculose<sup>58</sup>.

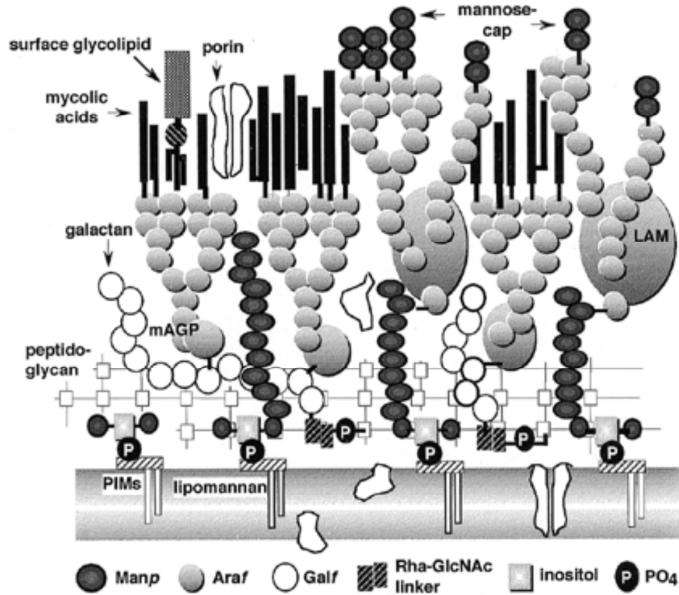


Figura 4: Estrutura química da parede celular micobacteriana; os arranjos tridimensional e espacial das moléculas-chave são ainda desconhecidos. Pensa-se a maioria das paredes celulares micobacterianas conforme o presente modelo, com mAGP e LAM como os dois componentes principais. Extraído de Chatterjee & Khoo, 1998<sup>60</sup>.

O LAM vem sendo implicado como alvo do ataque do sistema complemento. O complexo de ataque à membrana (MAC) co-localizado com LAM em axônios vem apontando para o papel deste antígeno na ativação do complemento e dano neural em pacientes com hanseníase<sup>61</sup>.

Muitos抗ígenos da parede do *M. leprae* pertencem à família das proteínas de choque térmico (HSP), como HSP10 e HSP60 análogas em estrutura e função a GroEL e GroES de *Escherichia coli*, respectivamente<sup>62</sup>. As HSPs microbianas, produzidas em condições de estresse, são alvos antigênicos dominantes para imunidade celular<sup>63</sup>. Alguns trabalhos têm demonstrado a produção de IgG em pacientes com hanseníase, especialmente os multibacilares, em resposta a essas proteínas<sup>64; 65</sup>, demonstrando o potencial das mesmas no diagnóstico sorológico da hanseníase.

## **5. Reações hansênicas**

Apesar da poliquimioterapia eficaz, a hanseníase ainda é endêmica em várias partes do mundo, especialmente no Brasil e na Índia. A maioria da população infectada permanece saudável, enquanto que um subconjunto dos indivíduos infectados desenvolve sintomas clínicos, que estão associados com a imunidade do hospedeiro ao bacilo<sup>61</sup>. A hanseníase é uma doença que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos, levando à perda de funções sensoriais, motoras e autônomas. Dificuldades persistem na conduta clínica, tratamento e monitoramento das reações hansênicas, que podem gerar danos aos nervos<sup>66; 67</sup>.

As reações hansênicas podem ser definidas como manifestações clínicas resultantes de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o agente infectante *M. leprae*. Esses episódios agudos, que afetam principalmente pele e nervos, são a principal causa de morbidade e incapacidade da função do nervo periférico<sup>2</sup>.

As reações hansênicas podem ocorrer antes, durante e após o tratamento PQT e são classificadas como do tipo 1 ou tipo 2<sup>68</sup>. A reação tipo 1, ou reação reversa (RR), está associada com a imunidade mediada por células, resposta padrão Th1, caracterizada por expansão granuloma, edema, recrutamento de linfócitos CD4+, um aumento da interleucina-2 (IL-2) e expressão do antígeno leucocitário humano D (HLA-D) em células do infiltrado celular. A reação do tipo 1 também é caracterizada pela presença de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e de interferon-gama (IFN- γ), que são importantes para a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no citoplasma dos macrófagos, determinando uma atividade eficaz<sup>2</sup>.

A reação tipo 2 ou reação tipo *eritema nodosum leprosum* (ENL) é uma reação de hipersensibilidade sistêmica que se assemelha à reação tipo III da classificação de Coombs e Gell e está associada à deposição de complexos imunes nos tecidos, que é reforçada pelo aumento da pressão arterial e da permeabilidade vascular. A ENL também está relacionada com níveis elevados de TNF- $\alpha$ , infiltração de neutrófilos, ativação do sistema do complemento (promovendo vários órgãos), e níveis elevados de IL-6, IL-8 e IL-10 (expressão de RNA mensageiro), que caracterizam uma resposta tipo Th2, isto é, imunidade humoral<sup>69</sup>.

A presença de infecções (bacterianas, fúngicas ou virais), o uso de iodeto, brometo, oxacloxacina, medicação baseada em dapsona ou rifampicina, alterações hormonais, gravidez, pós-parto, amamentação, uso de álcool, trauma, vacinação, estresse físico e procedimentos cirúrgicos têm sido mencionados como fatores de risco para as reações hansênicas<sup>70</sup>. As infecções orais também têm sido sugeridas como fatores de risco para a ocorrência de reações, como indicado por uma redução observada nas taxas de reações após o estabelecimento de um tratamento dentário<sup>8; 71</sup>. Após o tratamento (PQT), títulos elevados de anticorpos IgM anti-PGL-1 têm sido identificados como um relevante marcador para reação pós alta. Brito et al, em 2008, utilizando ML Flow anti-PGL-1 em MB, apresentaram uma soropositividade após a poliquimioterapia correspondente a uma probabilidade de 10.4 vezes maior de desenvolver reação, quando comparada com pacientes de resultados negativos<sup>72</sup>.

A lesão do nervo na hanseníase é estudada quase que exclusivamente em fases tardias da doença, já que raros estudos publicados descrevem mudanças no nervo nas fases iniciais da doença. No entanto, a afinidade natural do *M.*

*leprae* para nervo, particularmente para as *células de Schwann*<sup>3</sup>, faz com que seja provável que o dano do nervo comece em uma fase muito precoce da infecção<sup>61</sup>. Contudo, os mecanismos do dano ao nervo subjacente no início da doença continuam a ser elucidados. Compreender os mecanismos moleculares e imunológicos da lesão no nervo induzida por *M. leprae* é um passo necessário no tratamento da hanseníase para prevenir a progressão da infecção para uma extensa condição neuropática<sup>61</sup>.

O sistema complemento é um componente chave do sistema de defesa do hospedeiro contra patógenos, mas sua ativação excessiva ou descontrolada pode causar dano ao hospedeiro. A ativação do complemento pode ocorrer via reconhecimento do complexo antígeno-anticorpo (via clássica), de superfícies estranhas (via alternativa) ou açúcar bacterianos (via das lectinas). Independentemente do gatilho, a ativação resulta na clivagem de C3, seguida por clivagem de C5 e formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que perfura buracos através da membrana celular, resultando na lise da célula alvo. Como os componentes do complemento ativados são solúveis e podem expandir seu local de atuação para áreas adjacentes, o MAC pode danificar os tecidos saudáveis adjacentes e aumentar a inflamação<sup>61</sup>.

Após lesão traumática de nervos periféricos em ratos, a formação do MAC contribui para início da perda de proteínas da mielina e ao dano axonal, enquanto a inibição da formação do MAC reduz o dano ao nervo e melhora a regeneração e recuperação funcional<sup>73</sup>.

A participação do MAC causando danos aos nervos acometidos pelo *M. leprae* e seus componentes tem sido evidenciada em ratos, nos quais injeções intraneurais de *M. leprae* sonicado induziram a deposição de MAC e alterações

patológicas no nervo, enquanto que a inibição do MAC preservou mielina e axônios<sup>73</sup>. Em estudo em humanos utilizando biópsias de pacientes com hanseníase o grau de imunoreatividade de LAM e MAC foi robusto e significativamente mais alto em multibacilares comparado aos doadores paucibacilares, sendo a associação entre LAM e MAC altamente significante nas amostras de doentes e negativas nos controles saudáveis. O MAC co-localizado com LAM em axônios vem apontando para o papel deste antígeno do *M. leprae* na ativação do complemento e dano neural em pacientes com hanseníase<sup>61</sup>.

De forma geral estudos têm mostrado que hanseníase do tipo multibacilar, o aumento da idade e a presença de dano no nervo no momento do diagnóstico da hanseníase são fatores de risco para o desenvolvimento de dano ao nervo adicional. Porém, poucos estudos têm focado em parâmetros laboratoriais como fator de risco<sup>40</sup>. Neste contexto, marcadores prognósticos para o desenvolvimento de reações hansênicas poderiam complementar dados de exames clínicos e estabelecer grupos de risco para o surgimento de incapacidades, proporcionando para estes indivíduos diagnósticos precoces e pronto atendimento quimioterápico, evitando danos neurais severos.

## 6. Vacina BCG e hanseníase

A vacina BCG foi desenvolvida entre 1908 e 1921 por Albert Calmette e Camille Guérin na França por cultura de *Mycobacterium bovis* em meio contendo bile. Com apenas alguns ciclos de cultura (passagens), a bactéria mostrou diminuição de virulência em animais experimentais. Depois de 230 passagens ao longo de um período de 13 anos a cepa BCG foi ainda mais atenuada, mas

oferecendo, ainda, proteção contra o desafio letal do *Mycobacterium tuberculosis* em bezerros e porquinhos da Índia. A sua primeira utilização em seres humanos foi na França em 1921, sendo, então, as cepas filhas distribuídas ao redor do mundo para utilização na fabricação da vacina. Como resultado de repetidas passagens sob condições diferentes em diferentes laboratórios em todo o mundo, as cepas da vacina BCG divergiram geneticamente. Há evidências de que polimorfismos de nucleotídeo único, duplicações e eliminações continuaram a surgir até que a liofilização foi introduzida na década de 1960 para armazenar lotes de sementes secas-congeladas para a produção de vacinas<sup>74</sup>.

Ambos os dados em animais e humanos apóiam o papel-chave de células T CD4 no controle de *M. tuberculosis* após a infecção. Maior morbidade e mortalidade em ratos com redução de células CD4 confirmam o papel fundamental deste subconjunto de células T<sup>75; 76; 77</sup>. O ressurgimento da tuberculose associado à epidemia de HIV também demonstra que a perda de células T CD4 aumenta a susceptibilidade à tuberculose<sup>78</sup>. Acredita-se que a função efetora principal de células T CD4 seja uma resposta T helper Tipo 1 (Th1), envolvendo a produção de IFN-γ e IL-2, que conduz à ativação de macrófagos. Vários estudos demonstraram que o IFN-γ produzido pelas células T CD4 é de grande importância para a proteção contra tuberculose em ratos<sup>79; 80</sup>. Do mesmo modo, nos seres humanos, a deficiência de receptor de IFN-γ está associada com o aumento da susceptibilidade à infecção micobacteriana<sup>79</sup>. Evidências acumuladas têm levado ao conceito de que uma resposta imune dominada por Th1, refletida pela liberação de IFN-γ por células T CD4, após a estimulação com antígenos de *M. tuberculosis*, fornece o melhor correlato de imunidade protetora induzida pela vacina BCG atualmente disponível. Contudo, a

correlação entre produção de IFN- $\gamma$  e proteção pode não ser linear, potencialmente, pois uma vez que determinado limite é atingido, níveis mais elevados de citocinas podem não ter nenhum benefício adicional<sup>74</sup>.

O *Mycobacterium tuberculosis* induz a apoptose em macrófagos infectados, o que leva à liberação de vesículas contendo antígenos de tuberculose. Estas vesículas são englobadas pelas células dendríticas, que apresentam, em seguida, o antígeno em conjunto com o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I, que conduz à ativação de células T CD8. O papel das células T CD8 é suportado por experiências em ratos, MHC I deficientes, em que ocorre redução da sobrevivência após infecção por *M. tuberculosis*<sup>81</sup>. Imunização prévia desses ratos com BCG prolonga sua sobrevivência, mas não os protege da morte, destacando o requisito de células CD8 em imunidade protetora<sup>81</sup>. O mecanismo efetor das células T CD8 não é completamente compreendido, mas não é explicado pela atividade citolítica sozinho. A contribuição relativa de CD8 células T para proteção é de difícil avaliação como o resultado da sobreposição de função e interação com as células T CD4. Há evidências, no entanto, que as células T CD4 são mais importantes na infecção aguda, enquanto que as células T CD8 são responsáveis pela contenção da infecção latente<sup>82</sup>. A resposta específica das células T CD8 após imunização com BCG em recém-nascidos só recentemente foi investigada e verificou-se ser citotóxica, ou de liberação de citocinas ou, com menos frequência, ambas. Uma das mais recentes vias descritas para a ativação de células T CD8 em infecção por *M. tuberculosis* é a apresentação cruzada de抗ígenos<sup>83</sup>.

Resposta imune Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13, pode modular suposta resposta imune Th1 protetora contra a tuberculose. Tem

sido especulado que a doença progressiva tuberculose pode não ser devido à ausência de uma resposta Th1, mas devido ao efeito subversivo de IL-4 suprimir a resposta de Th1. Células T produtoras de IL-4 e mRNA de IL-4 são aumentadas em tuberculose pulmonar e correlacionadas com extensão da cavitação pulmonar. Isto sugere que o balanço das respostas de Th1 / Th2 é um fator importante na imunidade protetora contra tuberculose<sup>84;74</sup>.

Em suínos de idades precoces células T  $\gamma\delta$  (gama delta) são funcionalmente aumentadas, juntamente com a produção de IFN- $\gamma$ , após vacina BCG, sugerindo um importante papel para este subconjunto de células T na imunidade adquirida conferida por vacinação *M. bovis* BCG<sup>85</sup>.

Em estudo avaliando抗ígenos micobacterianos e sua capacidade de induzir respostas imunológicas após a vacinação com BCG foi relatado que entre os grupos: sem vacinação (grupo controle vacinado em outro momento); após vacinação com BCG (grupo saudável que recebeu vacinação intradérmica), e pacientes com tuberculose ativa (grupo de doentes), as respostas de IgG reativas ao LAM foram significativamente aumentadas entre os grupos vacinados com BCG e com tuberculose ativa em tratamento. O grupo vacinado com BCG, com duas doses orais, foi acompanhado por 6 meses e apresentou reatividade frente ao LAM significativamente maior pela IgA secretora em amostras colhidas em lágrimas e secreção da parótida após a vacinação, principalmente aos 42 dias após a segunda dose, que correspondeu à 30<sup>a</sup> semana do estudo<sup>86</sup>. LAM é um dos imunógenos dominantes do bacilo de Hansen, reagindo prontamente com anticorpos de pacientes com hanseníase lepromatosa<sup>87</sup>.

## **7. Valor diagnóstico da Saliva, Imunidade Mucosa e IgA**

A saliva humana é um fluido biológico claro, ligeiramente ácido (pH = 6.0-7.0), contendo uma mistura de secreções de várias glândulas salivares, incluindo a parótida, submandibular, sublingual e outras glândulas menores distribuídas na mucosa oral. Este fluido oral desempenha várias funções fisiológicas tais como digestão, deglutição de alimentos e degustação, a lubrificação dos tecidos, a manutenção da integridade dos dentes, proteção antibacteriana e antiviral. Além disso, a saliva tem a importante função de manter a homeostasia do sistema da cavidade oral e pode ser explorado para vigilância da saúde e da doença<sup>88</sup>.

O valor da saliva como meio diagnóstico de doenças orais e sistêmicas tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores com o intuito de acrescentar uma possibilidade de exame complementar. A análise da saliva, bem como a análise do sangue, tem duas finalidades: a primeira é identificar indivíduos com doença (diagnóstico), e a segunda acompanhar o progresso do indivíduo afetado (monitoramento), avaliando inclusive a efetividade do tratamento empregado<sup>89</sup>.

As imunoglobulinas presentes na saliva são oriundas das glândulas salivares e do soro sanguíneo. A imunoglobulina A secretora (slgA), que é derivada de plasmócitos nas glândulas salivares, é predominante e representa o principal mecanismo de resposta imune específica da saliva. As imunoglobulinas M e G (IgM e IgG) presentes na saliva são derivadas do soro e chegam à cavidade bucal por meio do fluido crevicular gengival. IgM e IgG estão presentes em concentrações inferiores à IgA salivar<sup>89</sup>. A imunoglobulina A secretora (slgA) é a IgA na forma dimérica, ligada a outra proteína denominada peça secretora, que é produzida por células epiteliais<sup>90</sup>. Esse componente facilita o transporte e impede a ação proteolítica sobre a IgA, tornando-a um importante mecanismo de

defesa em mucosas. Encontra-se predominantemente em secreções seromucosas como saliva, lágrima, colostro, leite, líquor, além de secreções traqueobrônquicas, intestinais e genitourinárias<sup>91</sup>.

As superfícies das mucosas são protegidas da adesão microbiana, invasão e danos por agentes patogênicos e toxinas por uma variedade de mecanismos de defesa imunológicos e não imunológicos. Embora a noção de imunidade da mucosa seja mais antiga e apesar dos resultados impressionantes conseguidos por Besredka (1927) durante as três primeiras décadas do século XX, o estudo sistemático neste domínio começou com a descoberta da imunoglobulina A (sIgA) por Heremans, Heremans & Schultze, 1958, em secreções que banham as membranas mucosas. Dependendo do local da mucosa, esta classe especial de anticorpo pode ser produzida localmente (por exemplo, em glândulas salivares e lacrimais) por transporte ativo, por processamento de IgA no soro, ou por uma combinação de ambos. Glândulas salivares menores desempenham um papel relevante na imunidade mediada pela imunoglobulina A secretória (sIgA) da cavidade oral<sup>92</sup>. A deficiência da imunoglobulina A (IgA) é a mais comum dentre as imunodeficiências congênitas conhecidas. Os pacientes podem apresentar quadros de infecções de repetição graves, principalmente em vias aéreas superiores e inferiores e, também, no aparelho gastrintestinal<sup>91</sup>. Camundongos no cauteleado para o gene IgA (-/-) apresentaram maior susceptibilidade à infecção por BCG, comparado aos camundongos normais (+/+), revelada por alta carga bacteriana nos pulmões. Fato importante neste estudo foi a análise das respostas de citocinas, que revelou uma redução na produção de IFN-γ e TNF-α nos pulmões dos camundongos IgA -/- em comparação com IgA +/+. Foi sugerido que a IgA pode desempenhar um papel na proteção contra infecções por

micobactérias do trato respiratório por bloqueio da entrada do patógeno e/ou modulando as respostas pró-inflamatórias<sup>93</sup>.

A principal função biológica da IgA é a proteção contra microrganismos invasores como vírus e bactérias nas superfícies das mucosas, inibindo o mecanismo de aderência desses às células epiteliais. A IgA representa 15 a 20% das imunoglobulinas e é dividida em subclasses, IgA 1 (90%) e IgA 2 (10%). Há relatos de diminuição dos níveis de sIgA com a idade, após exercícios e estados depressivos. Atletas que foram submetidos a exercícios prolongados tiveram diminuição dos níveis de sIgA e maior incidência de infecções nas vias aéreas superiores. A IgA não fixa complemento e por isso pode atuar contra microrganismos sem desencadear a cascata do processo inflamatório que danifica as superfícies epiteliais. Por apresentar um mecanismo de resposta local e meia-vida curta nem sempre ela protege contra a reinfecção. Além disso, promove diminuição da absorção de uma variedade de antígenos ou alergênios, inalados ou ingeridos, que podem desencadear respostas imunes<sup>91</sup>.

A IgA vem sendo com muita expectativa investigada no diagnóstico, no monitoramento do tratamento e no processo de evolução das doenças<sup>94 95 96 97</sup>. Neste sentido a sIgA salivar pode vir a ser um importante exame complementar a ser utilizado como instrumento de avaliação de exposição ao *M. leprae*, no monitoramento da PQT e, ainda, como preditivo de reações.

## Referências Bibliográficas:

- <sup>1</sup> FOSS, N. T. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 30, n. 3, p. 335-339, 1997.
- <sup>2</sup> GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 4, p. 365-75, Jul-Aug 2002. ISSN 0037-8682 (Print) 0037-8682 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12170333>>.
- <sup>3</sup> SHIMOJI, Y. et al. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 17, p. 9857-62, Aug 17 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449784>>.
- <sup>4</sup> COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-11, Feb 22 2001. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234002>>.
- <sup>5</sup> SAÚDE, M. D. Guia de vigilância epidemiológica. v. caderno 7, p. 1, 2009.
- <sup>6</sup> MODLIN, R. L.; REA, T. H. Leprosy: new insight into an ancient disease. **J Am Acad Dermatol**, v. 17, n. 1, p. 1-13, Jul 1987. ISSN 0190-9622 (Print) 0190-9622 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2956292>>.
- <sup>7</sup> PATROCINIO, L. G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 311-6, Jun 1 2005. ISSN 0928-8244 (Print) 0928-8244 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15907454>>.
- <sup>8</sup> MARTINEZ, T. S. et al. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 11, p. 1653-8, Nov 2011. ISSN 1469-0691 (Electronic) 1198-743X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21199152>>.
- <sup>9</sup> SÉRGIO ARAÚJO, J. L., ÉRICA DE MELO REIS, DULCINÉA OLIVEIRA BERNARDES SOUZA, MARIA APARECIDA GONÇALVES, ADEILSON VIEIRA COSTA, LUIZ RICARDO GOULART, ISABELA MARIA BERNARDES GOULAR1. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the

- disease chain of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 107, p. 55-59, 2012.
- <sup>10</sup> CATHARINA J ALBERTS, W. C. S. S., ABRAHAM MEIMA, LAMEI WANGD & JAN HENDRIK RICHARDUSA. Potential effect of the World Health Organization's 2011–2015 global leprosy strategy on the prevalence of grade 2 disability: a trend analysis. **BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION**, v. 89, p. 487-495, 2011.
- <sup>11</sup> IBGE. [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2014/estimativa\\_tcu.shtml](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2014/estimativa_tcu.shtml). 2014.
- <sup>12</sup> ORGANIZATION, W. H. **Weekly epidemiological record**, v. 90, n. 36, p. 461-476, 2015.
- <sup>13</sup> COMMITTEE, W. E.; LEPROSY, O. WHO Expert Committee on leprosy: eighth report. **WHO technical report series ; no. 968**, 2012.
- <sup>14</sup> LASTORIA, J. C.; ABREU, M. A. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 2, p. 205-18, Mar-Apr 2014. ISSN 1806-4841 (Electronic)  
0365-0596 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770495>>.
- <sup>15</sup> ORGANIZATION, W. H. **Weekly Epidemiological Record**, v. 89, n. 36, p. 389-400, 2014.
- <sup>16</sup> IBGE. <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=8>. 2010.
- <sup>17</sup> ORGANIZATION, W. H. **Weekly epidemiological record**, v. 86, n. 36, p. 389–400, 2011.
- <sup>18</sup> \_\_\_\_\_. **Weekly Epidemiological Record**, v. 87, n. 34, p. 317–328, 2012.
- <sup>19</sup> GELUK, A. et al. From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 3, p. 352-9, Mar 2009. ISSN 1556-679X (Electronic)  
1556-679X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176694>>.
- <sup>20</sup> MOET, F. J. et al. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Lepr Rev**, v. 75, n. 4, p. 310-26, Dec 2004. ISSN 0305-7518 (Print)  
0305-7518 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15682969>>.

- <sup>21</sup> RAMAPRASAD, P. et al. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. **Lepr Rev**, v. 68, n. 4, p. 301-15, Dec 1997. ISSN 0305-7518 (Print) 0305-7518 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9503866>>.
- <sup>22</sup> RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, Jul-Sep 1966. ISSN 0148-916X (Print) 0148-916X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5950347>>.
- <sup>23</sup> ARAOZ, R. et al. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infect Immun**, v. 74, n. 1, p. 175-82, Jan 2006. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368971>>.
- <sup>24</sup> NT, F. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 74, p. 113-119, 1999.
- <sup>25</sup> ORGANIZATION, W. H. Technical Report Series. **Expert Committee on Leprosy**, n. 768, 1988.
- <sup>26</sup> RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 6, p. 464-70, Jun 2011. ISSN 1474-4457 (Electronic) 1473-3099 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21616456>>.
- <sup>27</sup> ORGANIZATION), W. W. H. Chemotherapy of leprosy for control programmes. Geneva, Switzerland, . 1982.
- <sup>28</sup> DE, B. M. D. S. S. D. P. D. S. D.; BÁSICA, A. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde. 2002.
- <sup>29</sup> MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **J Invest Dermatol**, v. 102, n. 6, p. 828-32, Jun 1994. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8006444>>.
- <sup>30</sup> BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732-6, Jul 30 1999. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426995>>.

<sup>31</sup> VANESSA AMARAL MENDONÇA, R. D. C.; GUSTAVO EUSTÁQUIO BRITO ALVIM DE MELO, C. M. A.; TEIXEIRA, A. L. Imunologia da hanseníase. **An Bras Dermatol**, v. 83, n. 4, p. 343 - 350, 2008.

<sup>32</sup> ARAUJO, M. G. [Leprosy in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 3, p. 373-82, May-Jun 2003. ISSN 0037-8682 (Print)

0037-8682 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12908039>>.

<sup>33</sup> GOULART, I. M. et al. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **Am J Pathol**, v. 148, n. 3, p. 911-7, Mar 1996. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8774145>>.

<sup>34</sup> VERHAGEN, C. E. et al. Type 1- and type 2-like lesional skin-derived Mycobacterium leprae-responsive T cell clones are characterized by coexpression of IFN-gamma/TNF-alpha and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. **J Immunol**, v. 160, n. 5, p. 2380-7, Mar 1 1998. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9498780>>.

<sup>35</sup> BRASIL, M. D. S. Hanseníase no Brasil: dados e indicadores selecionados. **Programa Nacional de Controle da Hanseníase**, 2009.

<sup>36</sup> RIDLEY, D. S. Skin biopsy in leprosy. **Document Geigy 3<sup>a</sup> ed.** Basle: CIBA-GEIGY, p. 63, 1990.

<sup>37</sup> SHEPARD, C. C.; MCRAE, D. H. A method for counting acid-fast bacteria. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 36, n. 1, p. 78-82, Jan-Mar 1968. ISSN 0148-916X (Print)

0148-916X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4869698>>.

<sup>38</sup> ASSOCIATION, I. L. Report of the International Leprosy Association Technical Forum. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 70, p. S23-S31, 2002.

<sup>39</sup> OSKAM, L.; SLIM, E.; BUHRER-SEKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. **Lepr Rev**, v. 74, n. 3, p. 196-205, Sep 2003. ISSN 0305-7518 (Print)

0305-7518 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14577464>>.

- <sup>40</sup> JADHAV, R. et al. Analysis of antibody and cytokine markers for leprosy nerve damage and reactions in the INFIR cohort in India. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e977, 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)  
1935-2727 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21408123>>.
- <sup>41</sup> MOURA, R. S. et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 11-8, 2008. ISSN 1678-9849 (Electronic)  
0037-8682 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19618069>>.
- <sup>42</sup> SCHURING, R. P. et al. Preventing nerve function impairment in leprosy: validation and updating of a prediction rule. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 8, p. e283, 2008. ISSN 1935-2735 (Electronic)  
1935-2727 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846229>>.
- <sup>43</sup> HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J Bacteriol**, v. 147, n. 3, p. 728-35, Sep 1981. ISSN 0021-9193 (Print)  
0021-9193 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7024248>>.
- <sup>44</sup> PAYNE, S. N.; DRAPER, P.; REES, R. J. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 50, n. 2, p. 220-1, Jun 1982. ISSN 0148-916X (Print)  
0148-916X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6749710>>.
- <sup>45</sup> BRETT, S. J. et al. Phenolic glycolipid 1 of *Mycobacterium leprae* causes nonspecific inflammation but has no effect on cell-mediated responses in mice. **Infect Immun**, v. 46, n. 3, p. 802-8, Dec 1984. ISSN 0019-9567 (Print)  
0019-9567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6389362>>.
- <sup>46</sup> CHO, S. N. et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 1, p. 138-42, Jan 2001. ISSN 1071-412X (Print)  
1071-412X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139208>>.
- <sup>47</sup> MOET, F. J. et al. A study on transmission and a trial of chemoprophylaxis in contacts of leprosy patients: design, methodology and recruitment findings of COLEP. **Lepr Rev**, v. 75, n. 4, p. 376-88, Dec 2004. ISSN 0305-7518 (Print)  
0305-7518 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15682975>>.

- 48 SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev*, v. 82, n. 4, p. 344-57, Dec 2011. ISSN 0305-7518 (Print)  
0305-7518 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439275>>.
- 49 CHO, S. N. et al. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun*, v. 41, n. 3, p. 1077-83, Sep 1983. ISSN 0019-9567 (Print)  
0019-9567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6193065>>.
- 50 TABOURET, G. et al. *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 10, p. e1001159, 2010. ISSN 1553-7374 (Electronic)  
1553-7366 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975946>>.
- 51 BUHRER-SEKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 5, p. 1991-5, May 2003. ISSN 0095-1137 (Print)  
0095-1137 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734239>>.
- 52 LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev*, v. 82, n. 4, p. 389-401, Dec 2011. ISSN 0305-7518 (Print)  
0305-7518 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439279>>.
- 53 KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasyurus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 39, n. 3, p. 693-702, Jul-Sep 1971. ISSN 0148-916X (Print)  
0148-916X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4948218>>.
- 54 LEVY, L.; JI, B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*, v. 77, n. 1, p. 5-24, Mar 2006. ISSN 0305-7518 (Print)  
0305-7518 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16715686>>.
- 55 GIGG, J. et al. The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. 17. Synthesis of propyl O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1---4)-O-(2,3- di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1---2)-3-O-methyl-alpha- L-rhamnopyranoside: the oligosaccharide portion of the major serologically active glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Chem Phys Lipids*, v. 38, n. 3, p. 299-307, Sep 1985. ISSN 0009-3084 (Print)

0009-3084 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3910287>>.

56 CHATTERJEE, D. et al. Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3-di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----9)-oxynonanoyl-bovine serum albumin--the leprosy-specific, natural disaccharide-octyl-neoglycoprotein. **Carbohydr Res**, v. 156, p. 39-56, Nov 15 1986. ISSN 0008-6215 (Print)

0008-6215 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3815408>>.

57 FUJIWARA, T. et al. Chemical synthesis of the trisaccharide unit of the species-specific phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Carbohydr Res**, v. 163, n. 1, p. 41-52, Jun 1 1987. ISSN 0008-6215 (Print)

0008-6215 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3300972>>.

58 BRENNAN, P. J., HUNTER, S.W., MCNEIL, M., CHATTERJEE, D. AND DAFFE, M. . Reappraisal of the chemistry of mycobacterial cell walls, with a view to understanding the roles of individual entities in disease processes. In Ayoub,E.M., Cassell,G.H., Branche,W.C.Jr. and Henry,T.J. (eds.) Microbial Determinants of Virulence and Host Response. **American Society for Microbiology, Washington, DC**, p. 55-75, 1990.

59 GAYLORD, H. et al. Most *Mycobacterium leprae* carbohydrate-reactive monoclonal antibodies are directed to lipoarabinomannan. **Infect Immun**, v. 55, n. 11, p. 2860-3, Nov 1987. ISSN 0019-9567 (Print)

0019-9567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3312018>>.

60 CHATTERJEE, D.; KHOO, K. H. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology**, v. 8, n. 2, p. 113-20, Feb 1998. ISSN 0959-6658 (Print)

0959-6658 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9451020>>.

61 NAWAL BAHIA EL IDRISI, P. K. D., KEES FLUITER, PATRICIA S. ROSA, JEROEN VREIJLING, DIRK TROOST, B. PAUL MORGAN, FRANK BAAS, VALERIA RAMAGLIA. M. leprae components induce nerve damage by complement activation: identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator. **Acta Neuropathol**, 2015.

62 MANDE, S. C. et al. Structure of the heat shock protein chaperonin-10 of *Mycobacterium leprae*. **Science**, v. 271, n. 5246, p. 203-7, Jan 12 1996. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8539620>>.

63 RHA, Y. H. et al. Effect of microbial heat shock proteins on airway inflammation and hyperresponsiveness. **J Immunol**, v. 169, n. 9, p. 5300-7, Nov 1 2002. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391250>>.

<sup>64</sup> HUSSAIN, R. et al. Immune profiling of leprosy and tuberculosis patients to 15-mer peptides of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* GroES in a BCG vaccinated area: implications for development of vaccine and diagnostic reagents. **Immunology**, v. 111, n. 4, p. 462-71, Apr 2004. ISSN 0019-2805 (Print)

0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15056384>>.

<sup>65</sup> ROJAS, R. E.; SEGAL-EIRAS, A. Immunoglobulin G response against 10-kDa and 65-kDa heat-shock proteins in leprosy patients and their household contacts. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 15, n. 4, p. 189-98, Oct 1996. ISSN 0928-8244 (Print)

0928-8244 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8908480>>.

<sup>66</sup> LOCKWOOD, D. N.; SUNEETHA, S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. **Bull World Health Organ**, v. 83, n. 3, p. 230-5, Mar 2005. ISSN 0042-9686 (Print)

0042-9686 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15798849>>.

<sup>67</sup> ANTUNES, D. E. et al. Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 901-8, Nov 2013. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24271045>>.

<sup>68</sup> LOCKWOOD, D. N. et al. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 12, p. e1327, Dec 2011. ISSN 1935-2735 (Electronic)

1935-2727 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180790>>.

<sup>69</sup> NAAFS, B. Leprosy reactions. New knowledge. **Trop Geogr Med**, v. 46, n. 2, p. 80-4, 1994. ISSN 0041-3232 (Print)

0041-3232 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8079395>>.

<sup>70</sup> SCOLLARD, D. M. et al. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 62, n. 4, p. 559-67, Dec 1994. ISSN 0148-916X (Print)

0148-916X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7868954>>.

<sup>71</sup> MOTTA, A. C. et al. Could leprosy reaction episodes be exacerbated by oral infections? **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 633-5, Oct 2011. ISSN 1678-9849 (Electronic)

0037-8682 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031082>>.

- 72 MARIA DE FÁTIMA DE MEDEIROS BRITO, R. A. A. X.; BÜHRER-SÉKULA, M. E. N. G. E. S. Associação entre reação hansônica após alta e a carga bacilar avaliada utilizando sorologia anti PGL-I e baciloscopy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41(Suplemento II), p. 67-72, 2008.
- 73 RAMAGLIA, V. et al. The membrane attack complex of the complement system is essential for rapid Wallerian degeneration. **J Neurosci**, v. 27, n. 29, p. 7663-72, Jul 18 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic)  
0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634361>>.
- 74 RITZ, N. et al. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis. **FEMS Microbiol Rev**, v. 32, n. 5, p. 821-41, Aug 2008. ISSN 0168-6445 (Print)  
0168-6445 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18616602>>.
- 75 KAUFMANN, S. H.; FLESCH, I. E. The role of T cell-macrophage interactions in tuberculosis. **Springer Semin Immunopathol**, v. 10, n. 4, p. 337-58, 1988. ISSN 0344-4325 (Print)  
0344-4325 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3146818>>.
- 76 CARUSO, A. M. et al. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5407-16, May 1 1999. ISSN 0022-1767 (Print)  
0022-1767 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228018>>.
- 77 CHACKERIAN, A. A.; PERERA, T. V.; BEHAR, S. M. Gamma interferon-producing CD4+ T lymphocytes in the lung correlate with resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis. **Infect Immun**, v. 69, n. 4, p. 2666-74, Apr 2001. ISSN 0019-9567 (Print)  
0019-9567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254633>>.
- 78 SONNENBERG, P. et al. HIV-1 and recurrence, relapse, and reinfection of tuberculosis after cure: a cohort study in South African mineworkers. **Lancet**, v. 358, n. 9294, p. 1687-93, Nov 17 2001. ISSN 0140-6736 (Print)  
0140-6736 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728545>>.
- 79 FERNANDO, S. L.; BRITTON, W. J. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. **Immunol Cell Biol**, v. 84, n. 2, p. 125-37, Apr 2006. ISSN 0818-9641 (Print)  
0818-9641 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16519730>>.

- 80 RODGERS, A.; WHITMORE, K. M.; WALKER, K. B. Potential correlates of BCG induced protection against tuberculosis detected in a mouse aerosol model using gene expression profiling. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 86, n. 3-4, p. 255-62, May-Jul 2006. ISSN 1472-9792 (Print)  
1472-9792 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600686>>.
- 81 FLYNN, J. L. et al. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 24, p. 12013-7, Dec 15 1992. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1465432>>.
- 82 VAN PINXTEREN, L. A. et al. Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 12, p. 3689-98, Dec 2000. ISSN 0014-2980 (Print)  
0014-2980 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11169412>>.
- 83 WINAU, F. et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 105-17, Jan 2006. ISSN 1074-7613 (Print)  
1074-7613 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16413927>>.
- 84 ROOK, G. A. et al. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. **Trends Immunol**, v. 25, n. 9, p. 483-8, Sep 2004. ISSN 1471-4906 (Print)  
1471-4906 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324741>>.
- 85 LEE, J. et al. Gammadelta T cells in immunity induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination. **Infect Immun**, v. 72, n. 3, p. 1504-11, Mar 2004. ISSN 0019-9567 (Print)  
0019-9567 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977956>>.
- 86 BROWN, R. M. et al. Lipoarabinomannan-reactive human secretory immunoglobulin A responses induced by mucosal bacille Calmette-Guerin vaccination. **J Infect Dis**, v. 187, n. 3, p. 513-7, Feb 1 2003. ISSN 0022-1899 (Print)  
0022-1899 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12552438>>.
- 87 HUNTER, S. W.; GAYLORD, H.; BRENNAN, P. J. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. **J Biol Chem**, v. 261, n. 26, p. 12345-51, Sep 15 1986. ISSN 0021-9258 (Print)  
0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3091602>>.

- 88 SPIELMANN, N.; WONG, D. T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral Dis**, v. 17, n. 4, p. 345-54, May 2011. ISSN 1601-0825 (Electronic)  
1354-523X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21122035>>.
- 89 MOURA, S. A. B. M., A.M.C.; COSTA, F.R.H.; MORAES, P.H.; OLIVEIRA FILHO, S.A. Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão da Literatura. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 7, p. 187-194, 2007.
- 90 BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. **Scand J Immunol**, v. 70, n. 6, p. 505-15, Dec 2009. ISSN 1365-3083 (Electronic)  
0300-9475 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906191>>.
- 91 BETHINA SANCHES RÚPOLO, J. G. S. M., ORLEI KANTOR JUNIOR. Deficiência de IgA. **J. pediatr. (Rio J.)**, v. 74, n. 6, p. 433-440, 1998.
- 92 NAIR, P. N.; SCHROEDER, H. E. Duct-associated lymphoid tissue (DALT) of minor salivary glands and mucosal immunity. **Immunology**, v. 57, n. 2, p. 171-80, Feb 1986. ISSN 0019-2805 (Print)  
0019-2805 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3512423>>.
- 93 RODRIGUEZ, A. et al. Role of IgA in the defense against respiratory infections IgA deficient mice exhibited increased susceptibility to intranasal infection with Mycobacterium bovis BCG. **Vaccine**, v. 23, n. 20, p. 2565-72, Apr 8 2005. ISSN 0264-410X (Print)  
0264-410X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15780438>>.
- 94 AVNISH KUMAR, O. P., AND BHAWNESHWAR K. GIRDHAR. Analysis of Antigens of Mycobacterium leprae by Interaction to Sera IgG, IgM, and IgA Response to Improve Diagnosis of Leprosy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- 95 NAGAO-DIAS, A. T. et al. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. **Braz J Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 215-9, Apr 2007. ISSN 1413-8670 (Print)  
1413-8670 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17625764>>.
- 96 N.L.B. BONFITTO, A. C. F. M., R.B. FURINI, M.C. KOMESU,; M.M.P. DO NASCIMENTO, J. F. C. F. A. N. T. F. Determination of the Salivary Anti-Phenolic Glycolipid-1 Antibody in Leprosy Patients as a Tool to Monitoring Multidrugtherapy. **American Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. (4), p. 321-326, 2009.

<sup>97</sup> LYNCH, L. F. et al. Ocular toxoplasmosis: evaluation of lacrimal-specific secretory IgA levels in both patients with active and inactive phases of the disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 625-8, Aug 2011. ISSN 1678-8060 (Electronic)

0074-0276 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21894386>>.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar o comportamento da sIgA salivar anti-PGL-1 e anti-LAM em pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares.

### **Objetivos Específicos**

1. Avaliar o comportamento da sIgA salivar anti-PGL-1 e anti-LAM em pacientes com hanseníase virgens de tratamento, por gênero, forma clínica (FC) e classificação operacional (CO), correlacionando com as reações hansênicas;
2. Avaliar o comportamento da sIgA salivar anti-PGL-1 e anti-LAM em pacientes no momento da alta da PQT, correlacionando com as reações hansênicas;
3. Analisar o comportamento da sIgA salivar anti-PGL-1 e anti-LAM nos contatos intradomiciliares, correlacionando com os testes de Mitsuda e cBCG;
4. Analisar o comportamento da sIgA salivar anti-LAM no diagnóstico e no momento de alta da PQT e sua relação com as reações hansênicas.

## **JUSTIFICATIVA**

Entre as doenças transmissíveis a hanseníase continua sendo uma das principais causas de neuropatia periférica e incapacidades no mundo. O número de casos novos que apresentava redução desde 2007 voltou a subir, e dos 33.789 casos novos registrados em 2014 nas Américas, 31.064 (91.9%) foram notificados no Brasil. O coeficiente de detecção de casos novos em menores de 15 anos foi de 4.88, configurando um coeficiente de detecção muito alto. A infectividade pelo *M. leprae* pode resultar em danos progressivos, com padrões característicos de deficiência que incluem ulceração da pele e deformidades nos nervos, provocando um problema de saúde pública especial devido ao fato de poder causar incapacidades permanentes, bem como por suas consequências sociais, tais como discriminação e estigma. A primeira barreira à infecção com *M. leprae* é a imunidade inata, representada pela integridade do epitélio, secreções, e pela imunoglobulina de superfície A (IgA). A imunoglobulina A secretora (slgA), derivada de plasmócitos nas glândulas salivares, é predominante e representa o principal mecanismo de resposta imune específica da saliva. A utilização desta imunoglobulina como instrumento de monitoramento da terapia de doenças orais e sistêmicas vem sendo explorada com o intuito de trazer um exame menos invasivo para os pacientes, possibilitando, ainda, estabelecer um exame preditivo das reações hansênicas.

## Análise de IgA secretória salivar anti-PGL-1 em pacientes com hanseníase e seus contatos

André Alan Nahas<sup>1,2</sup>, Mayara Ingrid de Sousa Lima<sup>1,2</sup>, Isabela M B Goulart<sup>2</sup>, Luiz R Goulart<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil.

<sup>3</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California Davis, Davis, CA, USA.

**Running Head:** IgA secretória salivar anti-PGL-1 na Hanseníase

**\* Endereço para correspondência:**

Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Campus Umuarama, Bl. 2E – Sl. 248, Uberlândia, MG, Brazil, CEP 38400-902.

**Obs:** Este capítulo foi formatado para submissão ao *Journal of Clinical Microbiology*

## Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, neuro/dermatológica e incapacitante, que tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae*. Apesar de ser uma doença muito antiga, os mecanismos imunopatológicos continuam pouco entendidos e necessitam de esforço concentrado para esclarecer as relações entre o parasita e o hospedeiro. O PGL-1 é um componente da parede celular específico do *M. leprae*, encontrado em grandes quantidades em tecidos humanos infectados e podendo ser identificado na saliva, porém sua participação na imunidade mucosa ainda não está esclarecida. O presente estudo avaliou através de ELISA indireto a presença da IgA secretória (sIgA) anti-PGL-1 em pacientes com hanseníase e seus contatos, correlacionando-a com forma clínica, classificação operacional e a ocorrência de reação hansônica nos pacientes. Diferenças significativas ocorreram entre os valores do Índice ELISA do grupo de pacientes e dos controles endêmicos ( $p = 0.01$ ). Foi observada na forma PB ( $OR$  12.09, IC 1.31 – 111.66;  $p = 0.028$ ), quando comparada aos MB ( $OR$  0.94, IC 0.38 – 2.29;  $p = 0.899$ ), uma maior e significante associação da positividade da sIgA salivar com as reações. Quanto às formas clínicas foi observada associação entre a positividade do IE salivar e o surgimento de reações hansônicas nas formas BT ( $OR$  7.12, IC 2.07 – 24.54;  $p = 0.002$ ). Este fato sugere que a sIgA salivar anti-PGL-1 é um marcador de reação hansônica tipo 1 nas formas BT e pode ser utilizado como um marcador prognóstico desses pacientes, identificando aqueles com maior risco de dano neural.

## **Abstract**

Leprosy is a chronic infectious neurodermatological and disabling disease whose etiologic agent is *Mycobacterium leprae*. Despite being a very ancient disease, the pathogenic mechanisms remain poorly understood and require concerted effort to clarify the relationship between the parasite and the host. PGL-1 is a specific cell wall component of *M. leprae* found in large quantities in infected human tissues and can be identified in saliva, but its participation in mucosal immunity is not yet clarified. This study evaluated the presence of secretory IgA (sIgA) anti-PGL-1 by indirect ELISA in leprosy patients and their contacts, correlating it with the clinical form, operational classification, and the occurrence of leprosy reaction in patients. Significant differences occurred between the values of the ELISA Index (EI) group of patients and endemic controls ( $p = 0.01$ ). In the PB form (OR 12.09, CI 1.31 - 111.66;  $p = 0.028$ ) when compared to the MB form (OR 0.94, CI 0.38 – 2.29;  $p = 0.899$ ), a larger and significant association between positive salivary sIgA with reactions was noted. Among the clinical forms, there was an association between the positivity of salivary EI and the appearance of leprosy reactions in BT forms (OR 7.12, CI 2.07 - 24.54;  $p = 0.002$ ). This suggests that the saliva sIgA anti-PGL-1 is a leprosy type 1 reaction marker in BT forms and can be used as a prognostic marker in the diagnosis of these patients to identify those at higher risk of nerve damage.

## **1. Introdução**

O *M. leprae* é a única espécie de micobactéria que infecta nervos periféricos e não cresce em meios de cultura artificiais (36), gerando um obstáculo na pesquisa de novos testes diagnósticos pela dificuldade na obtenção de抗ígenos naturais. O bacilo é considerado de alta infectividade, porém de baixa patogenicidade (4).

À medida que as micobactérias entram no corpo humano, a parede celular é o primeiro ponto de encontro com o sistema imune. A parede celular do *M. leprae* consiste principalmente de lipídeos, inclusive uma fração considerável de glicolipídeos com composição única de carboidratos. Um dos primeiros抗ígenos específicos do *Mycobacterium leprae* a ser isolado e caracterizado foi o glicolipídeo fenólico-1 (PGL-1), o principal glicolipídeo antigênico do bacilo. O principal determinante antigênico de PGL-1 é a última parte di- e trissacarídeo da molécula. Anticorpos monoclonais foram utilizados para analisar o determinante antigênico de PGL-1 em mais profundidade, sendo mostrado que a remoção do resíduo de açúcar terminal resultou na perda de ligação entre a maioria de anticorpos, enquanto a remoção de ácidos graxos de cadeia longa da molécula não fez efeito na ligação de anticorpos. Esse e outros resultados sugerem que a síntese química do último dissacarídeo criaria um epítopo antigênico específico o suficiente para ser aplicado na sorologia da hanseníase (5). O PGL-1 não apresenta reação cruzada com *M. tuberculosis* ou outras micobactérias, sendo único para *M. leprae* (12) e a comprovação da sua antigenicidade (28) possibilitou grandes inovações na pesquisa em hanseníase (21), uma vez que esse

componente antigênico tem sido explorado no sorodiagnóstico por ELISA e ML-Flow (19), bem como em outros testes rápidos associados (LID + NDO) (9).

Vários grupos têm utilizado procedimentos pós-genômicos para a descoberta de novos抗ígenos que possam ser utilizados no diagnóstico da hanseníase ou como unidades vacinais (2, 31, 40). Estes estudos têm explorado sequências de genes do *M. leprae* para a identificação de proteínas ou peptídeos que possam ser adequados ao sorodiagnóstico das diferentes formas clínicas da hanseníase.

Jadhav et al, 2011, em estudo que avaliou anticorpos no soro de pacientes MB, apresentaram que os níveis de anticorpos IgM e IgG anti-PGL-1 foram mais baixos em pacientes com hanseníase BT e mais altos em pacientes LL; que os níveis de anticorpos IgM anti-PGL-1 foram elevados em pacientes com lesões mistas (pele e comprometimento da função neural); e que o comprometimento da função nervosa sensorial diagnosticada há mais de seis meses está associado com elevação significativa de anticorpos IgG anti-PGL-1. Foi relatado, ainda, que os níveis de todos os anticorpos testados e TNF $\alpha$  foram mais baixos em pacientes que apresentaram somente reação na pele (14).

O PGL-1 pode ser identificado na saliva e sua participação na imunidade mucosa vem sendo investigada. O valor da saliva como meio diagnóstico de doenças orais e sistêmicas tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores com o intuito de acrescentar uma possibilidade de exame complementar. A análise da saliva, bem como a análise do sangue, tem duas finalidades: a primeira é identificar indivíduos com doença, e a segunda, acompanhar o progresso do indivíduo afetado, avaliando inclusive a efetividade do tratamento empregado (22).

A função de defesa das mucosas contra infecção pelo *M. leprae* não é clara. Contudo, sabe-se que imunidade local é a primeira linha de defesa contra o *M. leprae*, que consiste de secreção de peptídeos antimicrobianos e anticorpos específicos das classes de imunoglobulinas para o antígeno. Alguns autores demonstraram a elevação da secreção de imunoglobulina salivar em pacientes com hanseníase e contatos domiciliares. A detecção de anticorpos na saliva representa a expressão da imunidade local (1, 24), mas a sua presença não é suficiente para bloquear o processo de infecção pelo *M. leprae* (8, 42), mesmo assim seu efeito local dever ser considerado, embora *M. Leprae* em vários estudos tenha sido identificado na mucosa bucal (17, 20, 39, 41).

Bonflito et al, 2009, compararam o comportamento da IgA secretória salivar, IgM salivar e da IgM no soro frente à exposição ao antígeno PGL-1 nos grupos de pacientes virgens de tratamento, tratamento com PQT concluído, tratamento em andamento e controles saudáveis e, ainda, entre os grupos MB e PB. A IgM no soro apresentou resultado mais elevado no grupo virgem de tratamento. Quanto à IgA salivar, foi observada diferença entre os grupos virgens de tratamento ( $0.176 \pm 0.118$ ), que apresentou maiores médias de absorbância (ABS) quando comparado aos controles endêmicos ( $0.082 \pm 0.062$ ), e entre os grupos MB com maiores valores médios de ABS do que os PB,  $0.204 \pm 0.113$  e  $0.113 \pm 0.105$ , respectivamente. Os resultados sugerem um papel útil para a mensuração de anticorpo salivar anti-PGL-1, que pode ser usado como um método fácil, de baixo custo e não invasivo para detecção de hanseníase na população e para monitorar a resposta à poliquimioterapia (PQT) (23).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento da IgA salivar secretória contra o antígeno PGL-1 nativo nos pacientes com hanseníase, no momento do diagnóstico e na alta da PQT, e em contatos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Pacientes, Contatos Intradomiciliares e Controles Endêmicos**

Foram obtidas para este estudo amostras de saliva de 117 pacientes (71 homens e 46 mulheres) com hanseníase e virgens de tratamento; 42 amostras de saliva de pacientes (23 homens e 19 mulheres) que haviam completado a PQT e 111 amostras de saliva de contatos (40 homens e 71 mulheres) atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), do Hospital de Clínicas (HC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – MG (Tab 1). Os pacientes tiveram amostras de saliva coletadas no diagnóstico e ao término da PQT (alta) e foram monitorados durante o tempo da pesquisa quanto ao surgimento de reações hansênicas. Foram avaliados, ainda, 11 controles endêmicos (3 homens e 8 mulheres). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/CEP, parecer 643/11 (ANEXO A) da UFU e o consentimento escrito e informado foi obtido de cada participante da pesquisa (ANEXO B).

### **2.2 Apresentação dos Grupos**

Foram avaliados 4 grupos com indivíduos distintos:

Grupo 1 – Pacientes com hanseníase virgens de tratamento: foram incluídos neste grupo pacientes que não tinham realizado nenhum tratamento com a PQT e que não apresentaram comorbidades tais como diabetes mellitus,

cirrose hepática, leishmaniose, toxoplasmose, tuberculose, neuropatias hereditárias, dentre outras.

Grupo 2 – Pacientes que completaram a PQT: foram incluídos neste grupo pacientes com hanseníase que completaram a PQT.

Grupo 3 – Contatos intradomiciliares: este grupo foi composto por 111 contatos intradomiciliares monitorados pelo CREDESH/HC/UFU.

Grupo 4 – Controles endêmicos – foram incluídos neste grupo indivíduos saudáveis que desconheciam qualquer contato com pacientes de hanseníase.

### **2.3 Dados Clínicos**

Foi realizada consulta aos prontuários médicos dos pacientes com hanseníase para obtenção de dados clínicos (do diagnóstico, alta e do tratamento realizado) e epidemiológicos como: gênero, forma clínica (FC), classificação operacional (CO) e surgimento de reações hansênicas.

Os pacientes receberam uma classificação operacional, sendo 38 paucibacilares (PB) e 80 multibacilares (MB) (27). Além de 3 pacientes da forma indeterminada (HI), os outros pacientes foram distribuídos nas formas clínicas, de acordo com a classificação espectral de Ridley & Jopling (33), sendo 8 da forma tuberculóide (TT), 58 da forma clínica borderline-tuberculóide (BT: 29 BT/PB e 29 BT/MB), 11 borderline-borderline (BB), 18 da forma borderline-lepromatosa (BL) e 20 pacientes com a forma lepromatosa (LL).

Todos os pacientes foram submetidos a um protocolo clínico-laboratorial para o diagnóstico de hanseníase e classificação clínica, considerando: o histopatológico das biópsias da lesão de pele, a baciloscopy dos esfregaços dérmicos de no mínimo 7 locais, o teste de Mitsuda para análise da resposta imune celular específica ao *M. leprae* e teste ELISA indireto anti-PGL-1 para análise da resposta imune humoral.

A baciloscopy foi realizada para determinar a carga bacilar presente nos esfregaços dérmicos do paciente, que foram coletados dos lóbulos das orelhas (LD e LE), cotovelos (CD e CE), joelhos (JD e JE) e uma das lesões, com resultados descritos como Índice Baciloscópico (IB) de acordo com a Escala Logarítmica de Ridley (32), que varia de IB=0 a IB=6.

O teste de Mitsuda foi realizado nos pacientes para quantificar a resposta imune celular específica ao *M. leprae*. A leitura do teste é feita após quatro semanas da aplicação intradérmica de 0,1 ml do antígeno no antebraço direito, por meio da medida em milímetros (mm) do diâmetro da induração local. Os resultados do teste de Mitsuda foram classificados da seguinte forma: 0 a 3 mm – negativo ou duvidoso; 4 a 7 mm- positivo fraco; 8 a10 mm - positivo forte; e maior que 10 - fortemente positivo (27). Neste estudo foi adotado um sistema de leitura reduzido utilizado em trabalho anterior do nosso grupo (11), onde a partir dos resultados em milímetros da induração local foram definidos dois grupos categóricos: o "negativo" para leituras de até 7 mm (0 – 7 mm), que consistiu de resultados negativos a fracamente positivos, e o "positivo" para leituras maiores que 7 mm (> 7 mm), que aborda resultados positivos e fortemente positivos com ou sem ulcerações.

O teste ELISA indireto anti-PGL-1 é um teste sorológico que detecta e quantifica a presença de anticorpos IgM contra o antígeno PGL-1 presente na parede do *M. leprae* e sua positividade correlaciona-se com o espectro clínico e o índice baciloscópico dos pacientes com hanseníase (6, 7, 38). O resultado do teste é apresentado na forma do Índice ELISA (IE), considerado positivo quando maior que 1.0. Em nosso estudo o teste ELISA sorológico IgM anti-PGL-1 foi realizado nos grupos 1, 2 e 3.

Dos contatos intradomiciliares em acompanhamento no CREDESH/HC/UFU foram coletados dados referentes ao teste sorológico ELISA anti-PGL-1, ao teste de Mitsuda e ao exame físico para detecção de cicatriz vacinal BCG (0, 1 ou 2 cicatrizes). Os contatos foram, ainda, classificados de acordo com a forma clínica (FC) e classificação operacional (CO) do caso índice.

## **2.4 Coleta da Saliva**

A coleta da saliva de forma não estimulada foi feita por meio da utilização de rolos cilíndricos de algodão, superfície lisa, conhecidos pelo nome comercial de “Salivette”. Estes rolos que medem aproximadamente 1 cm de espessura e 3.5 cm de comprimento foram introduzidos na cavidade bucal e alojados na região sublingual por um período de 3 a 5 minutos para absorção da saliva (35). No laboratório, o Salivette foi centrifugado a 5.000 rpm a 4°C por 10 min e a amostra obtida foi aliquotada e transferida para tubos de 0.5 ml, sendo em seguida congelada a -20°C. O volume das amostras variou de 0.5 a 1.5 ml.

## **2.5 ELISA Indireto para detecção de IgA salivar anti-PGL-1 Nativo**

Placas de alta afinidade (Maxsorp - Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com 50 µl de PGL-1 (gentilmente cedido pelo Dr. J.S. Spencer, Universidade de Colorado, EUA), diluído em tampão carbonato/bicarbonato (50 µl de PGL-1 Nativo (10 µg/ml) diluídos em 4.950 µl de tampão carbonato/bicarbonato, ph 9.6); as placas foram incubadas *overnight* em câmara fria a 4°C; foram feitas quatro lavagens com PBS<sub>T</sub> 0.05% (200 µl/well) e amostras de saliva diluídas em PBS/BSA 5% (1:5) foram adicionadas em triplicata, as placas foram incubadas por 1 h a 37°C; após 5 lavagens com PBS<sub>T</sub> 0.05% foram adicionados 50 µl de anti-IgA (CALBIOCHEM® - USA 1.0 mg/ml) marcada com peroxidase diluída 1:1000 em PBS/BSA e incubadas por 1 h a 37°C; após 6 lavagens com PBS<sub>T</sub> 0.05% as placas foram reveladas 50 µl de solução de OPD por 5 min (2 mg OPD + 5000 µl Tampão citrato + 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sendo a reação interrompida em seguida com 20 µl/well de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N). As placas foram lidas em leitora de microplaca (TP – READER, THERMO PLATE) em comprimento de onda de 492 nm.

## **2.6 Índice ELISA**

As amostras de saliva foram trabalhadas em triplicata. Para o cálculo do Índice ELISA o valor da média das absorbâncias foi dividido pelo *Cut off*, sendo considerados os valores maiores que 1 positivos. O valor do *Cut off* foi obtido pela média das absorbâncias dos controles negativos somados a 3 desvios padrões.

## **2.7 Análise Estatística**

Foi utilizada análise descritiva para descrição da amostra e para os testes não paramétricos foi utilizado o software GraphPad Prism, v. 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA); para o risco relativo e *odds ratio*, o MedCalc ([www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)), considerando significantes os valores de  $p \leq 0.05$ .

## **3. Resultados**

### **3.1 Grupo 1 – Pacientes virgens de tratamento**

A tabela 1 apresenta a distribuição dos pacientes com hanseníase do grupo 1, virgens de tratamento, que desenvolveram ou não reações hansênicas durante e/ou após o tratamento específico, segundo classificação operacional (CO), gênero associado à CO, resultado do teste Mitsuda, do teste sorológico ELISA IgM anti-PGL1 e do teste salivar ELISA sIgA anti-PGL-1.

Dos 117 pacientes virgens de tratamento avaliados, a positividade geral ao ELISA sIgA salivar anti-PGL-1 foi de 45.3% (53/117). Quanto à classificação operacional, a amostra foi composta por 79 pacientes MB (67.5%) e 38 PB (32.5%) e a positividade nos casos PB foi de 47.4% (18/38) e de 44.3% (35/79) nos MB ( $OR\ 1.13$ ; IC 0.52 – 2.45;  $p= 0.75$ ).

Dos 47 pacientes que desenvolveram reações durante o período avaliado 24 (51.1%) apresentaram IE salivar positivo ( $OR\ 1.47$ ; IC 0.70 – 3.10;  $p= 0.305$ ) (Tab 1). Dos pacientes MB 49.4% (39/79) tiveram reações hansênicas e apresentaram maior chance de ocorrência de reações ( $OR\ 3.65$ ; IC 1.49 – 8.95;  $p= 0.004$ ) do que os pacientes PB. O padrão MB acompanhou a questão de gênero, sendo que dos 25 pacientes do gênero masculino que apresentaram

reações durante o estudo, 22 (88%) eram MB ( $OR$  3.54; IC 0.91 – 13.75;  $p=0.066$ ), e das mulheres com reação, 17 de 22 (77.3%) eram MB ( $OR$  5.67; IC 1.55 – 20.69;  $p=0.008$ ).

Pacientes com teste de Mitsuda no grupo “negativo” (0 – 7 mm) revelaram tendência de maior chance de reação ( $OR$  2.63; IC 0.76 – 9.09;  $p=0.124$ ), apesar do  $OR$  não ter sido significativo.

Tabela 1. Distribuição de pacientes com hanseníase virgens de tratamento, que desenvolveram ou não reações hansênicas durante ou após a PQT, segundo: classificação operacional (CO), gênero associado à CO, teste Mitsuda, teste sorológico ELISA IgM anti-PGL1 e teste salivar ELISA sIgA anti-PGL-1, obtidos no momento do diagnóstico.

Variáveis	Reações Hansênicas				n	$*OR$	IC (95%)	p				
	Sim		Não									
	n	(%)	n	(%)								
<b>Classificação Operacional (CO)</b>												
Multibacilar (MB)	39	(49.4)	40	(50.6)	79	<b>3.65</b>	<b>1.49 - 8.95</b>	<b>0.004</b>				
Paucibacilar (PB)	8	(21.1)	30	(78.9)	38							
<b>Gênero/CO</b>												
M	MB	22	(41.5)	31	(58.5)	53	<b>3.54</b>	0.91 - 13.75				
	PB	3	(16.7)	15	(83.3)	18						
F	MB	17	(65.4)	9	(34.6)	26	<b>5.67</b>	<b>1.55 - 20.69</b>				
	PB	5	(25)	15	(75)	20						
Total		48	(40.3)	71	(59.7)	117						
<b>**Mitsuda</b>												
0 – 7 mm		18	(38.3)	29	(61.7)	47	<b>2.63</b>	0.76 - 9.09				
> 7 mm		4	(19.0)	17	(81.0)	21						
<b>Soro IgM</b>												
PGL-1 +		31	(52.5)	28	(47.5)	59	<b>2.90</b>	<b>1.34 - 6.27</b>				
PGL-1 -		16	(27.6)	42	(72.4)	58						
<b>Saliva sIgA</b>												
PGL-1 +		24	(45.3)	29	(54.7)	53	<b>1.47</b>	0.70 - 3.10				
PGL-1 -		23	(35.9)	41	(64.1)	64						

\**OR = odds ratio. IC (95%) = Intervalo de confiança. p = p value. Sistema de leitura do teste Mitsuda reduzido: "negativo" para leituras de até 7 mm (0 – 7 mm) e "positivo" para leituras maiores que 7 mm (> 7 mm)(11).*

A positividade geral ao ELISA sorológico IgM anti-PGL-1 foi de 50.4% (59/117) dos pacientes, sendo que destes, 31 (52.5%) desenvolveram reações, conferindo uma chance quase três vezes maior de reação nos soropositivos (*OR* 2.90; IC 1.34 – 6.27; *p*= 0.006).

A tabela 2 apresenta a distribuição dos pacientes com hanseníase por forma clínica, classificação operacional e gênero, associados à presença e tipo de reação hansônica e à positividade de IgA secretória anti-PGL-1.

Avaliando a presença de reações hansênicas em um contexto que correlacionou classificação operacional e a presença de sIgA salivar anti-PGL-1, foi observada na forma PB uma maior e significante associação da positividade da sIgA salivar com as reações (*OR* 12.09; IC 1.31 – 111.66; *p*= 0.028) quando comparada aos MB (*OR* 0.94; IC 0.38 – 2.29; *p*= 0.899). Quanto às formas clínicas foi observada uma associação entre a positividade do IE salivar e o surgimento de reações hansênicas nas formas BT (*OR* 7.12; IC 2.07 – 24.5; *p*= 0.002) e na associação TT+BT, configurando uma maior chance de reação hansônica tipo 1 no polo tuberculóide do espectro (*OR* 6.85; IC 2.08 – 22.5; *p*= 0.001). A forma clínica BT, mesmo quando subdividida pela classificação operacional (CO), também apresentou nos dois subgrupos uma maior chance de ocorrência de reações hansênicas, sendo BT/PB (*OR* 10.5; IC 1.06 – 103.51; *p*= 0.044) e BT/MB (*OR* 9.33; IC 1.65 – 52.68; *p*= 0.011) (Tab 2).

Tabela 2. Distribuição dos pacientes com hanseníase por forma clínica, classificação operacional e gênero, associados à presença e ao tipo de reação hansônica e à positividade à IgA secretória anti-PGL-1.

Variáveis	n	slgA anti- PGL-1	Total (%)	Reação			Total		OR	IC	p
				T1	T2	M	R	S/R			
<b>Formas Clínicas</b>											
I	3	+					0	0			
		-	3 (100)				0	3			
TT	8	+	4 (50)	1			1	3			
		-	4 (50)				0	4			
BT	58	+	25 (43.1)	14			14	11	*7.12	2.07 - 24.54	0.002
		-	33 (56.9)	5			5	28			
BB	11	+	4 (36.4)	1			1	3	0.05	0.002 - 1.23	0.067
		-	7 (63.6)	6			6	1			
BL	17	+	6 (35.3)	1	1		2	4	0.28	0.03 - 2.32	0.241
		-	11 (64.7)	3	4		7	4			
LL	20	+	14 (70)		6		6	8			
		-	6 (30)		4	1	5	1	0.15	0.013 - 1.64	0.120
<b>Total</b>	<b>117</b>			<b>31</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>47</b>	<b>70</b>			
<b>Classificação Operacional da forma BT</b>											
BT/PB	29	+	14 (48.3)	6			6	8	*10.50	1.06 - 103.51	0.044
		-	15 (51.7)	1			1	14			
BT/MB	29	+	11 (37.9)	8			8	3	*9.33	1.65 - 52.68	0.011
		-	18 (62.1)	4			4	14			
<b>Classificação Operacional</b>											
PB	38	+	18 (47.4)	7			7	11	*12.09	1.31 - 111.66	0.028
		-	20 (52.6)	1			1	19			
MB	79	+	35 (44.3)	10	7		17	18	0.94	0.38 - 2.29	0.899
		-	44 (55.7)	13	4	5	22	22			
<b>Gênero</b>											
Masc	71	+	35 (49.3)	9	5		14	21	1.51	0.56 - 4.03	0.405
		-	36 (50.7)	6	2	3	11	25			
Fem	46	+	18 (39.1)	8	2		10	8	1.66	0.50 - 5.49	0.401
<b>Total</b>	<b>117</b>			<b>31</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>47</b>	<b>70</b>			

FC= forma clínica; R, com reação e S/R pacientes que não desenvolveram reação. T1= Reação tipo 1(RR); T2= Reação tipo 2 (ENR); M= Reação Mista. Odds Ratio (OR), Intervalo de confiança 95% (IC), p value e \*p ≤ 0,05 = dados estatisticamente significantes. TT: tuberculóide; BT: borderline-tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa. Classificação operacional: paucibacilar (PB) e multibacilar (MB).

Na comparação entre as formas clínicas o IE da slgA salivar apresentou valores médios mais altos nos pacientes LL do que nos pacientes TT ( $p=0.08$ ), porém sem significância; a diferença significante foi observada nos valores do IE

para sIgA entre as formas BB e LL ( $p=0.01$ ). Não foram observadas diferenças entre o comportamento dos valores médios da sIgA salivar entre os grupos de pacientes MB e PB (Fig 1).

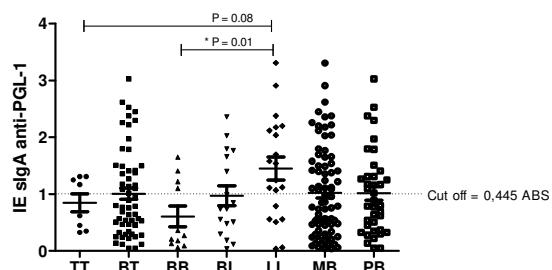


Figura 1 - Índice ELISA (IE) sIgA salivar anti-PGL-1 nas Formas Clínicas (FC) e Classificação Operacional (CO) dos 117 pacientes do grupo 1 (virgens de tratamento). Formas Clínicas: TT: tuberculoso; BT: borderline-tuberculoso; BB: borderline-e-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa. Classificação operacional: paucibacilar (PB) e multibacilar (MB). O valor 1 do Índice ELISA (IE) corresponde ao Cut off de 0.445 ABS.

Dentre os indivíduos que compuseram o grupo 1 foi observado que 11 (9.4%) já haviam sido contatos intradomiciliares. Destes, 5 foram classificados em BT/PB; 3 em BT/MB; 1 em HI/PB; 1 em TT/PB e 1 em BL/MB. Um paciente BT/MB desenvolveu reação tipo 1 pós alta (gênero feminino, com sIgA positiva de 2.26).

### 3.2 Grupo 2 - Pacientes avaliados na alta da PQT

Foram avaliados 42 pacientes no momento da alta da PQT. Nestes, a positividade geral para o ELISA sIgA salivar anti-PGL-1 foi de 38.1% (16/42) e para o ELISA IgM sorológico anti-PGL-1 foi de 35.7% (15/42) ( $p= 0.52$ ). Do total de pacientes na alta, 38.1%(16/42) eram PB e 61.9% (26/42) eram MB. Nos pacientes PB, 37.5% (6/16) eram positivos para ELISA sIgA salivar anti-PGL-1 e 6.25% (1/16) para sorologia IgM anti-PGL-1 ( $p=0.04$ ). A positividade nos pacientes MB na alta para esses dois testes foi de 38.5% (10/26) e de 53.8%

(14/26) para ELISA sIgA salivar anti-PGL-1 e IgM anti-PGL-1, respectivamente, sem significância estatística ( $p= 0.07$ ).

A figura 2 apresenta o comportamento da sIgA salivar e da IgM sorológica anti-PGL-1 distribuído por forma clínica (FC) e classificação operacional (CO), nos grupos 1, diagnóstico de pacientes virgens de tratamento, e 2, pacientes que receberam alta da PQT.

A IgM sorológica anti-PGL-1 apresentou, entre os grupos 1 e 2, diferenças estatísticas significantes nas formas clínicas BL ( $p=0.048$ ), LL ( $p= 0.003$ ) e, ainda, na classificação operacional MB ( $p=0.004$ ). Já na sIgA salivar anti-PGL-1 diferença significante entre os grupos 1 e 2 foi observada, somente, na forma clínica LL ( $p= 0.018$ ).

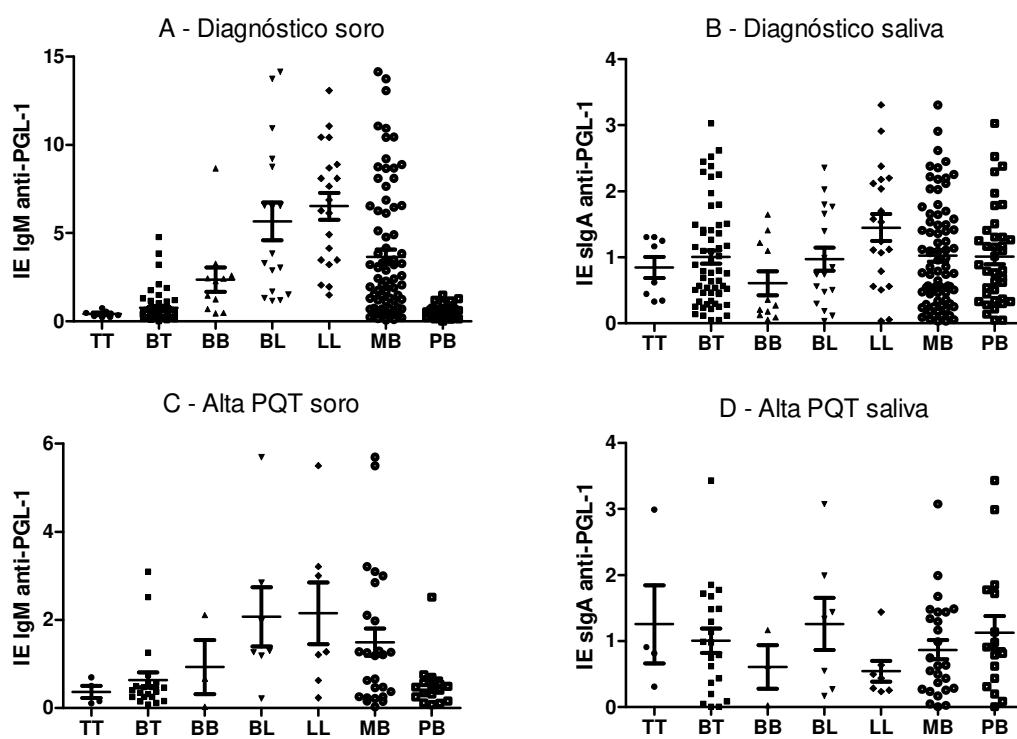


Figura 2 - Comportamento da sIgA salivar e IgM sorológica anti-PGL-1 nos grupos 1 (Diagnóstico) e 2 (Alta da PQT), segundo forma clínica (FC) e classificação operacional (CO). A e C, IgM sorológica no diagnóstico e alta da PQT; B e D, sIgA salivar no diagnóstico e alta da PQT, respectivamente.

Os pacientes de hanseníase do grupo 2 (alta da PQT) foram distribuídos por forma clínica, classificação operacional e gênero, associados à presença e ao tipo de reação hansônica e à positividade à sIgA salivar anti-PGL-1 e os resultados apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Distribuição dos pacientes de hanseníase do grupo 2 (alta da PQT) por forma clínica, classificação operacional e gênero, associados à presença e ao tipo de reação hansônica e à positividade à sIgA salivar anti-PGL-1.

Variáveis	n	sIgA anti- PGL-1	Total (%)	Reação			Total		OR	IC	P
				T1	T2	M	R	S/R			
<b>Formas Clínicas</b>											
TT	4	+	1 (25)				0	1	0.55	0.01 - 24.51	0.761
		-	3 (75)	1			1	2			
BT	21	+	9 (42.9)	4			4	5	2.40	0.37 - 15.31	0.354
		-	12 (57.1)	3			3	9			
BB	3	+	1 (33.3)	1			1	0	3.00	0.05 - 151.20	0.582
		-	2 (66.7)	1			1	1			
BL	7	+	4 (57.1)	2	2		4	0	5.40	0.15 - 188.84	0.352
		-	3 (42.9)	2			2	1			
LL	7	+	1 (14.3)		1		1	0	0.81	0.02 - 32.26	0.914
		-	6 (85.7)		5		5	1			
Total	42		42				22	20			
<b>Classificação Operacional da forma BT</b>											
BT/PB	12	+	5 (41.7)	2			2	3	10.7	0.39 - 287.84	0.157
		-	7 (58.3)				0	7			
BT/MB	9	+	4 (44.4)	2			2	2	0.66	0.04 - 9.47	0.764
		-	5 (55.6)	3			3	2			
<b>Classificação Operacional</b>											
PB	16	+	6 (37.5)	2			2	4	4.50	0.31 - 65.23	0.270
		-	10 (62.5)	1			1	9			
MB	26	+	10 (38.5)	5	3		8	2	1.81	0.27 - 11.86	0.532
		-	16 (61.5)	6	5		11	5			
<b>Gênero</b>											
Masc	23	+	10 (43.5)	3	3		6	4	2.40	0.44 - 12.98	0.309
		-	13 (56.5)	2	3		5	8			
Fem	19	+	6 (31.6)	4			4	2	1.71	0.22 - 12.89	0.600
		-	13 (68.4)	5	2		7	6			
Total	42		42	14	8		22	20			

FC= forma clínica; T1= Reação tipo 1(RR); T2= Reação tipo 2 (ENR); M= Reação Mista. Odds Ratio (OR), Intervalo de confiança 95% (IC - p≤ 0.05%), p value (p).

A tabela 4 apresenta os pacientes de hanseníase do grupo 2 que desenvolveram ou não reações hansênicas durante ou após o tratamento específico, segundo teste sorológico ELISA IgM anti-PGL-1 e teste ELISA sIgA anti-PGL-1 salivar, obtidos no momento da alta da PQT, não apresentando diferenças significantes entre os grupos com e sem reação durante ou após tratamento PQT (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição de pacientes de hanseníase do grupo 2, que desenvolveram ou não reações hansênicas durante ou após a PQT, segundo teste sorológico ELISA IgM anti-PGL-1 e teste salivar ELISA sIgA anti-PGL-1, obtidos no momento da alta da PQT.

Variáveis	Reações Hansênicas				n	*OR	IC (95%)	p				
	Sim		Não									
	n	(%)	n	(%)								
<b>Soro IgM</b>												
PGL-1 +	10	(66.7)	5	(33.3)	15	2.50	0.67 - 9.31	0.172				
PGL-1 -	12	(44.4)	15	(55.6)	27							
<b>Saliva sIgA</b>												
PGL-1 +	10	(62.5)	6	(37.5)	16	1.94	0.54 - 6.94	0.305				
PGL-1 -	12	(46.2)	14	(53.8)	26							
<b>Total</b>	<b>22</b>		<b>20</b>		<b>42</b>							

\*OR = Odds Ratio. IC (95%) = Intervalo de confiança. p value (p).

### 3.3 Grupo 3 – Contatos Intradomiciliares

Os resultados do teste ELISA utilizando sIgA salivar anti-PGL-1 de 111 contatos monitorados pelo CREDESH/HC/UFU foram avaliados e correlacionados com os testes Mitsuda e a presença/ausência da cicatriz vacinal da BCG (cBCG-ID). Foram considerados como pior prognóstico (-) os valores de 0-7 mm para o teste de Mitsuda; e como melhor prognóstico (+) os valores > que 7 mm; para a cBCG foi considerado (-) a ausência de cicatriz vacinal (0), e (+) a presença de 1 ou 2 cBCG-ID.

Tabela 5. Análise dos contatos intradomiciliares (grupo 3), considerando fatores prognósticos como o teste de Mitsuda e a presença de cicatriz vacinal de BCG-ID em relação à sIgA salivar anti-PGL-1.

IgA salivar		Prognóstico*						
		cBCG-ID*				OR	IC	
		-	+	OR	IC			
sIgA	+	14	34	2.83	1.07 - 7.45	0.03		
	-	8	55					
		Mitsuda*						
		-	+	OR	IC	p		
sIgA	+	37	11	1.45	0.61 - 3.43	0.395		
	-	44	19					
		Mitsuda/cBCG-ID*						
		-	+	OR	IC	p		
sIgA	+	11	8	4.40	1.13 - 17.06	0.03		
	-	5	16					

\* cBCG-ID\* (-) = pior prognóstico (0 cBCG) e (+) = melhor prognóstico (1 e 2 cBCG). **Mitsuda\*** (-) = pior prognóstico (0-7 mm) e (+) = melhor prognóstico (> 7mm). **Mitsuda/cBCG-ID\*** (-) = pior prognóstico(Mit<7/cBCG-ID=0) e (+) = melhor prognóstico (Mitsuda>7 / cBCG-ID≥1).

Para os contatos que não apresentaram cBCG (0), observou-se que 68.2% (15/22) eram positivos para o teste de Mitsuda; dentre os com 1 e 2 cBCG foram observados 77.8% (56/72) e 88.2% (15/17) de positividade, respectivamente.

A sIgA salivar apresentou positividade de 63.6% (14 /22) nos contatos com 0 cBCG-ID (Tabela 5), 37.5% para aqueles com 1cBCG e 41.2% positivos entre os contatos com 2 cBCG-ID.

A positividade coincidiu para os dois testes, Mitsuda e sIgA salivar, em 45.5% (10/22), 30.6% (22/72) e 41.2% (7/17) nos contatos com 0, 1 e 2 cicatrizes vacinais pelo BCG-ID, respectivamente.

Durante o período de realização de nosso trabalho 2 contatos adoeceram, sendo classificados no diagnóstico em BT/MB; ambos tinham como caso índice

(CI), enquanto contato, um paciente da forma LL e, ainda, os dois eram positivos para sIgA salivar anti-PGL-1 ( $OR = 6.57$ , IC = 0.30 – 140.28;  $p=0.22$ ).

A figura 3 apresenta o comportamento do Índice ELISA (IE) anti-PGL-1, sorológico (IgM) e salivar (sIgA), nos grupos 1 (Diagnóstico), 2 (Alta da PQT) e 3 (Contatos Intradomiciliares).

Foram observadas diferenças estatísticas significantes com relação à IgM sorológica anti-PGL-1 quando comparados os grupos 1 e 2 ( $p=0.009$ ), 1 e 3 ( $p<0.0001$ ) e 2 e 3 ( $p<0.0001$ ). A análise da sIgA salivar anti-PGL-1 não revelou diferenças estatísticas significantes entre os grupos 1, 2 e 3.

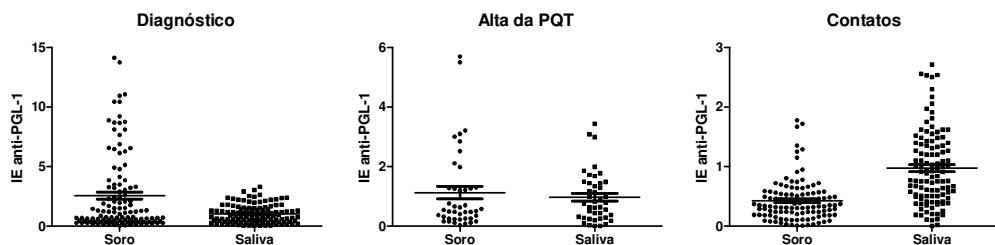


Figura 3. Comportamento do Índice ELISA (IE) anti-PGL-1 sorológico (IgM) e salivar (sIgA) entre os grupos Diagnóstico (1); Alta da PQT (2) e Contatos (3).

### 3.4 Grupo 4 – Controles Endêmicos

O grupo de controles endêmicos (CE) foi composto por 11 voluntários (3 do gênero masculino e 8 do gênero feminino, com idade média de 25 anos) sem histórico pessoal, familiar e/ou de contato direto com hanseníase. Diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre os pacientes do grupo 1 (diagnóstico) e os controles endêmicos ( $p=0.01$ ) quanto ao comportamento da sIgA salivar (Fig. 4).

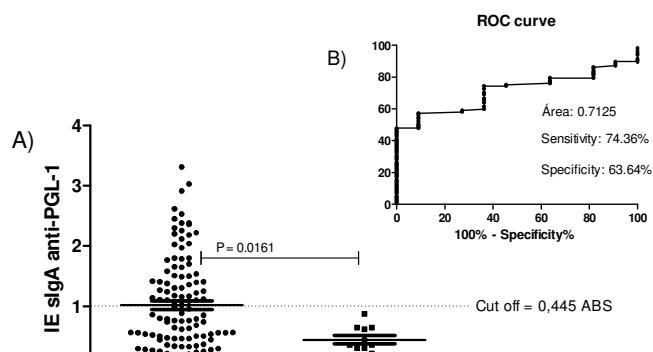


Figura 4. A, Índice ELISA (IE) utilizando sIgA salivar anti-PGL-1 nos grupos 1 (Diagnóstico - D) e 4 (Controles Endêmicos - CE). B, Curva ROC, Sensibilidade, Especificidade do grupo 1 X Controle Endêmico (CE). O valor 1 (positivo) do IE corresponde ao Cut off de 0.445 de Absorbância (ABS). B) Área da curva ROC 0.7125; Sensitivity: 74.36% e Specificity: 63.64%.

A figura 5 apresenta a sIgA em relação às formas clínicas (FC) e aos controles endêmicos (CE). Diferenças estatísticas foram observadas entre as formas TT ( $p=0.02$ ), BT ( $p=0.01$ ), BL ( $p=0.02$ ) e LL ( $p=0.001$ ) com relação aos CE.

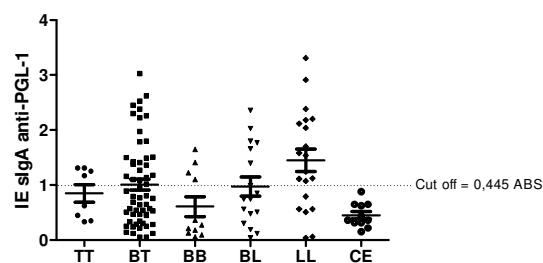


Figura 5 - Comportamento da sIgA salivar anti-PGL-1 nas Formas Clínicas (FC) do grupo 1 (diagnóstico) e grupo 4 (CE). O valor 1 do Índice ELISA (IE) corresponde ao Cut off de 0.445. TT: hanseníase tuberculóide; BT: borderline-tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa.

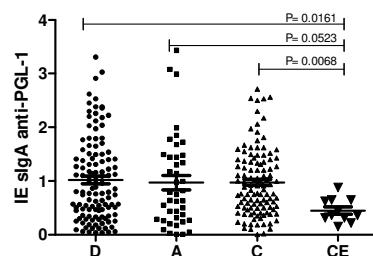


Figura 6. Índice ELISA (IE) utilizando sIgA salivar anti-PGL-1 nos grupos 1 (Diagnóstico - D); 2 (Alta da PQT - A); 3 (Contatos Intradomiciliares - C) e 4 (Controles Endêmicos - CE). Entre: D e CE  $p=0.0161$ ; A e CE  $p=0.0523$ ; C e CE  $p=0.0068$ .

#### **4. Discussão**

A hanseníase vem se mostrando resistente à eliminação, os dados de 2014 mostram que, após anos de sucessivas quedas, o número de casos novos subiu para 31.064 em comparação aos 31.044 em 2013. O número de casos novos com incapacidades grau 2 (G2D) também apresentou aumento apresentando 2.039 casos, ficando com 43 casos a mais que em 2013 (25, 26). Quando se estende essa análise para regiões endêmicas do Brasil percebemos que o problema é mais sério do que parece e que as medidas de controle da doença não têm conseguido sucesso.

Pacientes sem tratamento das formas multibacilares (MB) são provavelmente a mais importante fonte de transmissão do *M. leprae*. Estima-se que os contatos domiciliares de pacientes MB têm um risco relativo de desenvolvimento da hanseníase de 5 a 10 vezes maior do que o da população em geral (10). Diversos estudos apontam que a transmissão da hanseníase pode estar acontecendo não somente pelos doentes, mas também por portadores sadios e/ou com infecções subclínicas. Pessoas infectadas que não apresentam manifestação clínica da doença, mas que têm a presença do bacilo em sua mucosa nasal, podem estar envolvidas na transmissão subclínica (18).

A mucosa nasal é o local preferencial para a entrada e saída do *M. leprae* e a infecção inicial ocorre principalmente nas vias aéreas superiores (29). O *M. leprae* tem sido identificado por swab nasal e bucal pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em contatos intradomiciliares e evidências apontam que indivíduos com positividade para o DNA bacilar podem estar envolvidos ativamente na cadeia de transmissão da hanseníase (17, 37).

A saliva tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores com o intuito de acrescentar uma possibilidade de exame complementar para diagnóstico e monitoramento de doenças orais e sistêmicas (15, 43). A facilidade de coleta, bem como o fato de oferecer menor risco de contaminação para o profissional de saúde, representam aspectos importantes para subsidiar a escolha da saliva como meio de diagnóstico ou, ainda, como instrumento de monitoramento da eficiência do processo terapêutico (22).

A importância de analisar anticorpos salivares originou a partir do conhecimento que a porta principal de entrada do *M. leprae* é a mucosa nasal. Isto significa que o primeiro local onde a resposta imune local é estabelecida contra antígenos do *M. leprae* é a superfície da mucosa, o que precede a resposta imune no soro. A resposta imune local é induzida a fim de prevenir a aderência de bactérias às superfícies mucosas. No entanto, a eliminação bem sucedida de um antígeno depende da resposta imune equilibrada que está relacionada ao tipo de patógeno e à eficácia imunológica do hospedeiro. Alguns autores acreditam que a imunidade mucosa deve ser protetora, embora haja discordância justificada pelo número significativo de pacientes que apresentam IgA e IgM anti PGL-1 positiva em seus resultados (24).

Para investigações epidemiológicas de exposição e resposta do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae* torna-se difícil escolher verdadeiros controles em área endêmica e diferenciá-los de contatos familiares e doentes. Nagao-Dias et al, 2007, avaliando títulos de IgA e IgM salivar, relataram que 2 de 23 indivíduos integrantes de seu grupo controle apresentaram positividade nos níveis de IgA salivar anti-PGL-1 e, após investigação, foi constatado que ambos possuíam membros da família com hanseníase e foram então excluídos do grupo controle

(24). Apesar de não termos identificado ou verificado essa informação entre os controles endêmicos em nosso trabalho, este fato aborda dois pontos importantes: o primeiro relacionado à dificuldade de formar um grupo controle principalmente em áreas endêmicas, e o segundo à perspectiva que os anticorpos salivares anti-PGL-1 possam ser indicativos de exposição ao *M. leprae*.

Vários trabalhos apresentam resultados que apontam um número considerável de indivíduos como portadores sadios do *M. leprae*, especialmente entre os contatos domiciliares (10, 11, 18).

Em nosso estudo 43.2% dos contatos domiciliares (48/111) apresentaram sIgA salivar positivo e, desses, dois adoeceram durante o tempo da pesquisa. Devido ao número muito pequeno de contatos que adoeceram no período dessa investigação, o resultado do *odds ratio* ficou prejudicado, apesar de indicar uma discreta tendência que a IgAS anti-PGL-1 positiva na saliva pode ser um possível fator preditivo para a doença. No entanto, para uma análise significante é necessário monitorar um maior número de contatos que são positivos e negativos na sIgA salivar anti-PGL-1 e que adoecerão durante o seguimento.

No grupo dos pacientes avaliados em nosso estudo 12 foram contatos de casos de hanseníase (6 BT/PB, 3 BT/MB, 1 HI/PB, 1 TT/PB, 1 BL/MB) e, destes, 1 desenvolveu reação tipo 1 pós alta (gênero feminino, BT/ MB, com sIgA positiva de 2.73). Este fato revela a necessidade de marcadores prognósticos de risco, tendo em vista que os métodos convencionais não têm impedido as pessoas de adoecerem e de desenvolverem reações hansênicas.

Quanto ao prognóstico de contatos baseado na positividade da sIgA salivar isoladamente, não foi possível identificá-la como fator de risco de adoecimento. Foi possível identificar a associação da sIgA com as variáveis Mitsuda e cicatriz

de BCG-ID, que são reconhecidamente marcadores prognósticos (11) para a proteção na hanseníase, quando positivos. Ou seja, os resultados negativos para essas variáveis indicam pior prognóstico. Nossos resultados sugerem que a presença de sIgA na saliva é marcador prognóstico para maior risco de ocorrência da doença quando associado à ausência de cicatriz vacinal pelo BCG-ID e à combinação de Mitsuda/cBCG-ID (-) (Tab. 5).

A vacina BCG induz resposta Th1 e Th2, porém a ação dos linfócitos citotóxicos é modulada pelas citocinas produzidas pelos linfócitos Th1. Os resultados de estudos recentes, realizados em humanos e em animais de experimentação, sugerem que a exposição prévia a antígenos micobacterianos esteja associada à maior atividade citotóxica, e que, para ser eficiente, a vacina BCG deve ser administrada antes que o indivíduo seja exposto ao *M. tuberculosis* ou outras micobactérias (3, 13, 30).

Quanto aos resultados nos pacientes, nossos dados mostram que a positividade do IE salivar anti-PGL-1 entre o grupo de pacientes virgens de tratamento e o grupo de alta da PQT foi similar e corrobora com os resultados apresentados por Bonflito et al, 2009 (23). Ainda em concordância com esse trabalho, nossos resultados demonstram nos controles endêmicos (CE), grupo 4, valores menores do IE quando comparados ao grupo 1 ( $p=0.0161$ ) (Fig. 4), provavelmente por não terem sido expostos diretamente ao *M. leprae*. Quanto à classificação operacional dos doentes, apesar do presente trabalho não utilizar as médias das absorbâncias e sim as médias do Índice ELISA (IE), houve uma discordância da investigação anteriormente citada (19), pois os pacientes PB apresentaram um número maior de indivíduos com sIgA salivar anti-PGL-1

positivo quando comparados aos MB (Tab 2), ficando, ainda, a média dos índices similares (Fig. 2B).

Brito et al, 2008, apresentaram que após o tratamento com a PQT, títulos sorológicos elevados de anticorpos IgM anti-PGL-1 sintético (ML-Flow) têm sido identificados como relevante marcador para reação pós alta em pacientes MB, e que a soropositividade após a poliquimioterapia correspondeu à probabilidade de 10.4 vezes maior de desenvolver reação quando comparada com pacientes de resultados negativos (16). Em nosso estudo, o IE sorológico IgM anti-PGL-1 nativo no diagnóstico (grupo 1) foi o que apresentou correlação com as reações hansênicas, sendo que os pacientes positivos, 52.5% (31/59), apresentaram 3 vezes maior chance de ocorrência de reação durante e após a alta do tratamento, com *OR* 2.90 (IC 1.34 – 6.27; *p*=0.006).

A correlação positiva entre o IE anti-PGL-1 salivar positivo e o surgimento de reações hansênicas nas formas clínicas BT (*OR* 7.12; IC 2.06 – 24.5; *p*=0.001), tanto para BT/PB (*OR* 10.5; IC 1.06 – 103.51; *p*=0.044) quanto para BT/MB (*OR* 9.33; IC 1.65 – 52.68; *p*=0.011) e no polo TT (TT+BT) (*OR* 6.85; IC 2.08 – 22.5; *p*=0.001) apontam a sIgA salivar anti-PGL-1 como um provável fator prognóstico para o desenvolvimento de reações hansênicas Tipo 1 (RR) para estas formas clínicas.

Com referência à presença de citocinas tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nas reações tipo 1, tem sido demonstrado que a IgA pode estar envolvida na imunomodulação dessas citocinas pró-inflamatórias. Rodríguez et al, em 2005, demonstraram que camundongos IgA-/ (nocauteados para o gene IgA) foram mais suscetíveis à infecção por BCG comparado a camundongos IgA+/+, revelado por alta carga bacteriana nos pulmões e lavado broncoalveolar. Na

análise dos níveis de imunoglobulinas e da resposta de anticorpos ao antígeno de superfície de *Mycobacterium* não se detectou IgA nem na saliva e nem no lavado broncoalveolar de camundongos IgA-/-, que exibiram altos níveis de IgM total e específico maiores que aqueles encontrados em camundongos IgA+/+ em ambos os fluidos. Mais importante foi a análise da resposta de citocinas, que revelou a redução da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos pulmões de camundongos IgA-/- comparada aqueles IgA+/+. Analisados juntos, estes resultados sugerem que a IgA pode ter um papel na proteção contra infecção micobacteriana, seja para bloquear a entrada do patógeno no trato respiratório e/ou por modular a resposta pro-inflamatória (34).

Dessa forma a IgA pode estar envolvida na modulação da resposta pró-inflamatória que envolve a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , como acontece nas reações hansênicas tipo 1, haja visto que foi demonstrado no presente trabalho que os pacientes com hanseníase PB positivos para sIgA salivar anti-PGL-1 apresentaram uma chance 12 vezes maior de desenvolver reações hansênicas tipo 1 durante ou após o tratamento ( $OR\ 12.09;\ IC\ 1.30 - 111.66;\ p=0.028$ ) (Tab. 2).

Este fato sugere promissora utilização da saliva para detecção da sIgA salivar anti-PGL-1 como método de monitoramento dos pacientes de hanseníase, principalmente nas formas BT, no sentido de se identificar o grupo alvo para novas estratégias de prevenção e manejo de reações hansênicas tipo 1 (RR), visando diminuir o grande potencial de dano neural e consequentes deficiências e/ou incapacidades físicas que mantêm o estigma dessa doença milenar.

## Referências Bibliográficas

1. Abe, M., Y. Yoshino, F. Minagawa, I. Miyaji, P. Samponachot, T. Ozawa, Y. Sakamoto, T. Saito, and K. Saikawa. 1984. Salivary immunoglobulins and antibody activities in leprosy. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association **52**:343-350.
2. Araoz, R., N. Honore, S. Cho, J. P. Kim, S. N. Cho, M. Monot, C. Demangel, P. J. Brennan, and S. T. Cole. 2006. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. Infection and immunity **74**:175-182.
3. Brandt, L., J. Feino Cunha, A. Weinreich Olsen, B. Chilima, P. Hirsch, R. Appelberg, and P. Andersen. 2002. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. Infection and immunity **70**:672-678.
4. BRASIL, M. D. S. 2002. Guia para o Controle da Hanseníase: Cadernos de atenção básica.
5. Buhrer-Sekula, S. 2008. PGL-I leprosy serology. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **41 Suppl 2**:3-5.
6. Calado, K. I. S., Vieira, A. G., Durães, S., Sékula, S. B. and Oliveira, M. L. W. 2005. Positividade sorológica antiPGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. Anais Brasileiros de Dermatologia **80**:301.
7. Cho, S. N., R. V. Cellona, T. T. Fajardo, Jr., R. M. Abalos, E. C. dela Cruz, G. P. Walsh, J. D. Kim, and P. J. Brennan. 1991. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association **59**:25-31.
8. Cree, I. A., S. Sharpe, N. D. Sturrock, I. H. Cochrane, W. C. Smith, and J. S. Beck. 1988. Mucosal immunity to mycobacteria in leprosy patients and their contacts. Leprosy review **59**:309-316.
9. Duthie, M. S., W. Goto, G. C. Ireton, S. T. Reece, L. P. Cardoso, C. M. Martelli, M. M. Stefani, M. Nakatani, R. C. de Jesus, E. M. Netto, M. V. Balagon, E. Tan, R. H. Gelber, Y. Maeda, M. Makino, D. Hoft, and S. G. Reed. 2007. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. Clinical and vaccine immunology : CVI **14**:1400-1408.
10. Fine, P. E., J. A. Sterne, J. M. Ponnighaus, L. Bliss, J. Saui, A. Chihana, M. Munthali, and D. K. Warndorff. 1997. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. American journal of epidemiology **146**:91-102.
11. Goulart, I. M., D. O. Bernardes Souza, C. R. Marques, V. L. Pimenta, M. A. Goncalves, and L. R. Goulart. 2008. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. Clinical and vaccine immunology : CVI **15**:101-105.
12. Hunter, S. W., and P. J. Brennan. 1981. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. Journal of bacteriology **147**:728-735.
13. Hussey, G. D., M. L. Watkins, E. A. Goddard, S. Gottschalk, E. J. Hughes, K. Iloni, M. A. Kibel, and S. R. Ress. 2002. Neonatal mycobacterial specific cytotoxic T-lymphocyte and cytokine profiles in response to distinct BCG vaccination strategies. Immunology **105**:314-324.
14. Jadhav, R., L. Suneetha, R. Kamble, V. Shinde, K. Devi, M. V. Chaduvula, R. Raju, S. Suneetha, P. G. Nicholls, W. H. van Brakel, and D. N. Lockwood. 2011. Analysis of antibody and cytokine markers for leprosy nerve damage and reactions in the INFIR cohort in India. PLoS neglected tropical diseases **5**:e977.
15. Lawrence, H. P. 2002. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. Journal **68**:170-174.

16. **Maria de Fátima de Medeiros Brito, R. A. A. X., and M. E. N. G. e. S. Bührer-Sékula.** 2008. Associação entre reação hansônica após alta e a carga bacilar avaliada utilizando sorologia anti PGL-I e bacilosкопия. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **41**(Suplemento II):67-72.
17. **Martinez, T. S., M. M. Figueira, A. V. Costa, M. A. Goncalves, L. R. Goulart, and I. M. Goulart.** 2011. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **17**:1653-1658.
18. **Moet, F. J., A. Meima, L. Oskam, and J. H. Richardus.** 2004. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. Leprosy review **75**:310-326.
19. **Moet, F. J., L. Oskam, R. Faber, D. Pahan, and J. H. Richardus.** 2004. A study on transmission and a trial of chemoprophylaxis in contacts of leprosy patients: design, methodology and recruitment findings of COLEP. Leprosy review **75**:376-388.
20. **MORGADO DE ABREU, M. A. M. R., A M. ; ENOKIHARA, M ; NONOGAKI, S ; PRESTES-CARNEIRO, L E ; WECKX, L L M ; ALCHORNE, M M A.** 2013. *Mycobacterium leprae* is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. Clinical Microbiology and Infection **20**:59 - 64.
21. **Moura, R. S., K. L. Calado, M. L. Oliveira, and S. Buhrer-Sekula.** 2008. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **41 Suppl 2**:11-18.
22. **MOURA, S. A. B. M., A.M.C.; COSTA, F.R.H.; MORAES, P.H.; OLIVEIRA FILHO, S.A.** 2007. Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão da Literatura. Pesq Bras Odontoped Clin Integr **7**:187-194.
23. **N.L.B. Bonfitto, A. C. F. M., R.B. Furini, M.C. Komesu,, and J. F. C. F. a. N. T. F. M.M.P. do Nascimento.** 2009. Determination of the Salivary Anti-Phenolic Glycolipid-1 Antibody in Leprosy Patients as a Tool to Monitoring Multidrugtherapy. American Journal of Infectious Diseases **5**:321-326.
24. **Nagao-Dias, A. T., T. L. Almeida, F. Oliveira Mde, R. C. Santos, A. L. Lima, and M. Brasil.** 2007. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases **11**:215-219.
25. **ORGANIZATION, W. H.** 2014. Weekly Epidemiological Record **89**:389-400.
26. **ORGANIZATION, W. H.** 2015. Weekly epidemiological record **90**:461-476.
27. **Organization), W. W. H.** 1998. WHO Expert Committee on Leprosy: seventh report. Geneva, Switzerland.
28. **Payne, S. N., P. Draper, and R. J. Rees.** 1982. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association **50**:220-221.
29. **Ramaprasad, P., A. Fernando, S. Madhale, J. R. Rao, V. K. Edward, P. D. Samson, P. R. Klatser, M. Y. de Wit, W. C. Smith, and I. A. Cree.** 1997. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. Leprosy review **68**:301-315.
30. **Ravn P, B. H., Pedersen BK, Andersen P.** 1999. Human T cell responses induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. J Immunol. **158**:1949-1955.
31. **Reece, S. T., G. Ireton, R. Mohamath, J. Guderian, W. Goto, R. Gelber, N. Groathouse, J. Spencer, P. Brennan, and S. G. Reed.** 2006. ML0405 and ML2331 are antigens of

- Mycobacterium leprae with potential for diagnosis of leprosy. Clinical and vaccine immunology : CVI **13**:333-340.
32. **Ridley, D. S.** 1990. Skin biopsy in leprosy. Document Geigy 3<sup>a</sup> ed. Basle: CIBA-GEIGY:63.
  33. **Ridley, D. S., and W. H. Jopling.** 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association **34**:255-273.
  34. **Rodriguez, A., A. Tjarnlund, J. Ivanji, M. Singh, I. Garcia, A. Williams, P. D. Marsh, M. Troye-Bloemberg, and C. Fernandez.** 2005. Role of IgA in the defense against respiratory infections IgA deficient mice exhibited increased susceptibility to intranasal infection with Mycobacterium bovis BCG. Vaccine **23**:2565-2572.
  35. **SANTOS, P. P. A. I., D.P.P.; SOUZA, E.L.; FREITAS, R.A.; GALVÃO, H.C.** 2007. Saliva: Métodos Atuais para Coleta e Obtenção da Amostra. R. Fac. Odontol. Porto Alegre **48**:95-98.
  36. **SAÚDE, M. D.** 2009. Guia de vigilância epidemiológica. *caderno 7*:1.
  37. Sérgio Araújo, J. L., Érica de Melo Reis, Dulcinéa Oliveira Bernardes Souza, Maria Aparecida Gonçalves, Adeilson Vieira Costa, Luiz Ricardo Goulart, Isabela Maria Bernardes Goulart. 2012. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro **107**:55-59.
  38. **Shuring, R. P., Moet, F.J., Pahan, D., Richardus, J. H. and Oskam, L.** 2006. Association between anti-PGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. Leprosy Rev **77**:343.
  39. **Smith, W. C., C. M. Smith, I. A. Cree, R. S. Jadhav, M. Macdonald, V. K. Edward, L. Oskam, S. van Beers, and P. Klatser.** 2004. An approach to understanding the transmission of Mycobacterium leprae using molecular and immunological methods: results from the MILEP2 study. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association **72**:269-277.
  40. **Spencer, J. S., H. J. Kim, A. M. Marques, M. Gonzalez-Juarerro, M. C. Lima, V. D. Vissa, R. W. Truman, M. L. Gennaro, S. N. Cho, S. T. Cole, and P. J. Brennan.** 2004. Comparative analysis of B- and T-cell epitopes of Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis culture filtrate protein 10. Infection and immunity **72**:3161-3170.
  41. **Talita da Silva Martinez, A. A. N., Márcia M.N.R Figueira, Adeilson V. Costa, Maria A. Gonçalves , Luiz, and R. G. a. I. M. B. Goulart.** 2011. Oral Lesion in Leprosy: Borderline Tuberculoid Diagnosis Based on Detection of Mycobacterium leprae DNA by qPCR. Acta Derm Venereol **91**:704-707.
  42. **Touw, J., E. M. Langendijk, G. L. Stoner, and A. Belehu.** 1982. Humoral immunity in leprosy: immunoglobulin G and M antibody responses to Mycobacterium leprae in relation to various disease patterns. Infection and immunity **36**:885-892.
  43. **Yarat, A., T. Tunali, R. Pisirciler, S. Akyuz, A. Ipbuker, and N. Emekli.** 2004. Salivary thromboplastic activity in diabetics and healthy controls. Clinical oral investigations **8**:36-39.

## **Lista de Figuras**

Figura 1. Índice ELISA (IE) sIgA salivar anti-PGL-1 nas Formas Clínicas (FC) e Classificação Operacional (CO) dos 117 pacientes do grupo 1 (virgens de tratamento). Formas Clínicas: TT: tuberculóide; BT: borderline-tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa. Classificação operacional: paucibacilar (PB) e multibacilar (MB). O valor 1 do Índice ELISA (IE) corresponde ao *Cut off* de 0.445 ABS.

Figura 2. Comportamento da sIgA salivar e IgM sorológica anti-PGL-1 nos grupos 1 (Diagnóstico) e 2 (Alta da PQT), segundo forma clínica (FC) e classificação operacional (CO). A e C, IgM sorológica no diagnóstico e alta da PQT; B e D, sIgA salivar no diagnóstico e alta da PQT, respectivamente.

Figura 3. Comportamento do Índice ELISA (IE) anti-PGL-1 sorológico (IgM) e salivar (sIgA) entre os grupos Diagnóstico (1); Alta da PQT (2) e Contatos (3).

Figura 4. A, Índice ELISA (IE) utilizando sIgA salivar anti-PGL-1 nos grupos 1 (Diagnóstico - D) e 4 (Controles Endêmicos - CE). B, Curva ROC, Sensibilidade, Especificidade do grupo 1 X Controle Endêmico (CE). O valor 1 (positivo) do IE corresponde ao *Cut off* de 0.445 de Absorbância (ABS). B) Área da curva ROC 0.7125; *Sensitivity*: 74.36% e *Specificity*: 63.64%.

Figura 5. Comportamento da sIgA salivar anti-PGL-1 nas Formas Clínicas (FC) do grupo 1 (diagnóstico) e grupo 4 (CE). O valor 1 do Índice ELISA (IE) corresponde

ao *Cut off* de 0.445. TT: hanseníase tuberculóide; BT: borderline-tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa.

Figura 6. Índice ELISA (IE) utilizando sIgA salivar anti-PGL-1 nos grupos 1 (Diagnóstico - D); 2 (Alta da PQT - A); 3 (Contatos Intradomiciliares - C) e 4 (Controles Endêmicos - CE). Entre: D e CE  $p=0.0161$ ; A e CE  $p=0.0523$ ; C e CE  $p=0.0068$ .

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Distribuição de pacientes com hanseníase virgens de tratamento, que desenvolveram ou não reações hansênicas durante ou após a PQT, segundo: classificação operacional (CO), gênero associado à CO, teste Mitsuda, teste sorológico ELISA IgM anti-PGL1 e teste salivar ELISA sIgA anti-PGL-1, obtidos no momento do diagnóstico.

Tabela 2. Distribuição dos pacientes com hanseníase por forma clínica, classificação operacional e gênero, associados à presença e ao tipo de reação hansônica e à positividade à IgA secretória anti-PGL-1.

Tabela 3. Distribuição dos pacientes de hanseníase do grupo 2 (alta da PQT) por forma clínica, classificação operacional e gênero, associados à presença e ao tipo de reação hansônica e à positividade à sIgA salivar anti-PGL-1.

Tabela 4. Distribuição de pacientes de hanseníase do grupo 2, que desenvolveram ou não reações hansênicas durante ou após a PQT, segundo teste sorológico ELISA IgM anti-PGL-1 e teste salivar ELISA sIgA anti-PGL-1, obtidos no momento da alta da PQT.

Tabela 5. Análise dos contatos intradomiciliares (grupo 3), considerando fatores prognósticos como o teste de Mitsuda e a presença de cicatriz vacinal de BCG-ID em relação à sIgA salivar anti-PGL-1.

## ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia  
Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
Av. João Naves de Ávila, nº 2121 - Bloco A - sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP 38408-144 - PONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 643/11 DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O ADENDO AO PROTOCOLO REGISTRO  
CEPUFU 163/09

Projeto Pesquisa: "Avaliação da Mucosa Oral e Caracterização Imunológica da Saliva em Pacientes com Hanseníase".

Pesquisador Responsável: Isabela Maria Bernardes Goulart

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do adendo ao protocolo de pesquisa proposto.

O adendo ao protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento à Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

### SITUAÇÃO: ADENDO AO PROTOCOLO APROVADO

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 07 de outubro de 2011.

Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
Coordenadora do CEP/UFU

## ANEXO B

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **Projeto de Pesquisa: Avaliação da Mucosa Oral e Caracterização Imunológica da Saliva em Pacientes com Hanseníase**

A hanseníase é uma doença que afeta a pele e os nervos. No início os sintomas são dificilmente notados e por ser transmitida principalmente pelo nariz, este local pode ser precocemente afetado. Durante o desenvolvimento da doença as lesões de pele são mais aparentes e os nervos podem ser irreversivelmente danificados resultando em graves seqüelas. Quanto mais demora para que a doença seja diagnosticada e o tratamento iniciado, maior será o dano. O diagnóstico pode ser dificultado porque os exames atuais não conseguem detectar o bacilo quando eles estão em pequena quantidade no organismo.

Atualmente a hanseníase tem cura e muitos são os esforços para que ela deixe de ser um problema de saúde pública no Brasil. Mas, como não há uma vacina específica contra a hanseníase, é muito importante que se possa identificar os portadores sadios do bacilo que causa a doença, bem como os contatos de pacientes que estejam no estágio inicial da infecção, ainda subclínico, para que se possa definir os grupos que tenham maior risco de desenvolver a hanseníase.

Para isso, a equipe de saúde do Centro de Referencia Nacional Hanseníase/Dermatologia Sanitária (CREDESH/UFU) está propondo uma pesquisa onde deverão ser realizados, além dos exames de rotina, a análise de saliva (por meio de swabs e Salivette) e de biópsias de lesões presentes na cavidade bucal de pacientes e contatos. Cabe ressaltar que todo material utilizado será estéril e descartável, e no caso das biópsias, serão realizadas com anestésico local. O material coletado será enviado ao laboratório do CREDESH/UFU, onde serão realizados os exames e os resultados serão mantidos em sigilo.

É direito do paciente pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e, se concordar em participar da pesquisa, poderá desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, eu, \_\_\_\_\_, concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura \_\_\_\_\_.

Pesquisador Responsável: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabela Maria Bernardes Goulart

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

## **Original Article**

### **sIgA salivar anti-LAM em Pacientes com Hanseníase e Contatos**

André Alan Nahas<sup>1,2</sup>, Mayara Ingrid de Sousa Lima<sup>1,2</sup>, Isabela M B Goulart<sup>2</sup>,  
Luiz R Goulart<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia,  
Uberlândia – MG, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase,  
Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de  
Uberlândia, Uberlândia – MG, Brasil.

<sup>3</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California  
Davis, Davis, CA, USA.

**Key Words:** secretory IgA, saliva, LAM, ELISA, leprosy, household contacts,  
patients

#### **\* Endereço para correspondência:**

Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Genetics and Biochemistry,  
Federal University of Uberlândia, Campus Umuarama, Bl. 2E – Sl. 248,  
Uberlândia, MG, Brazil, CEP 38400-902.

**Obs:** Este capítulo foi formatado para submissão a *Clinical Microbiology and Infection*

## **Resumo**

O desenvolvimento de incapacidades no indivíduo acometido por hanseníase é um ponto crítico associado a um contexto de exclusão social e estigma. Compreender os mecanismos moleculares e imunológicos da lesão no nervo induzida pelo *M. leprae* é um passo necessário para o controle da hanseníase, prevenindo sua progressão para uma lesiva condição neuropática. O presente estudo avaliou através do teste ELISA a presença da IgA secretória salivar (sIgA) anti-LAM em pacientes com hanseníase e seus contatos. Os pacientes paucibacilares (PB) apresentaram associação entre a positividade da sIgA anti-LAM e o surgimento de reações hansênicas, onde todos os pacientes desse grupo que desenvolveram reações eram LAM positivo ( $OR\ 19.34;\ p = 0.048$ ). Foi observado comportamento distinto da sIgA anti-LAM entre os grupos pacientes virgens de tratamento, pacientes tratados com PQT, contatos e controles endêmicos. Quando avaliado o comportamento da sIgA anti-LAM no grupo dos contatos, foi observada maior porcentagem de indivíduos positivos em contatos com positividade para o teste Mitsuda, sugerindo que a sIgA anti-LAM pode ser um possível indicador de imunidade celular conferida aos contatos. O monitoramento de pacientes revelou que quando os valores de sIgA anti-LAM são mantidos altos ou aumentam do diagnóstico à alta da PQT, o número de reações aumenta, e se os índices decrescem a chance de ocorrência de reações é menor. Nossos dados sugerem que o monitoramento da sIgA anti-LAM nos pacientes em tratamento pode se tornar uma importante ferramenta na detecção de grupos de risco para desenvolvimento de reações hansênicas.

## **Abstract**

The development of disability in the individual affected by leprosy is a critical point associated with a context of social exclusion and stigma. Understanding the molecular and immunological mechanisms of nerve damage induced by *M. leprae* is a necessary step in the control of leprosy, preventing progression to a harmful neuropathic condition. Using ELISA, this study assessed the presence of salivary secretory IgA (sIgA) anti-LAM in leprosy patients and their contacts. The PB patients (PB) showed an association between the positivity of anti-LAM sIgA and the appearance of leprosy reactions, in which all the patients in this group who developed reactions were LAM positive (OR 19.34; p = 0.048). A distinct pattern was observed in the sIgA anti-LAM between groups: naïve patients, patients who completed MDT, contacts, and endemic controls. When the behavior of anti-LAM sIgA in the group of contacts was evaluated, there was a higher percentage of positive individuals in contacts with a positive Mitsuda test, suggesting that sIgA anti-LAM may be a possible indicator of cellular immunity conferred to contacts. Patient monitoring revealed that when the anti-LAM sIgA values are kept high or increase the diagnosis at discharge from MDT, the number of reactions increases, and if the indexes decrease, the chance of occurrence of reactions is lower. Our data suggest that monitoring of sIgA anti-LAM in patients undergoing treatment can become an important tool in detecting risk groups for the development of leprosy reactions.

## **1. Introdução**

A hanseníase é uma das mais antigas doenças infecciosas dentre as registradas. Até a presente data, a infecção por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) continua sendo a principal causa de neuropatias e incapacidades. Apesar da poliquimioterapia (PQT) eficaz, a hanseníase ainda é endêmica em várias partes do mundo, especialmente no Brasil e na Índia. A maioria da população infectada permanece livre da doença, enquanto que um subconjunto dos indivíduos infectados desenvolve sintomas clínicos, que estão associados com a imunidade do hospedeiro ao bacilo(1). Dificuldades persistem na conduta clínica, tratamento dos doentes e monitoramento das reações hansênicas, que podem gerar danos aos nervos(2, 3).

A prevenção de incapacidades começa com o diagnóstico precoce da hanseníase e tratamento das complicações, tais como neurites e reações, bem como a identificação de pacientes com risco de desenvolver as deficiências secundárias, visando uma intervenção no tempo adequado. Incapacidades em pacientes com diagnóstico recente de hanseníase e de pessoas que tenham completado o tratamento com PQT continuam sendo um desafio. Há um consenso que o desenvolvimento e instalação de deficiências e incapacidades funcionais neuromotoras no indivíduo acometido por hanseníase é um dos pontos críticos, associado com a morbidade e cronicidade da doença, no contexto da exclusão social e estigma. Com isso, a atuação decisiva e concreta, não apenas em nível básico, mas em todos os níveis de atenção à saúde, é condição necessária para o atendimento eficaz do paciente com hanseníase, com foco determinado em eliminar deficiências e incapacidades funcionais(4).

Indicadores alternativos tais como a fração de pessoas com hanseníase que tem grau de incapacidade 2 (G2D) têm sido sugeridos para monitorar os resultados das atividades de controle da hanseníase, somando-se à clássica taxa de detecção. Em 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou a Estratégia Global Aprimorada para Redução Adicional da Carga da Hanseníase para 2011-2015, sob a qual se tornou alvo a redução do número de casos novos de hanseníase com G2D por 100.000 da população total (G2DR) em, pelo menos, 35% entre o final de 2010 (dados de referência) e o final de 2015. A OMS espera que usando G2D como um indicador e pela concentração das intervenções em sua redução, a detecção e tratamento tardio de pacientes com hanseníase também sejam reduzidos, assim como o número de casos novos da doença na população(5).

A lesão do nervo na hanseníase é estudada quase que exclusivamente em fases tardias da doença, já que raros estudos publicados descrevem mudanças no nervo nas fases iniciais da mesma. No entanto, pesquisa epidemiológica em área endêmica mostrou que o dano ao nervo pode ocorrer mesmo entre os contatos não doentes de hanseníase, sugerindo que a lesão do nervo possa começar muito tempo antes da doença manifestar-se como lesões cutâneas(1). De fato, a afinidade natural do *M. leprae* para nervo, particularmente para as células de Schwann, faz com que seja provável que o dano ao nervo comece em uma fase muito precoce da infecção. Entretanto, os mecanismos do dano ao nervo subjacente no início da doença continuam a ser elucidados. Compreender mecanismos moleculares e imunológicos da lesão no nervo induzida por *M. leprae* é um passo necessário no tratamento da

hanseníase para prevenir a progressão da infecção para uma extensa condição neuropática(1).

O sistema complemento é um componente-chave do sistema de defesa do hospedeiro contra patógenos, mas sua ativação excessiva ou descontrolada pode causar dano ao hospedeiro. A ativação do complemento pode ocorrer via reconhecimento do complexo antígeno-anticorpo (via clássica), de superfícies estranhas (via alternativa) ou açúcares bacterianos (via das lectinas). Independentemente do gatilho, a ativação resulta na clivagem de C3, seguida por clivagem de C5 e formação do complexo de ataque à membrana (MAC), que perfura buracos através da membrana celular, resultando na lise da célula alvo. Como os componentes do complemento ativados são solúveis e podem desviar do seu local de ativação para áreas adjacentes, o MAC pode danificar os tecidos saudáveis adjacentes e aumentar a inflamação(1, 6).

A participação do MAC causando danos aos nervos acometidos pelo *M. leprae* e seus componentes tem sido evidenciada em ratos, nos quais injeções intraneurais de *M. leprae* sonicado induziram a deposição de MAC e alterações patológicas no nervo, enquanto que a inibição do MAC preservou mielina e axônios(6). Em estudo em humanos a ativação do complemento ocorreu principalmente pela via das lectinas e o ativador principal foi o LAM. Em biópsias de pacientes com hanseníase o grau de imunoreatividade de LAM e MAC foi robusto e significativamente mais alto em multibacilares (MB) quando comparados aos paucibacilares, sendo a associação entre LAM e MAC altamente significante nas amostras de doentes e negativa nos controles sadios. O MAC co-localizado com LAM em axônios vem apontando para o

papel deste antígeno do *M. leprae* na ativação do complemento e dano neural em pacientes com hanseníase(1).

A molécula de LAM tem sido implicada em profundos efeitos fisiológicos. Estudos que avaliam estrutura, biossíntese e função dessa extraordinária lipoglicana apontam que o LAM provavelmente seja um fator-chave de virulência e alvo de drogas no tratamento de doenças micobacterianas, incluindo tuberculose e hanseníase(7). As arabinomanas de LAM têm sido demonstradas expostas na superfície celular e diretamente implicadas na imunopatogênese destas doenças(8).

O reconhecimento do LAM e outros抗ígenos micobacterianos hidrofóbicos não peptídicos, no processo de apresentação de抗ígenos, acontece por uma via independente do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Em infecções micobacterianas, a molécula CD1 garante a apresentação de glicolipídeos para ativar células T restritas a CD1, sendo esta uma importante molécula envolvida na resposta imune das micobactérias(7, 9, 10). Em um estudo envolvendo biópsias, as células T derivadas de lesão de pele de pacientes com hanseníase só respondiam a LAM do *M. leprae*, enquanto que aquelas obtidas a partir de doadores saudáveis reconheceram LAM a partir de ambos *M. tuberculosis* e *M. leprae*(7).

Em estudo avaliando抗ígenos micobacterianos e sua capacidade de induzir respostas imunológicas após a vacinação com BCG foi relatado que entre os grupos sem vacinação (grupo controle vacinado em outro momento), após vacinação com BCG (grupo saudável que recebeu vacinação intradérmica), e pacientes com tuberculose ativa, as respostas de IgG reativas ao LAM foram significativamente aumentadas entre os grupos vacinados com BCG e com

tuberculose ativa em tratamento. O grupo vacinado com duas doses orais de BCG foi acompanhado por 6 meses e apresentou reatividade frente ao LAM significativamente maior pela IgA secretora em amostras coletadas em lágrimas e secreção da parótida no pós vacinação, principalmente aos 42 dias após a segunda dose, que correspondeu à 30<sup>a</sup> semana do estudo(11).

A facilidade de coleta da saliva, bem como o fato de oferecer menor risco de contaminação para o operador em seu manuseio, representam aspectos importantes para subsidiar a escolha da mesma como meio de diagnóstico. Aliado a isso, os estudos realizados comparando resultados dos testes salivares com outros métodos de credibilidade científica comprovada, como dosagens sanguíneas de substâncias, têm tornado o método confiável(12). A importância de analisar anticorpos salivares originou a partir do conhecimento que a porta principal de entrada do *M. leprae* é a mucosa nasal. Isto significa que o primeiro local onde a resposta imune local é estabelecida contra antígenos do *M. leprae* é a superfície da mucosa, o que precede a resposta imune no soro. No entanto, a eliminação bem sucedida de um antígeno depende da resposta imune equilibrada, que está relacionada ao tipo de patógeno e à eficácia imunológica do hospedeiro(13).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento da sIgA salivar contra o antígeno LAM nativo nos pacientes com hanseníase, no momento do diagnóstico e na alta, e em contatos domiciliares.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Pacientes, Contatos Intradomiciliares e Controles Endêmicos**

Foram obtidas para este estudo amostras de saliva de 116 pacientes (72 homens e 44 mulheres) com hanseníase e virgens de tratamento, 39 amostras de saliva de pacientes (22 homens e 17 mulheres) que haviam completado a PQT e 111 amostras de saliva de contatos (40 homens e 71 mulheres) atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), do Hospital de Clínicas (HC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – MG (Tab 1). Os pacientes tiveram amostras de saliva coletadas no diagnóstico e ao término da PQT (alta) e foram monitorados durante o tempo da pesquisa quanto ao surgimento de reações hansênicas. Foram avaliados, ainda, 11 controles endêmicos (3 homens e 8 mulheres). O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/CEP, parecer 643/11 (ANEXO A) da Universidade Federal de Uberlândia, e consentimento escrito e informado foi obtido de cada participante da pesquisa (ANEXO B).

### **2.2 Apresentação dos Grupos**

Grupo 1 – Pacientes virgens de tratamento – foram incluídos neste grupo os pacientes que não tinham realizado nenhum tratamento com a PQT e que não apresentavam comorbidades como diabetes mellitus, cirrose hepática, leishmaniose, toxoplasmose, tuberculose, neuropatias hereditárias, dentre outras.

Grupo 2 – Pacientes que completaram a PQT – foram incluídos neste grupo pacientes com hanseníase que foram avaliados apenas na alta da poliquimioterapia.

Grupo 3 – Pacientes avaliados no diagnóstico e na alta – este grupo foi composto por 16 pacientes que completaram a PQT e que também haviam sido avaliados no diagnóstico.

Grupo 4 – Contatos Intradomiciliares – este grupo foi composto por 111 contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase monitorados pelo CREDESH/HC/UFU.

Grupo 5 – Controles endêmicos – foram incluídos neste grupo indivíduos saudáveis que desconheciam qualquer contato com pacientes de hanseníase e não apresentavam qualquer outro antecedente patológico.

## 2.3 Dados Clínicos

Foi realizada consulta aos prontuários médicos dos pacientes com hanseníase para obtenção de dados epidemiológicos (gênero, faixa etária) e clínicos (do diagnóstico, alta e do tratamento realizado), forma clínica (FC), classificação operacional (CO) e surgimento de reações hansênicas.

Os pacientes receberam uma classificação operacional, sendo 38 paucibacilares (PB) e 80 multibacilares (MB) (14). Além dos três pacientes da forma indeterminada (HI), os pacientes receberam uma classificação clínica de acordo com Ridley & Jopling(15): 8 da forma tuberculóide (TT); 58 da borderline-tuberculóide (BT), sendo 29 casos BT/PB e 29 BT/MB; 11 da forma

borderline-borderline (BB); 17 borderline-lepromatosa (BL) e 19 pacientes com a forma lepromatosa (LL).

Todos os pacientes foram submetidos a um protocolo clínico-laboratorial para o diagnóstico de hanseníase e classificação clínica, considerando o histopatológico das biópsias da lesão de pele, a baciloscopy dos esfregaços dérmicos de no mínimo 7 locais, o resultado do teste de Mitsuda para análise da resposta imune celular específica ao *M. leprae* e do teste ELISA indireto anti-PGL-1 para análise da resposta imune humoral.

A baciloscopy foi realizada para determinar a carga bacilar presente nos esfregaços dérmicos do paciente, que foram coletados dos lóbulos das orelhas (LD e LE), cotovelos (CD e CE), joelhos (JD e JE) e uma das lesões, com resultados descritos como Índice Baciloscópico (IB) de acordo com a Escala Logarítmica de Ridley (16), que varia de IB=0 a IB=6.

O teste de Mitsuda foi realizado nos pacientes para quantificar a resposta imune celular específica ao *M. leprae*. A leitura do teste foi feita após quatro semanas da aplicação intradérmica de 0.1 ml do antígeno no antebraço direito, por meio da medida em milímetros (mm) do diâmetro da induração local. Os resultados do teste de Mitsuda foram classificados da seguinte forma: 0 a 3 mm – negativo ou duvidoso; 4 a 7 mm - positivo fraco; 8 a 10 mm - positivo forte; e maior que 10 - fortemente positivo(14). Em nosso estudo foi adotado um sistema de leitura reduzido utilizado em trabalho anterior do nosso grupo (17), onde a partir dos resultados em milímetros da induração local foram definidos dois grupos categóricos: o "negativo" para leituras de até 7 mm (0 – 7 mm), que consistiu de resultados negativos a fracamente positivos, e o

"positivo" para leituras maiores que 7 mm (>7 mm), que aborda resultados positivos e fortemente positivos com ou sem ulcerações.

O teste ELISA indireto anti-PGL-1 é um teste sorológico que detecta e quantifica a presença de anticorpos IgM contra o antígeno PGL-1 presente na parede do *M. leprae* e sua positividade correlaciona-se com o espectro clínico e o índice baciloscópico dos pacientes com hanseníase (18-20). O resultado do teste foi apresentado na forma do Índice ELISA (IE), considerado positivo quando maior que 1.0. No grupo 1 deste estudo o teste ELISA sorológico IgM anti-PGL-1 foi obtido no momento do diagnóstico, e nos grupos 2 e 3, no momento do diagnóstico e também como parte dos exames de alta da PQT.

Dos contatos intradomiciliares em acompanhamento no CREDESH/UFU foram coletados dados referentes ao teste sorológico Elisa anti-PGL-1, ao teste de Mitsuda e ao exame físico para detecção de cicatriz vacinal BCG (0, 1 ou 2 cicatrizes). Os contatos foram, ainda, classificados de acordo com a forma clínica e classificação operacional do caso índice.

## **2.4 Coleta da Saliva**

A coleta da saliva de forma não estimulada foi feita por meio da utilização de rolos cilíndricos de algodão, superfície lisa, conhecidos pelo nome comercial de "Salivette". Estes rolos que medem aproximadamente 1 cm de espessura e 3.5 cm de comprimento foram introduzidos na cavidade bucal e alojados na região sublingual por um período de 3 a 5 minutos para absorção da saliva (21). No laboratório o Salivette foi centrifugado a 5000 rpm a 4°C por 10 minutos e a amostra obtida foi aliquotada e transferida para tubos de 0.5 ml,

sendo em seguida congelada a -20°C. O volume das amostras variou de 0.50 a 1.5 ml.

## **2.5 ELISA Indireto para detecção de IgA salivar anti-LAM Nativo**

Placas de alta afinidade (Maxsorp - Nunc®) de 96 poços foram sensibilizadas com 50 µl de LAM Nativo (bei RESOURCES) diluído em tampão carbonato/bicarbonato (50 µl de LAM Nativo 100 µg/ml diluídos em 4950 µl de tampão carbonato/bicarbonato, ph 9.6); as placas foram incubadas over night em câmara fria a 4°C; foram feitas quatro lavagens com PBS<sub>T</sub> 0.05% (200 µl/well) e amostras de saliva diluídas em PBS/BSA 5% (1:5) foram adicionadas em triplicata, as placas foram incubadas por 1 h a 37°C; após cinco lavagens com PBS<sub>T</sub> 0.05% foram adicionados 50 µl de anti IgA (CALBIOCHEM® - USA 1.0 mg/ml) marcada com peroxidase diluída 1:1000 em PBS/BSA e incubadas por 1 h a 37°C; após seis lavagens com PBS<sub>T</sub> 0,05% as placas foram reveladas 50 µl de solução de OPD por 5 min (2 mg OPD + 5000 µl Tampão citrato + 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sendo a reação parada em seguida com 20 µl/well de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N). As placas foram lidas em leitora de microplaca (TP – READER, THERMO PLATE) em comprimento de onda de 492 nm.

## **2.6 Índice ELISA**

As amostras de saliva foram trabalhadas em triplicata. Para o cálculo do Índice ELISA o valor da média das absorbâncias foi dividido pelo *Cut off*, sendo considerados os valores maiores que 1 positivos. O valor do *Cut off* foi obtido pela média das absorbâncias dos controles negativos somados a 3 desvios padrões.

## **2.7 Análise Estatística**

Foi utilizada análise descritiva para descrição da amostra. Para os testes não paramétricos foi utilizado o software GraphPad Prism, v. 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e para o risco relativo/*odds ratio* o MedCalc ([www.medcalc.org/calc/odds\\_ratio.php](http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php)), considerando significantes os valores de  $p \leq 0.05$ .

## **3. Resultados**

### **3.1 Grupo 1 – Pacientes virgens de tratamento**

A tabela 1 apresenta a distribuição dos pacientes com hanseníase do grupo 1, virgens de tratamento, que desenvolveram ou não reações hansênicas durante e/ou após o tratamento específico, segundo classificação operacional (CO), gênero associado à CO, resultado do teste Mitsuda, do teste sorológico ELISA IgM anti-PGL-1 e do teste salivar ELISA sIgA anti-LAM.

Quanto à classificação operacional, nossa amostra foi composta por 78 pacientes MB (67.2%) e 38 PB (32.8%). Os pacientes MB apresentaram diferença estatisticamente significante quanto às reações, sendo que 52.6% (41/78) tiveram reações hansênicas ( $OR=4.15$ ;  $IC_{95\%}=1.69-10.19$ ;  $p=0.001$ ). Dos 27 pacientes do gênero masculino que apresentaram reações durante o estudo, 24 (88.9%) eram MB ( $OR=4.41$ ;  $IC=1.14-16.96$ ;  $p=0.030$ ); e das mulheres com reação, 77.3% (17/22) eram MB ( $OR=5.95$ ;  $IC_{95\%}=1.58-22.32$ ;  $p=0.008$ ). O IE sorológico IgM anti-PGL-1 foi positivo em 50.8% (59/116) dos pacientes, sendo que destes, 54.2% (32/59) desenvolveram reações ( $OR=2.78$ ;  $IC_{95\%}=1.29-5.98$ ;  $p=0.008$ ).

Dos 116 pacientes virgens de tratamento avaliados o IE sIgA salivar anti-LAM foi positivo em 67 pacientes (57.8%). Foi observada correlação positiva entre o IE sIgA salivar anti-LAM no diagnóstico e o surgimento de reações hansênicas ( $OR=2.33$ ; IC<sub>95%</sub>=1.07-5.06; p=0.031) (Tab 01).

Tabela 1. Distribuição de pacientes de hanseníase virgens de tratamento que desenvolveram ou não reações hansênicas durante ou após PQT, segundo classificação operacional (CO), gênero associado à CO, teste Mitsuda, teste sorológico ELISA IgM anti-PGL-1 e teste salivar ELISA sIgA anti-LAM, obtidos no momento do diagnóstico.

Variáveis	Reações Hansênicas				n	<i>OR</i>	IC (95%)	P				
	Sim		Não									
	n	(%)	n	(%)								
<b>Classificação Operacional (CO)</b>												
Multibacilar (MB)	41	(52.6)	37	(47.4)	78	4.15	1.69 - 10.19	0.001				
Paucibacilar (PB)	8	(21.1)	30	(78.9)	38							
<b>Gênero/CO</b>												
M 72	MB	24	(45.3)	29	(54.7)	53	4.41	1.14 - 16.96				
	PB	3	(15.8)	16	(84.2)	19						
F 44	MB	17	(68)	8	(32)	25	5.95	1.58 - 22.32				
	PB	5	(26.3)	14	(73.7)	19						
Total		49	(42.2)	67	(57.8)	116						
<b>Mitsuda</b>												
0 – 7 mm		16	(35.6)	29	(64.4)	45	2.34	0.67 – 8.17				
> 7 mm		4	(19.0)	17	(81.0)	21						
<b>Soro IgM</b>												
PGL-1 +		32	(54.2)	27	(45.8)	59	2.78	1.29 – 5.98				
PGL-1 -		17	(29.8)	40	(70.2)	57						
<b>sIgA anti LAM</b>												
LAM +		34	(50.7)	33	(49.3)	67	2.33	1.07 - 5.06				
LAM -		15	(30.6)	34	(69.4)	49						

\*OR = odds ratio. IC (95%) = Intervalo de confiança. p = p value. Sistema de leitura do teste Mitsuda reduzido: "negativo" para leituras de até 7 mm (0 – 7 mm) e "positivo" para leituras maiores que 7 mm (> 7mm) (17).

A tabela 2 apresenta a distribuição dos pacientes de hanseníase por forma clínica, classificação operacional e gênero, associados à presença e tipo de reação hansônica e à positividade à IgA secretória anti-LAM.

Foi observada na forma PB significante associação entre a positividade da sIgA salivar com as reações ( $OR=19.34$ ;  $IC_{95\%}=1.02-365.25$ ;  $p=0.048$ ) quando comparados aos MB ( $OR=1.64$ ;  $IC_{95\%}=0.66-4.06$ ;  $p=0.282$ ). Quanto às formas clínicas foi observada associação entre a positividade do IE salivar e o surgimento de reações hansônicas na forma BT ( $OR=6.90$ ;  $IC_{95\%}=1.72-27.6$ ;  $p=0.006$ ) (Tab 2).

Tabela 2. Distribuição dos pacientes de hanseníase por forma clínica, classificação operacional e gênero, associados à presença e ao tipo de reação hansônica e à positividade à IgA secretória anti-LAM.

Variáveis	n	slgA anti- PGL-1	Total (%)	Reação			Total		OR	IC	P
				T1	T2	M	R	S/R			
<b>Formas Clínicas</b>											
HI	3	+	1 (33.3)				0	1			
		-	2 (66.7)				0	2			
TT	8	+	4 (50%)	2			2	2	9.00	0.29 - 271.67	0.20
		-	4 (50%)				0	4			
BT	58	+	33 (56.9)	16			16	17	*6.90	1.72 - 27.60	0.006
		-	25 (43.1)	3			3	22			
BB	11	+	7 (63.6)	3			3	4	0.08	0.003 - 2.20	0.138
		-	4 (36.4)	4			4	0			
BL	17	+	10 (58.8)	2	1	3	6	4	1.12	0.15 - 7.98	0.906
		-	7 (41.2)	3		1	4	3			
LL	19	+	12 (63.2)		6	1	7	5	1.05	0.15 - 6.92	0.959
		-	7 (36.8)		4		4	3			
<b>Total</b>	<b>116</b>			<b>33</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>49</b>	<b>67</b>			
<b>Classificação Operacional da forma BT</b>											
BT/PB	29	+	17 (58.6)	6			6	11	14.13	0.71 - 279.84	0.082
		-	12 (41.4)				0	12			
BT/MB	29	+	16 (55.2)	10			10	6	*5.55	1.07 - 28.63	0.040
		-	13 (44.8)	3			3	10			
<b>Classificação Operacional</b>											
PB	38	+	22 (57.9)	8			8	14	*19.34	1.02 - 365.25	0.048
		-	16 (42.1)				0	16			
MB	78	+	45 (57.7)	15	7	4	26	19		0.66 - 4.06	0.282
		-	33 (42.3)	10	4	1	15	18	1.64		
<b>Gênero</b>											
Masc	72	+	42 (58.3)	12	6	2	20	22	*2.98	1.05 - 8.45	0.039
		-	30 (41.7)	4	2	1	7	23			
Fem	44	+	25 (56.8)	11	1	2	14	11		0.52 - 5.84	0.362
		-	19 (43.2)	6	2		8	11	1.75		
<b>Total</b>	<b>116</b>			<b>33</b>	<b>11</b>	<b>5</b>	<b>49</b>	<b>67</b>			

FC= forma clínica; T1= Reação tipo 1(RR); T2= Reação tipo 2 (ENR); M= Reação Mista. Odds Ratio (OR), IC - Intervalo de confiança 95% (IC - p≤ 0,05%), p value (p). \* Dados estatisticamente significantes. TT: tuberculóide; BT: borderline-tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa. Classificação operacional: paucibacilar (PB) e multibacilar (MB).

A figura 1 apresenta o comportamento da slgA salivar anti-LAM nas formas clínicas (FC). Diferença estatisticamente significante ocorreu entre as formas TT e BB ( $p= 0.02$ ).

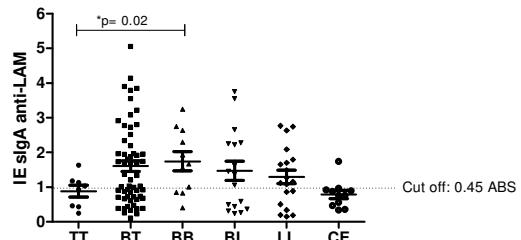


Figura 1. Comportamento da slgA salivar anti-LAM nas Formas Clínicas (FC) do grupo 1 (diagnóstico) e grupo 5 (CE). O valor 1 do Índice ELISA (IE) corresponde ao Cut off de 0.45 de Absorbância (ABS). TT: hanseníase tuberculóide; BT: borderline-tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa. \*Diferença entre as formas TT e BB ( $p=0.02$ ).

No grupo 1 foi observado que 12 pacientes (10.3%) foram contatos intradomiciliares (6 BT PB; 3 BT MB; 1 HI PB; 1 TT PB; 1 BL MB) e, destes, 1 desenvolveu reação tipo 1 pós alta (gênero feminino, BT MB, com slgA salivar anti-LAM positiva de 3.22).

### **3.2 Grupo 2 - Pacientes avaliados na alta da PQT**

Foram avaliados 39 pacientes no momento da alta da PQT. Destes, 35.9% (14/39) apresentaram slgA salivar anti-LAM positivo nos exames de alta.

#### **3.2.1 Grupo 3 - Pacientes avaliados na alta da PQT que possuem dados de diagnóstico**

Foram avaliados 16 pacientes que forneceram amostras de saliva no diagnóstico e no momento da alta da PQT. Destes, 9 eram do gênero masculino e 7 do feminino, 10 MB e 6 PB. Neste grupo nove pacientes (56.2%) desenvolveram reações hansênicas, sendo 1 PB e 8 MB. Na alta da PQT a média do IE slgA anti-LAM dos pacientes com reação foi de 0.91, enquanto que os pacientes que não tiveram reações apresentaram o IE médio de 0.53 ( $p= 0.29$ ). Analisando o comportamento do IE nos grupos com reação e sem reação, do diagnóstico (D) e para a alta (A), estes apresentaram um perfil diferente, sendo que no grupo com reação os valores aumentaram ou

permaneceram mais altos, enquanto que no grupo sem reação os valores decresceram ou permaneceram mais baixos (Fig. 2).

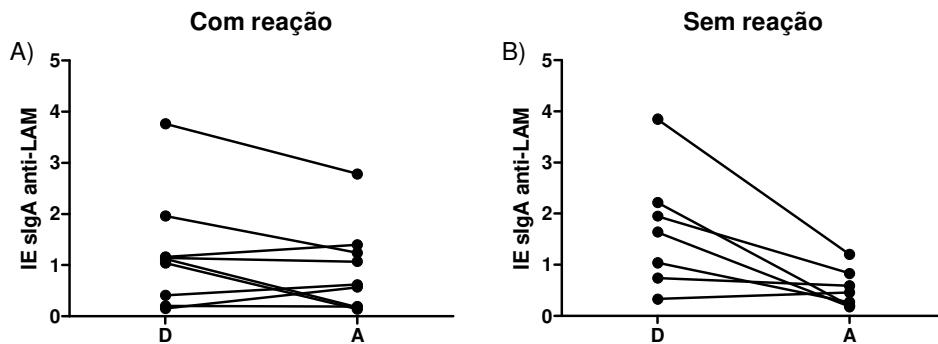


Figura 2. Comportamento da sIgA salivar anti-LAM em pacientes do grupo 3 no Diagnóstico (D) e no momento da Alta da PQT (A). Figura 2A - indivíduos que apresentaram reações; Figura 2B - indivíduos que não apresentaram reações.

### 3.3 Grupo 4 – Contatos Intradomiciliares

Os resultados do teste ELISA utilizando sIgA salivar anti-LAM de 111 contatos monitorados pelo CREDESH/UFU foram avaliados e correlacionados com o teste Mitsuda e a presença/ausência da cicatriz vacinal da BCG (cBCG-ID). Foram considerados como pior prognóstico (-) para o teste de Mitsuda os valores de 0 – 3 mm (0) e como melhor prognóstico (+) valores  $\geq 4$ ; para a cBCG foi considerado (-) a ausência de cicatriz vacinal (0) e (+) a presença de 1 ou 2 cBCG-ID (Tab 3).

Tabela 3. Análise dos contatos intradomiciliares (grupo 3), considerando fatores prognósticos como o teste de Mitsuda e a presença de cicatriz vacinal de BCG-ID em relação à sIgA salivar anti-LAM.

IgA salivar		Prognóstico*				
		cBCG-ID*		OR	IC	p
		-	+			
sIgA	+	14	47	1.56	0.59 - 4.09	0.362
	-	8	42			
Mitsuda*						
		-	+	OR	IC	p
sIgA	+	8	53	0.29	0.11 - 0.75	0.011
	-	17	33			
Mitsuda/cBCG-ID*						
		-	+	OR	IC	p
sIgA	+	2	41	0.29	0.05 – 1.61	0.15
	-	5	30			

\* cBCG-ID\* (-) = pior prognóstico (0 cBCG) e (+) = melhor prognóstico (1 e 2 cBCG). Mitsuda\* (-) = pior prognóstico (0 – 3 mm) e (+) = melhor prognóstico ( $\geq 4$  mm). Mitsuda/cBCG-ID\* (-) = pior prognóstico(Mitsuda<4/cBCG-ID=0) e (+) = melhor prognóstico (Mitsuda $\geq 4$  / cBCG-ID $\geq 1$ ).

A sIgA anti-LAM+ correlacionou inversamente com o teste Mitsuda negativo e teve o *OR* significativo ( $OR=0.29$ ;  $p=0.011$ ) (Mitsuda\*, Tab 3), sugerindo que a positividade para anti-LAM na saliva de contatos pode ser um indicador de resistência natural à hanseníase, devido, então, a maior frequência de sIgA positiva nos indivíduos Mitsuda+( $OR=3.41$ ;  $p=0.011$ ).

Para os contatos que apresentaram 0 (sem cBCG), 1 e 2 cicatrizes vacinais BCG observou-se que 63.6% (14/22), 51.4% (37/72) e 58.8% (10/17) foram positivos para LAM, respectivamente. Para o grupo sem cBCG foi observada uma associação positiva entre a positividade do sIgA salivar (LAM) e a positividade para o teste Mitsuda ( $OR=10.00$ ;  $IC_{95\%}=1.26-79.3$ ;  $p=0.02$ ) (Tab 4).

Tabela 4. Resultado do teste Mitsuda e sIgA salivar anti-LAM com relação à cicatriz vacinal BCG (cBCG).

cBCG	Mitsuda		LAM		n	LAM				OR	IC	p
	+	-	+	-		+	-					
0	15	7	14	8	22	Mitsuda	12	3	*10.00	1.26 - 79.34	0.029	
1	56	16	37	35	72		2	5				
2	15	2	10	7	17		31	25	2.06	0.66 - 6.46	0.212	
Total	86	25	61	50	111		6	10				
						+	10	5	9.54	0.38 - 235.79	0.167	
						-	0	2				

Odds Ratio (OR), Intervalo de confiança 95% (IC - p≤ 0,05%), p value (p). \* Dados estatisticamente significantes.

A figura 3 apresenta o comportamento da IgM sorológica anti-PGL-1 e da sIgA salivar anti-LAM nos grupos 1 (Diagnóstico), 2 (Alta PQT) e 4 (Contatos Intradomiciliares), evidenciando diferenças estatisticamente significantes entre os grupos 1 e 2, tanto nos valores da IgM sorológica anti-PGL-1 (Fig. 3A) quanto na sIgA salivar anti-LAM (Fig. 3B).

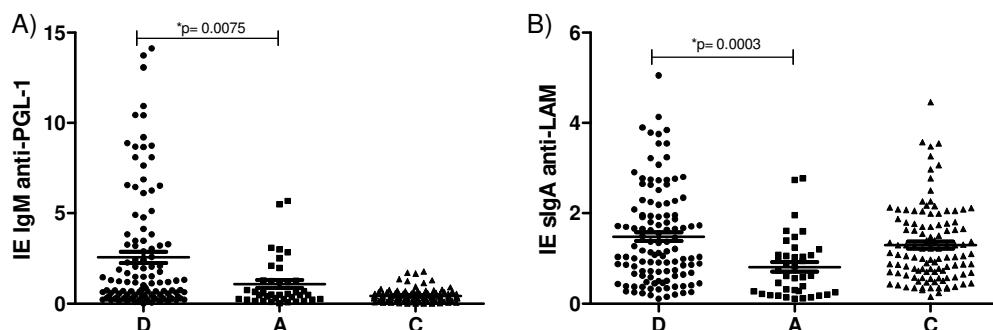


Figura 3. Comportamento da IgM sorológica anti-PGL-1 e sIgA salivar anti-LAM nos grupos Diagnóstico (D); Alta da PQT (A) e Contatos Intradomiciliares (C). A) IgM sorológica. B) sIgA salivar. \* Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos D e A.

### 3.4 Grupo 5 – Controles Endêmicos

O grupo de controles endêmicos (CE) foi composto por 11 voluntários sem histórico pessoal ou familiar de hanseníase. Diferenças significativas foram observadas entre os pacientes do grupo 1 (D) e o grupo 5 (CE)

( $p=0.0329$ ) e entre os grupos 1 e 2 ( $p=0.0003$ ) quanto ao comportamento da IgA salivar (Fig. 4).

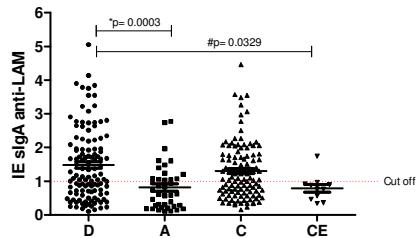


Figura 4. Comportamento da IgA salivar anti-LAM nos grupos: Diagnóstico (D); Alta da PQT (A); Contatos (C) e Controles Endêmicos (CE). \*Diferença entre os grupos D e A ( $p= 0.0003$ ); #diferença entre os grupos D e CE ( $p= 0.0329$ ). O valor 1 (positivo) do IE corresponde ao Cut off de 0.45 de Absorbância (ABS).

#### 4. Discussão

O presente trabalho demonstra a utilização da saliva como instrumento de monitoramento das reações hansênicas utilizando como marcador a IgA secretória salivar anti-LAM.

Atualmente, a prevenção de incapacidades começa com o diagnóstico precoce da hanseníase, com o diagnóstico e tratamento das neurites e reações, e estrategicamente com a identificação de pacientes com risco de desenvolvê-las, visando uma intervenção no tempo adequado. Apesar disso, as incapacidades em pacientes novos com hanseníase e de pacientes que tenham completado o tratamento com poliquimioterapia continuam sendo um desafio(4).

A saliva tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores com o intuito de acrescentar uma possibilidade de exame complementar para diagnóstico e monitoramento de doenças orais e sistêmicas(22, 23). A facilidade de coleta, bem como o fato de oferecer menor risco de contaminação para o profissional de saúde, representam aspectos importantes para subsidiar

a escolha da saliva como meio de diagnóstico(12). A possibilidade de se trabalhar a hanseníase de forma menos invasiva e mais abrangente faz da saliva uma ferramenta promissora, tanto para o diagnóstico quanto para o monitoramento da evolução clínica do tratamento dos pacientes.

O LAM, além de ser o principal antígeno de superfície e um dos fatores dominantes de virulência do *M. leprae*, também apresenta uma estreita relação com reações hansênicas, pois pode promover dano neural em modelo murino por meio da ativação do sistema complemento via MAC (*membrane attack complex*)(1, 6). Nossos dados apontam para uma correlação positiva entre a positividade da sIgA anti-LAM e o surgimento de reações hansênicas, onde 69.4% dos pacientes que apresentaram reações eram anti-LAM positivos no diagnóstico com uma chance 2.3 vezes maior de desenvolver naqueles pacientes com positividade para sIgA. Contudo, a forma clínica com maiores chances (7x maior) foi a BT, e interessantemente, as chances aumentam ainda mais (14x) naqueles pacientes BT-PB, sugerindo o envolvimento de uma resposta celular exacerbada contra o LAM do *M. leprae*. Esses resultados são corroborados pelas evidências de que a deposição de complemento está associada com o LAM de *M. leprae* em lesões e que a positividade nos nervos para LAM também está associada com a deposição de MAC<sup>1</sup>. Suporte adicional na literatura para o envolvimento do LAM com a ocorrência de reações hansênicas vem do fato que mesmo após completar o tratamento o LAM ainda pode ser detectado em biópsias da pele e nervos, com um *clearance* mais lento que outros抗ígenos como o PGL-1(24).

Similar aos estudos que correlacionaram a presença de reações com a classificação operacional MB(3, 25), nossos dados também apontam para uma

maior ocorrência de reações hansênicas em pacientes MB. Os pacientes MB apresentaram diferenças significativas quanto às reações hansênicas, e aqueles que apresentaram sIgA anti-LAM positiva apresentaram chances 4 vezes maiores que os negativos, incluindo ambos os gêneros. Contudo, considerando a positividade da sIgA em todos os pacientes, a chance de desenvolver reações hansênicas é pelo menos 2 vezes maior que os negativos. Os pacientes PB apresentaram expressiva correlação entre a positividade da sIgA salivar anti-LAM e surgimento de reações, onde todos os pacientes desse grupo que desenvolveram reações eram LAM positivo.

O comportamento distinto da sIgA salivar anti-LAM quando se compara doentes e controles endêmicos sugere que o LAM salivar pode ser um marcador de exposição ao *M. leprae*. Esta informação fica fortalecida quando se compara os grupos Diagnóstico, Alta da PQT, Contatos e Controles Endêmicos, onde os doentes tratados (A) e não tratados (D) apresentam distinta média de positividade da sIgA anti-LAM, sugerindo que o monitoramento da PQT pode ser possível com esse marcador. A diferença de resposta imune salivar entre os contatos e os controles endêmicos reforça o papel da IgA anti-LAM como marcador de exposição ao *M. leprae*(26). Interessantemente, pacientes avaliados para a sIgA anti-LAM tanto no diagnóstico quanto na alta da PQT e que mantiveram ou elevaram seus níveis durante o tratamento tiveram maior risco em desenvolver reações hansênicas que aqueles que declinaram os níveis de sIgA anti-LAM, corroborando os resultados obtidos com todos os pacientes com hanseníase, e demonstrando a importância da sIgA anti-LAM como biomarcador preditivo de reações hansênicas.

Nossos resultados com contatos demonstraram que a sIgA anti-LAM correlacionou significativamente com o teste Mitsuda positivo, sugerindo que a positividade para anti-LAM na saliva pode ser usada como um indicador de resistência à hanseníase, seja por exposição prévia ou resistência natural. Esses resultados são corroborados com dados da literatura que demonstram que a reatividade positiva da resposta de IgG à LAM foi significativamente aumentada em pacientes vacinados com BCG e nos pacientes com tuberculose ativa, e a vacinação oral com BCG também induziu o aumento significativo de IgA secretória à LAM. Os autores sugerem que ensaios com imunoglobulinas reativas à LAM podem servir de marcadores de resposta humoral e celular em futuras vacinas com BCG e/ou de micobactérias atenuadas<sup>(11)</sup>. Esses resultados também foram corroborados em outro estudo por aumentos significativos observados para IgGs específicas anti-LAM após vacinações primária e reforço de BCG(27). Embora a exposição prévia ao *M. leprae* também possa gerar respostas humoral e celular, é provável que a presença de sIgA na saliva dos contatos também possa sugerir imunização oral, correlacionando com a resposta celular caracterizada pelo teste Mitsuda positivo, que foi realizado após a coleta da saliva durante a primeira análise do contato. Estudos prévios indicam transmissão subclínica generalizada do *M. leprae* com infecção transitória no nariz, e possivelmente na cavidade oral(28), resultando no desenvolvimento de uma resposta imune mucosa, que pode ser protetora(29). Resta saber se os contatos negativos na saliva para sIgA anti-LAM, juntamente com outros parâmetros, como a ausência de cicatriz para BCG e presença de PGL-1 no soro, representam maior risco em adoecer.

Em resumo, o monitoramento da sIgA anti-LAM na saliva de pacientes com hanseníase em tratamento pode se tornar uma importante ferramenta na detecção de grupos de risco para desenvolvimento de reações hansênicas, principalmente tipo 1, e a positividade nos contatos sugere maior resistência à hanseníase, porém a possibilidade de estar indicando exposição ao *M. leprae* deve ser investigada.

## 5. Referências Bibliográficas

1. Nawal Bahia El Idrissi PKD, Kees Fluiter, Patricia S. Rosa, Jeroen Vreijling, Dirk Troost, B. Paul Morgan, Frank Baas, Valeria Ramaglia. *M. leprae* components induce nerve damage by complement activation: identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator. *Acta Neuropathol.* 2015.
2. Lockwood DN, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bull World Health Organ.* 2005 Mar;83(3):230-5. PubMed PMID: 15798849. Pubmed Central PMCID: 2624210.
3. Antunes DE, Araujo S, Ferreira GP, Cunha AC, Costa AV, Goncalves MA, et al. Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2013 Nov;108(7):901-8. PubMed PMID: 24271045. Pubmed Central PMCID: 3970646.
4. Anne Kelly Azevedo Kil CMS, Lara Miranda Kaminice, Lídia Batista Quintino, Lorena Borges de Lima, Mariana Barbosa Paranhos, Themissa Helena Voss, Ana Carolina Sousa Rodrigues da Cunha, Deyse Alves Montalvão Mainenti, Isabela Maria Bernardes Goulart. Deficiências e Incapacidades por Hanseníase: avaliação clínica e epidemiológica dos pacientes atendidos em um Centro de Referência Nacional do Brasil. *Hansen Int.* 2012;37(1):25-33.
5. Catharina J Alberts WCSS, Abraham Meima, Lamei Wangd & Jan Hendrik Richardusa. Potential effect of the World Health Organization's 2011–2015 global leprosy strategy on the prevalence of grade 2 disability: a trend analysis. *BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION.* 2011;89:487-95.
6. Ramaglia V, King RH, Nourallah M, Wolterman R, de Jonge R, Ramkema M, et al. The membrane attack complex of the complement system is essential for rapid Wallerian degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2007 Jul 18;27(29):7663-72. PubMed PMID: 17634361.
7. Chatterjee D, Khoo KH. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology.* 1998 Feb;8(2):113-20. PubMed PMID: 9451020.
8. Brennan PJ, Hunter, S.W., McNeil, M., Chatterjee, D. and Daffe, M. . Reappraisal of the chemistry of mycobacterial cell walls, with a view to understandung the roles of individual entities in disease processes. In Ayoub,E.M., Cassell,G.H., Branche,W.C.,Jr. and Henry,T.J. (eds.) *Microbial Determinants of Virulence and Host Response.* American Society for Microbiology, Washington, DC. 1990:55-75.
9. Porcelli SA, Segelke BW, Sugita M, Wilson IA, Brenner MB. The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules. *Immunology today.* 1998 Aug;19(8):362-8. PubMed PMID: 9709504.
10. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nature reviews Immunology.* 2007 Dec;7(12):929-41. PubMed PMID: 18037897.
11. Brown RM, Cruz O, Brennan M, Gennaro ML, Schlesinger L, Skeiky YA, et al. Lipoarabinomannan-reactive human secretory immunoglobulin A responses induced by mucosal bacille Calmette-Guerin vaccination. *The Journal of infectious diseases.* 2003 Feb 1;187(3):513-7. PubMed PMID: 12552438.
12. MOURA SABM, A.M.C.; COSTA, F.R.H.; MORAES, P.H.; OLIVEIRA FILHO, S.A. Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão da Literatura. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2007;7:187-94.
13. Nagao-Dias AT, Almeida TL, Oliveira Mde F, Santos RC, Lima AL, Brasil M. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. *The Brazilian journal of infectious*

- diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases. 2007 Apr;11(2):215-9. PubMed PMID: 17625764.
14. Organization) WWH. WHO Expert Committee on Leprosy: seventh report. Geneva, Switzerland. 1998.
15. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 1966 Jul-Sep;34(3):255-73. PubMed PMID: 5950347.
16. Ridley DS. Skin biopsy in leprosy. Document Geigy 3<sup>a</sup> ed Basle: CIBA-GEIGY. 1990:63.
17. Goulart IM, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Goncalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2008 Jan;15(1):101-5. PubMed PMID: 17989339. Pubmed Central PMCID: 2223848.
18. Cho SN, Cellona RV, Fajardo TT, Jr., Abalos RM, dela Cruz EC, Walsh GP, et al. Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association. 1991 Mar;59(1):25-31. PubMed PMID: 2030314.
19. Calado KIS, Vieira, A. G., Durães, S., Sékula, S. B. and Oliveira, M. L. W. Positividade sorológica antiPGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2005;80:301.
20. Shuring RP, Moet, F.J., Pahan, D., Richardus, J. H. and Oskam, L. Association between anti-PGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. Leprosy Rev 2006;77:343.
21. SANTOS PPAI, D.P.P.; SOUZA, E.L.; FREITAS, R.A.; GALVÃO, H.C. Saliva: Métodos Atuais para Coleta e Obtenção da Amostra. R Fac Odontol Porto Alegre. 2007;48(n.1/3):95-8.
22. Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. Journal. 2002 Mar;68(3):170-4. PubMed PMID: 11911813.
23. Yarat A, Tunali T, Pisiriciler R, Akyuz S, Ipbuker A, Emekli N. Salivary thromboplastic activity in diabetics and healthy controls. Clinical oral investigations. 2004 Mar;8(1):36-9. PubMed PMID: 14652732.
24. Verhagen C, Faber W, Klatser P, Buffing A, Naafs B, Das P. Immunohistological analysis of in situ expression of mycobacterial antigens in skin lesions of leprosy patients across the histopathological spectrum. Association of Mycobacterial lipoarabinomannan (LAM) and *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid-I (PGL-I) with leprosy reactions. The American journal of pathology. 1999 Jun;154(6):1793-804. PubMed PMID: 10362804. Pubmed Central PMCID: 3277205.
25. Verhagen CE, van der Pouw Kraan TC, Buffing AA, Chand MA, Faber WR, Aarden LA, et al. Type 1- and type 2-like lesional skin-derived *Mycobacterium leprae*-responsive T cell clones are characterized by coexpression of IFN-gamma/TNF-alpha and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. Journal of immunology. 1998 Mar 1;160(5):2380-7. PubMed PMID: 9498780.
26. Ramaprasad P, Cree IA, Oluwole M, Samson PD. Development of a mucosal challenge test for leprosy using leprosin A. Journal of immunological methods. 1995 Dec 27;188(2):239-46. PubMed PMID: 8551052.
27. de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. Infection and immunity. 2005 Oct;73(10):6711-20. PubMed PMID: 16177348. Pubmed Central PMCID: 1230956.
28. MORGADO DE ABREU MAMR, A M. ; ENOKIHARA, M ; NONOGAKI, S ; PRESTES-CARNEIRO, L E ; WECKX, L L M ; ALCHORNE, M M A. *Mycobacterium leprae* is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. Clinical Microbiology and Infection. 2013;20(1):59 - 64.
29. Ramaprasad P, Fernando A, Madhale S, Rao JR, Edward VK, Samson PD, et al. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. Leprosy review. 1997 Dec;68(4):301-15. PubMed PMID: 9503866.

## **Lista de Figuras**

**Figura 1.** Comportamento da sIgA salivar anti-LAM nas Formas Clínicas (FC) do grupo 1 (diagnóstico) e grupo 5 (CE). O valor 1 do Índice ELISA (IE) corresponde ao *Cut off* de 0.45 de Absorbância (ABS). TT: hanseníase tuberculóide; BT: bordeline-tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa. \*Diferença entre as formas TT e BB ( $p=0.02$ ).

**Figura 2.** Comportamento da sIgA salivar anti-LAM em pacientes do grupo 3 no Diagnóstico (D) e no momento da Alta da PQT (A). Figura 2A - indivíduos que apresentaram reações; Figura 2B - indivíduos que não apresentaram reações.

**Figura 3.** Comportamento da IgM sorológica anti-PGL-1 e sIgA salivar anti-LAM nos grupos Diagnóstico (D); Alta da PQT (A) e Contatos Intradomiciliares (C). A) IgM sorológica. B) sIgA salivar. \* Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos D e A.

**Figura 4.** Comportamento da sIgA salivar anti-LAM nos grupos: Diagnóstico (D); Alta da PQT (A); Contatos (C) e Controles Endêmicos (CE).

\*Diferença entre os grupos D e A ( $p= 0.0003$ ); #diferença entre os grupos D e CE ( $p= 0.0329$ ). O valor 1 (positivo) do IE corresponde ao *Cut off* de 0.45 de Absorbância (ABS).

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Distribuição de pacientes de hanseníase virgens de tratamento que desenvolveram ou não reações hansênicas durante ou após PQT, segundo classificação operacional (CO), gênero associado à CO, teste Mitsuda, teste sorológico ELISA IgM anti-PGL-1 e teste salivar ELISA sIgA anti-LAM, obtidos no momento do diagnóstico. \***OR = odds ratio.** IC (95%) = Intervalo de confiança. p = p value. Sistema de leitura do teste Mitsuda reduzido: "negativo" para leituras de até 7 mm (0 – 7 mm) e "positivo" para leituras maiores que 7 mm (> 7mm) (17).

**Tabela 2.** Distribuição dos pacientes de hanseníase por forma clínica, classificação operacional e gênero, associados à presença e ao tipo de reação hansônica e à positividade à IgA secretória anti-LAM. **FC= forma clínica;** **T1= Reação tipo 1(RR);** **T2= Reação tipo 2 (ENR);** **M= Reação Mista.** **Odds Ratio (OR),** IC -Intervalo de confiança 95% (IC - p≤ 0,05%), p value (p). \* Dados estatisticamente significantes. TT: tuberculóide; BT: borderline-tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatosa; LL: lepromatosa. **Classificação operacional:** paucibacilar (PB) e multibacilar (MB).

**Tabela 3.** Análise dos contatos intradomiciliares (grupo 3), considerando fatores prognósticos como o teste de Mitsuda e a presença de cicatriz vacinal de BCG-ID em relação à sIgA salivar anti-LAM. \* **cBCG-ID\*** (-) = pior prognóstico (0 cBCG) e (+) = melhor prognóstico (1 e 2 cBCG). **Mitsuda\*** (-) = pior prognóstico (0 – 3 mm) e (+) = melhor prognóstico ( $\geq$  4 mm). **Mitsuda/cBCG-ID\*** (-) = pior prognóstico(Mitsuda<4/cBCG-ID=0) e (+) = melhor prognóstico (Mitsuda $\geq$ 4 / cBCG-ID $\geq$ 1).

**Tabela 4.** Resultado do teste Mitsuda e sIgA salivar anti-LAM com relação à cicatriz vacinal BCG (cBCG). **Odds Ratio (OR), Intervalo de confiança 95% (IC - p≤ 0,05%), p value (p).** \* Dados estatisticamente significantes.

## ANEXO A



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Av. João Naves de Avila, nº 2121 - Bloco A - sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 643/11 DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O ADENDO AO PROTOCOLO REGISTRO  
CEP/UFU 163/09

Projeto Pesquisa: "Avaliação da Mucosa Oral e Caracterização Imunológica da Sílica em Pacientes com Hanseníase".

Pesquisador Responsável: Isabela Maria Bernardes Goulart

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do adendo ao protocolo de pesquisa proposto.

O adendo ao protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento à Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

### SITUAÇÃO: ADENDO AO PROTOCOLO APROVADO

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 07 de outubro de 2011.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
Coordenadora do CEP/UFU

## ANEXO B

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **Projeto de Pesquisa: Avaliação da Mucosa Oral e Caracterização Imunológica da Saliva em Pacientes com Hanseníase**

A hanseníase é uma doença que afeta a pele e os nervos. No início os sintomas são dificilmente notados e por ser transmitida principalmente pelo nariz, este local pode ser precocemente afetado. Durante o desenvolvimento da doença as lesões de pele são mais aparentes e os nervos podem ser irreversivelmente danificados resultando em graves seqüelas. Quanto mais demora para que a doença seja diagnosticada e o tratamento iniciado, maior será o dano. O diagnóstico pode ser dificultado porque os exames atuais não conseguem detectar o bacilo quando eles estão em pequena quantidade no organismo.

Atualmente a hanseníase tem cura e muitos são os esforços para que ela deixe de ser um problema de saúde pública no Brasil. Mas, como não há uma vacina específica contra a hanseníase, é muito importante que se possa identificar os portadores sadios do bacilo que causa a doença, bem como os contatos de pacientes que estejam no estágio inicial da infecção, ainda subclínico, para que se possa definir os grupos que tenham maior risco de desenvolver a hanseníase.

Para isso, a equipe de saúde do Centro de Referencia Nacional Hanseníase/Dermatologia Sanitária (CREDESH/UFU) está propondo uma pesquisa onde deverão ser realizados, além dos exames de rotina, a análise de saliva (por meio de swabs e Salivette) e de biópsias de lesões presentes na cavidade bucal de pacientes e contatos. Cabe ressaltar que todo material utilizado será estéril e descartável, e no caso das biópsias, serão realizadas com anestésico local. O material coletado será enviado ao laboratório do CREDESH/UFU, onde serão realizados os exames e os resultados serão mantidos em sigilo.

É direito do paciente pedir esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e, se concordar em participar da pesquisa, poderá desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

Pelos presentes termos apresentados por este documento, eu,  
\_\_\_\_\_, concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura \_\_\_\_\_.

Pesquisador Responsável: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabela Maria Bernardes Goulart

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

## **RESUMO**

O desenvolvimento de incapacidades no indivíduo acometido por hanseníase é um ponto crítico associado a um contexto de exclusão social e estigma. Compreender os mecanismos moleculares e imunológicos da lesão no nervo induzida pelo *M. leprae* é um passo necessário para o controle da hanseníase, prevenindo sua progressão para uma lesiva condição neuropática. PGL-1 e LAM são antígenos não proteicos presentes na parede celular do *M. leprae*, encontrados em tecidos humanos infectados, podendo ser identificados na saliva. O presente estudo avaliou por meio do teste ELISA a presença da IgA secretória salivar (sIgA) anti-PGL-1 e anti-LAM em pacientes com hanseníase e seus contatos. Diferenças significativas ocorreram entre os valores do Índice ELISA anti-PGL-1 do grupo de pacientes e dos controles endêmicos ( $p = 0.01$ ). Quanto às formas clínicas foi observada associação entre a positividade do IE salivar e o surgimento de reações hansênicas nas formas BT ( $OR\ 7.12$ ; IC 2.07 – 24.54;  $p= 0.002$ ). Com relação ao LAM, os pacientes paucibacilares (PB) apresentaram associação entre a positividade da sIgA anti-LAM e o surgimento de reações hansênicas, onde todos os pacientes desse grupo que desenvolveram reações eram LAM positivo ( $OR=19.34$ ;  $p=0.048$ ). Foi observado comportamento distinto da sIgA anti-LAM entre os grupos pacientes virgens de tratamento, pacientes tratados com PQT, contatos e controles endêmicos. Nossos dados sugerem que o monitoramento da sIgA anti-PGL-1 e anti-LAM nos pacientes em tratamento pode se tornar uma importante ferramenta na detecção de grupos de risco para desenvolvimento de reações hansênicas.

**Palavras-chave:** IgA secretória, saliva, LAM, PGL-1, hanseníase, contatos intradomiciliares, pacientes.

## **ABSTRACT**

The development of disability in the individual affected by leprosy is a critical point associated with a context of social exclusion and stigma. Understanding the molecular and immunological mechanisms of nerve injury induced by *M. leprae* is a necessary step for the control of leprosy, preventing progression to harmful neuropathic conditions. Non-protein antigens PGL-1 and LAM present in the cell wall of *M. leprae* found in infected human tissues can be identified in saliva. This study evaluated by ELISA tested the presence of salivary secretory IgA (sIgA), anti-PGL-1, and anti-LAM in leprosy patients and their contacts. Significant differences occurred between the values of the ELISA Index (EI) anti-PGL-1 level of patients and endemic controls ( $p = 0.01$ ). In clinical forms an association between positive salivary EI and the appearance of leprosy reactions in BT forms (OR 7.12, CI 2.07 - 24.54,  $p = 0.002$ ). Regarding LAM, the paucibacillary patients (PB) showed an association between the positivity of sIgA anti-LAM and the appearance of leprosy reactions, in which all the patients in this group who developed reactions were LAM positive (OR = 19.34;  $p = 0.048$ ). Distinct behavior was observed in sIgA anti-LAM among naïve patient treatment groups, patients treated with MDT, contacts, and endemic controls. Our data suggest that monitoring of sIgA anti-PGL-1 and anti-LAM in patients undergoing treatment can become an important tool in detecting risk groups for development of leprosy reactions.

**Key Words:** secretory IgA, saliva, LAM, PGL-1, leprosy, household contacts, patients