

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**HANSENÍASE EM IDOSOS: ANÁLISE COMPARADA DA  
EXPRESSÃO GÊNICA DE VDR E IFNG**

**MYLENA MASSENO DE PINHO PEREIRA**

**RIO DE JANEIRO**

**2018**



UNIRIO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
INSTITUTO BIOMÉDICO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**MYLENA MASSENO DE PINHO PEREIRA**

HANSENÍASE EM IDOSOS: ANÁLISE COMPARADA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VDR E IFNG

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina. Área de concentração: Imunologia.

Orientadora Científica: Dr<sup>a</sup>. Danuza de Almeida Esquenazi

Coorientador Científico: MSc. Pedro Henrique Lopes da Silva

Orientadora Acadêmica: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria Tavares Haido

Rio de Janeiro

2018

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Masseno de Pinho Pereira, Mylena

Hanseníase em Idosos: Análise Comparada da Expressão Gênica de VDR e IFNG / Mylena Masseno de Pinho Pereira – Rio de Janeiro, 2018.

62 f.

Orientador: Danuza de Almeida Esquenazi.

Coorientador: Pedro Henrique Lopes da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Instituto Biomédico, 2018.

1. Hanseníase. 2. Envelhecimento. 3. Imunossenescência. 4. Expressão gênica. I. Esquenazi, Danuza. II. Lopes da Silva, Pedro Henrique. III. Hanseníase em Idosos: Análise Comparada da Expressão Gênica de VDR e IFNG

**MYLENA MASSENO DE PINHO PEREIRA**

**HANSENÍASE EM IDOSOS: ANÁLISE COMPARADA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
VDR E IFNG**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração Imunologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria Tavares Haido

Dr<sup>a</sup>. Danuza de Almeida Esquenazi

MSc. Pedro Henrique Lopes da Silva

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento, UNIRIO

---

MSc. Luciana Nahar dos Santos, FIOCRUZ

---

MSc. Tamiris Lameira Bittencourt, FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 15 de janeiro de 2017

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, aos meus pais por possibilitarem a realização dessa conquista através de toda dedicação, incentivo e apoio incondicional. Sem vocês, nada seria possível. Amo vocês! Obrigada!

Agradeço também, aos professores e funcionários da UNIRIO, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse sonho.

As amigas que construí na Universidade, que foram muito importantes nesses quatro anos, me apoiando em todos os momentos, e que espero que continuem presentes em minha vida.

Aos colegas de laboratório, pela contribuição dada a minha formação, em especial à Dilzamar pela atenção durante o começo da minha iniciação científica e à Mayara por todo o tempo dedicado aos ensinamentos com o RT-qPCR.

Aos meus orientadores, Danuza e Pedro, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho. Um agradecimento especial deve ser feito ao meu Coorientador Pedro, por toda paciência e tempo dedicados na realização do presente trabalho, assim como na revisão da redação. Muito obrigada!

## RESUMO

Os mecanismos pelos quais a hanseníase acomete alguns indivíduos apenas na terceira idade ainda não são completamente conhecidos, entretanto, processos comuns ao envelhecimento do organismo como a involução tímica, perda de função da resposta imune em decorrência de estímulos crônicos e a inflamação crônica de baixo grau presente nos idosos, parecem contribuir para o comprometimento da imunovigilância e conseqüentemente aumentam a susceptibilidade contra a doença. O conjunto desses fenômenos observados nos idosos é denominado de imunossenescência, que, além de contribuir para o aumento da susceptibilidade à infecções, ao câncer e à autoimunidade, induz a diminuição da resposta vacinal. Desta forma, com o intuito de aprofundar os conhecimentos em torno do desenvolvimento da hanseníase em idosos, realizamos a análise da expressão de genes relacionados com susceptibilidade e imunossenescência no aparecimento da hanseníase em indivíduos acima de 60 anos acompanhados no Ambulatório Souza Araújo/FIOCRUZ. Este estudo contou com a participação de 20 pacientes portadores de hanseníase multi- e paucibacilar e buscou aprofundar os conhecimentos acerca da expressão de dois importantes genes ligados à imunomodulação da hanseníase, IFNG e VDR, durante o envelhecimento. Dentre os resultados obtidos, destacou-se a semelhança dos níveis de expressão gênica do IFNG entre os dois grupos estudados, bem como a tendência de aumento da expressão do gene VDR no grupo paucibacilar, sugerindo que este aumento possa estar relacionado com a baixa expressão do IFNG no grupo paucibacilar, uma vez que o VDR é responsável pelo desvio da resposta T<sub>H</sub>1 para T<sub>H</sub>2. Além disso, na correlação entre a expressão gênica e a idade dos pacientes estudados, houve um aumento significativo da expressão de VDR de acordo com a idade no grupo paucibacilar, assim como uma tendência de decréscimo na expressão do VDR de acordo com a idade no grupo multibacilar, mostrando que o receptor de vitamina D pode ter um papel importante no prognóstico da forma clínica da doença durante o envelhecimento.

Palavras chave: hanseníase, envelhecimento, imunossenescência, expressão gênica

## ABSTRACT

Even though the specific mechanisms that trigger leprosy only in elderly individuals still require clarification, some processes usually observed during ageing, such as thymic involution, loss of effective immune responses against chronic stimulation, and low-level chronic inflammation verified among elderly, seem to contribute to an impaired immune surveillance, thus increasing the susceptibility to the disease. The set of these phenomena observed in elderly is known as immunosenescence, that, in addition to contributing to an increased susceptibility to infections, to cancer and to self-immune diseases, induces a decreased response to vaccines. So, to reach deeper knowledge on the development of leprosy in elderly, we analyzed the expression of susceptibility- and immunosenescence -related genes in the presentation of leprosy in individuals above 60-years old, under follow-up at the Souza Araújo Outpatient Unit/FIOCRUZ. This study assessed 20 leprosy patients showing both multi- and paucibacillary forms, and intended to reach new knowledge on the expression at ageing of two relevant genes related to leprosy immunomodulation, namely IFNG and VDR. Among our results, we emphasize the similarity between the two studied groups as to their gene expression levels of IFNG, as well as a tendency towards increased VDR gene expression among paucibacillary patients, thus suggesting a possible relation between such increase and the low expression of IFNG in said group, as VDR is responsible for deviating  $T_H1$  response into  $T_H2$ . Moreover, as we correlated gene expression and the age of studied patients, we noted a significantly increased VDR expression according to the age of patients within the paucibacillary group, and a tendency to decreased VDR expression according to the age of multibacillary patients. This result discloses a possible relevant role of vitamin D receptor to the prognostic of the clinical form of the disease during ageing.

Key words: leprosy, ageing, immunosenescence, gene expression



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2015.

**Figura 2** - Espectro de formas clínicas e resposta imune ao *M. leprae* de acordo com a classificação de Ridley e Jopling.

**Figura 3** - Tratamento da Hanseníase. Cartelas com comprimidos da Poliquimioterapia (PQT) para tratamento das formas PB e MB conforme preconizado pela OMS.

**Figura 4** - Avaliação da expressão de genes relacionados com susceptibilidade à hanseníase nos grupos PB e MB.

**Figura 5** - Correlação entre índice baciloscópico e expressão gênica de IFNG e VDR em pacientes multibacilares.

**Figura 6** - Correlação entre idade e expressão gênica de IFNG em pacientes PB e pacientes MB.

**Figura 7** - Correlação entre idade e expressão gênica de VDR em pacientes PB e MB.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Comparação das características genômicas entre *M. leprae* e *M. tuberculosis*.

**Tabela 2** – Caracterização clínica e demográfica dos indivíduos estudados.

**Tabela 3** – Expressão relativa de cada gene por paciente.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASA - Ambulatório Souza Araújo  
BAAR - bacilo álcool-ácido-resistente  
BB - Forma clínica *Borderline Borderline*  
BCG- Bacilo Calmette-Guérin  
BL - Forma clínica *Borderline* Lepromatosa  
BT - Forma clínica *Borderline* Tuberculóide  
cDNA – Ácido Desoxiribonucléico complementar  
DC – do inglês, células dendríticas  
ENH - Eritema Nodoso Hansênico  
GI - Grau de incapacidade  
GM-CSF – do inglês, fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos  
HLA – do inglês, Antígeno Leucocitário Humano  
IB - índice baciloscópico  
IFNG – Interferon Gama (gene)  
IFN- $\gamma$  - Interferon gama (citocina)  
Ig - imunoglobulina  
IL - Interleucina  
LAHAN - Laboratório de Hanseníase  
IOC – Instituto Oswaldo Cruz  
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz  
LL – Forma clínica Lepromatosa Lepromatosa  
MB – forma clínica multibacilar  
mRNA – Ácido Ribonucléico mensageiro  
MS - Ministério da Saúde  
NK – do inglês, Natural Killer  
NO – do inglês, óxido nítrico  
NOD – do inglês, proteína contendo domínio de oligomerização nucleotídica  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PACRG - gene corregulador da parquina  
PAMPs – do inglês, receptores de reconhecimento padrão  
PARK2 - parquina

PB – Forma clínica paucibacilar  
PCR – do inglês, Reação em cadeia da polimerase  
PGL-1 – do inglês, Glicolípido fenólico 1  
PQT - poliquimioterapia  
RF – do inglês “RNAase free”, livre de RNAse  
RR - Reação Reversa  
SNP – do inglês, polimorfismo de nucleotídeo único  
TLR – do inglês, receptor do tipo Toll  
TNF – do inglês, fator de necrose tumoral  
TT – Forma clínica Tuberculóide Tuberculóide  
VDR – do inglês, receptor de vitamina D

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais da hanseníase .....	1
1.2 Epidemiologia.....	3
1.3 Agente Etiológico.....	5
1.4 Mecanismo de Transmissão.....	7
1.5 Diagnóstico.....	8
1.6 Formas clínicas e estratégias terapêuticas .....	10
1.7 Mecanismos gerais da resposta imune ao <i>M. leprae</i> .....	13
1.8 Aspectos genéticos .....	14
1.9 Imunossenescência.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS .....	23
3.1 Principal .....	23
3.2 Específicos .....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
4.1 População de Estudo, Biossegurança e Considerações Éticas .....	24
4.2 Extração de RNA.....	25
4.3 Quantificação e avaliação da pureza do RNA .....	26
4.4 Síntese de cDNA .....	26
4.5 Quantificação da expressão gênica de fatores transcricionais por PCR quantitativo em tempo real (RTqPCR) .....	27
4.6. Análise dos dados obtidos a partir de RT-PCR em tempo real .....	27
4.7. Análise estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes.....	29
5.2 Avaliação da expressão dos genes relacionados com susceptibilidade à hanseníase nos idosos.....	30
5.3 Correlação entre a expressão gênica e o índice baciloscópio (IB) dos pacientes multibacilares (MB). .....	32

5.4	Correlação entre a expressão gênica e a idade em pacientes paucibacilares e multibacilares. ....	33
6	DISCUSSÃO .....	36
7	CONCLUSÕES.....	41
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos históricos da hanseníase

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, considerada como a doença humana causada por um micro-organismo, mais antiga conhecida (Pinto, 1995). O mal de Hansen é causado pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular obrigatório que apresenta tropismo por macrófagos da pele e células de Schwann, pode ser considerada como duas doenças conjugadas. A primeira vertente está relacionada à infecção micobacteriana crônica que desencadeia uma forte resposta imunológica no hospedeiro, e a segunda corresponde a uma neuropatia periférica iniciada pela infecção e agravada pela resposta imune (Scollard et al, 2006). A doença é caracterizada por lesões na pele e nervos periféricos, causando perda da sensibilidade, deformações principalmente nos pés, mãos e face e até mesmo cegueira (Lockwood & Suneetha, 2005).

A etiologia da hanseníase permaneceu controversa por muito tempo, achava-se que a doença poderia ser transmitida por vetor, estar associada às condições de insalubridade e falta de higiene e até mesmo possuir caráter hereditário. Entretanto, em 1874, a descoberta do *M. leprae* em células provenientes de tubérculos cutâneos, pelo Dr. Gerhard Armauer Hansen, foi de extrema importância para a compreensão da doença. Infelizmente, devido à impossibilidade do cultivo *in vitro* e *in anima vili*, a teoria de Hansen só foi aceita em 1897 durante o Primeiro Congresso Internacional de Lepra, realizado em Berlin (Benchimol et al, 2004).

Embora não seja possível determinar onde e quando a doença de fato surgiu, existem registros que descrevem a doença assim como conhecemos atualmente já em 1400 a.C. na Índia, com registros a respeito de possíveis tratamentos datando de 600 a.C., e documentos antigos que sugerem que a doença possa ter surgido na Índia, China ou Oriente Médio, possivelmente em mais de um desses locais ao mesmo tempo. Sua disseminação pela Europa ocorreu provavelmente através de soldados durante batalhas para conquista de novos territórios como, por exemplo, as Cruzadas (Trautman, 1984).

A origem da palavra “lepra” está vinculada à tradução bíblica da palavra “tsaraath” do hebraico para o grego em 300 a.C., e está muito relacionada com o estigma da doença até os dias atuais (Trautman, 1984). Entretanto, no Brasil, o uso

da palavra “lepra” em documentos oficiais foi proibido pela Lei nº 9.010, de 29 de março de 1995, sancionada pelo então presidente Fernando Henrique Cardoso.

A doença foi muito prevalente na Europa durante a Idade Média, entre os anos 1000 a 1400, quando indivíduos portadores da hanseníase eram extremamente segregados da sociedade. Durante este período acreditava-se que a doença estava relacionada à uma vida desregrada e pecaminosa, visto que durante tal época “o corpo era considerado um reflexo da alma”. A discriminação aos leprosos era disseminada, atrelando-se aos mesmos diversos comportamentos imorais, sendo a doença considerada a pior das desgraças possíveis (Pinto, 1985).

Tal discriminação aos indivíduos hansênicos, deu origem, durante este período, aos leprosários ou lazaretos, que consistiam em locais isolados para onde os indivíduos acometidos pela hanseníase eram enviados. Esses estabelecimentos encontravam-se espalhados por toda a Europa e tinham como objetivo confinar os pacientes. Além disso, em muitos lugares, esses indivíduos eram identificados por sinos, matracas ou vestuário diferenciado e muitos eram banidos de seus países ou até mesmo, executados (Trautman, 1984).

A diminuição da prevalência da Hanseníase na Europa está relacionada principalmente a dois fatores, primeiro às grandes pragas que atingiram a região neste período e foram responsáveis pela morte de milhões de pessoas, principalmente aquelas já doentes, e segundo pela posterior melhoria da qualidade de vida da população (Pinto, 1995).

Nas Américas, a introdução da doença ocorreu pelos colonizadores europeus e, principalmente, pelos escravos trazidos da África (Trautman, 1984). No Brasil, os primeiros relatos da doença acompanham o período de colonização, sendo que os estados do Rio de Janeiro e da Bahia, locais de maior concentração e movimentação de pessoas, apresentaram um aumento da prevalência da hanseníase mais precocemente. A introdução da doença no estado de São Paulo ocorreu mais tardiamente e esteve relacionada ao ciclo do ouro e, posteriormente, à expansão agrícola (Monteiro, 1987).

No Brasil, durante o século XIX, diversos asilos voltados a indivíduos hansênicos foram construídos, tanto com fundos governamentais como privados. Entretanto, as condições de tais abrigos eram quase invariavelmente precárias devido à falta de recursos. Por outro lado, o principal objetivo dos asilos não era o tratamento



dos doentes e sim a proteção da população sadia, por meio da reclusão dos pacientes (Monteiro, 1987).

Em 1941, um marco importante ocorreu quando o Dr. Guy Faget iniciou o uso da sulfona no tratamento da hanseníase, o que resultou em uma melhor perspectiva de vida para os pacientes e na diminuição da segregação aos mesmos. Sendo que, em 1963, o Decreto Federal normativo nº 962, extinguiu o isolamento compulsório dos pacientes, colocando um fim nos asilos voltados para essa população (Trautman, 1984; Monteiro, 1987).

## 1.2 Epidemiologia

Desde sua fundação em 1948, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem demonstrado compromisso com a redução das doenças tropicais negligenciadas, que correspondem à doenças que atingem principalmente a população mais pobre, estando relacionadas às condições precárias de saneamento e acesso aos serviços de saúde, além de contribuírem para a marginalização de parte da população. Em seu primeiro relatório sobre doenças negligenciadas, a OMS incluiu dezessete doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, protozoários e helmintos que pertencem a esta categoria, entre elas encontrava-se a hanseníase (WHO, 2013).

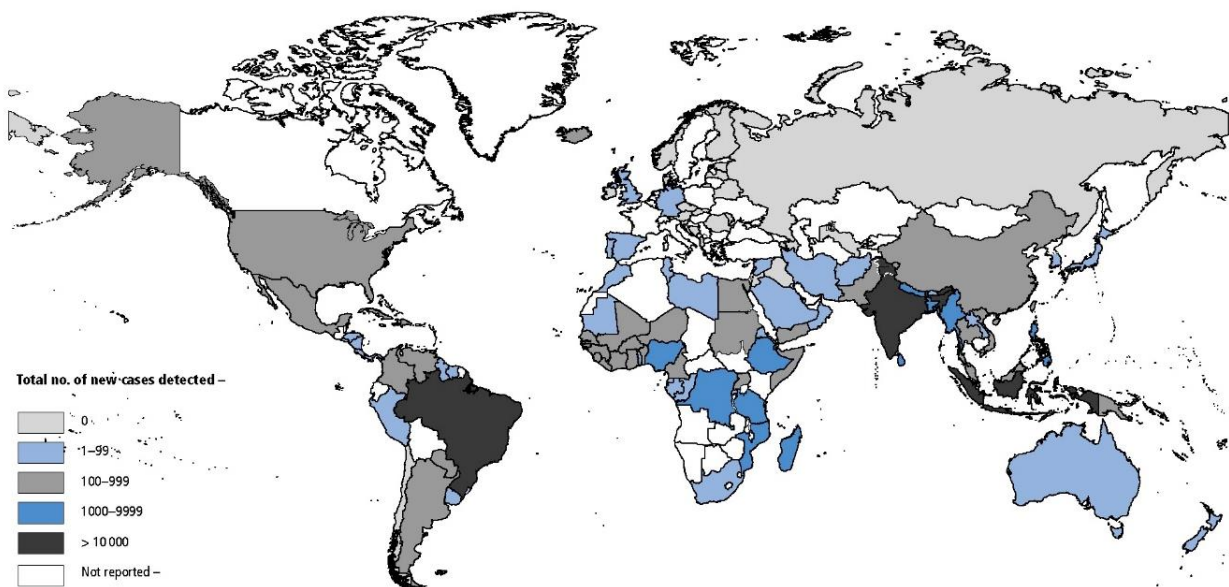
Em 1991, a OMS estabeleceu uma meta para a eliminação da hanseníase como um problema de saúde pública, sendo considerada eliminação uma taxa de prevalência inferior a 1 caso para cada 10.000 indivíduos (Lockwood & Suneetha, 2005). Apesar da introdução da poliquimioterapia (PQT) como tratamento da hanseníase em 1982 ter sido eficiente e permitir a cura da infecção pelo *M. leprae*, segundo Scollard, a hanseníase não está próxima da erradicação. Visto que apesar da diminuição do número de casos registrados ao redor do mundo, o número de novos casos registrados permanece constante, chegando inclusive a apresentar um aumento em alguns países endêmicos para a doença (Scollard et al, 2006). Mesmo assim, a prevalência de mais de 1 caso por 10.000 indivíduos diminuiu de 122 países em 1985 para 12 países em 2002, entre estes últimos encontram-se Brasil, Índia, Madagascar, Moçambique, entre outros (Lockwood & Suneetha, 2005).

Por outro lado, há evidências claras de que as estratégias de eliminação da doença têm sido eficientes, uma vez que nos últimos 17 anos a prevalência global caiu quase 90%, com mais de 13 milhões de pacientes curados. Tais estratégias

incluem principalmente o acesso apropriado ao diagnóstico e a disponibilidade ao tratamento, e, para isto, faz-se necessário a integração dos serviços de hanseníase no sistema nacional de saúde de cuidados primários (WHO, 2004).

A estratégia global para hanseníase proposta pela OMS para o intervalo entre 2016-2020: “Acelerando para um mundo sem lepra” lançado em abril de 2016, baseia-se na iniciativa de ações que promovam a inclusão e garantam a responsabilidade dos governos. Esta estratégia tem como objetivos principais evitar o grau de incapacidade 2, que consiste em um indicador da presença de incapacidades e deformidades do tipo lagofalmo, garras, reabsorção óssea, mãos e pés caídos. Além disso, essa estratégia visa zerar o número de países com legislação que permitam a discriminação com base na hanseníase (WHO, 2015).

Em 2015, o número de novos casos de hanseníase relatados na Índia foi de 127.326 correspondendo a 60% do total de novos casos, o Brasil aparece em segundo, com 26.395 novos casos relatados, ou seja 13% do total, já a Indonésia reportou um total de 17.202 novos casos, ou 8% do total. A Figura 1 representa a distribuição global de novos casos de hanseníase relatados em 2015. (WHO, 2015)



**Figura 1. Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2015.** Extraído de WHO, 2016.

No Brasil, a partir de 2011, o Ministério da Saúde (MS) revisou as estratégias adotadas em relação às doenças negligenciadas e em 2013 lançou a primeira “Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses e Tracoma”, tendo como um dos

objetivos a identificação de novos casos de hanseníase em menores de 15 anos a partir do preenchimento de fichas de autoimagem recolhidas pelas escolas (MS, 2016<sup>a</sup>). A Hanseníase continua sendo uma doença endêmica no Brasil, e, apesar da diminuição da prevalência da doença nos últimos anos, a mesma ainda apresenta um coeficiente de 1,10 pacientes para cada 10 mil habitantes, tendo apresentado em 2016 cerca de 25 mil novos casos (MS, 2016<sup>b</sup>).

A análise da prevalência da doença por região brasileira, apresenta dados bastante desiguais, sendo as regiões Norte e Centro-Oeste as que apresentam uma maior taxa de prevalência, com valores de 2,37 e 2,91 casos por 10.000 habitantes respectivamente. Enquanto que as regiões Sul e Sudeste apresentam as menores taxas de prevalência com valores de 0,25 e 0,35 casos por 10.000/habitantes. A região Nordeste tem uma taxa de prevalência de 1,77/10 mil hab, mas apresenta maior número de novos casos da doença, cerca de 11.000 no ano de 2016. (MS, 2016<sup>c</sup>).

Com relação à população idosa, o Ministério da Saúde vem alertando para a necessidade de maior organização dos serviços de atenção visando um envelhecimento saudável, uma vez que esta população vem crescendo. No Brasil, há cerca de 28 milhões de pessoas com 60 anos ou mais, o que corresponde a 13,7% da população total do país, a quinta maior população idosa do mundo. Uma análise realizada pela Fundação Oswaldo Cruz, com dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS, 2013), mostra que um em cada três idosos brasileiros apresentava alguma limitação funcional. Dentre tais limitações encontra-se as decorrentes da hanseníase, cujo percentual de novos casos nesta faixa etária aumentou de forma progressiva, passando de 16% em 2001 para 22% dos casos detectados em 2013 (MS, 2016<sup>d</sup>; Nobre, 2016).

### **1.3 Agente Etiológico**

O *Mycobacterium leprae* é uma bactéria microaerófila, que não apresenta estruturas locomotoras e não forma esporos, possui crescimento lento e quando observada em microscopia ótica apresenta forma de bastonete. É um bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR) uma vez que se utilizando o método de Ziehl-Neelsen o bacilo é corado em vermelho pela fucsina e não sofre descoloração pela lavagem com álcool e ácido. Além disso, o *M. leprae* é incapaz de crescer em meios de cultura artificiais, sendo necessário a utilização de modelos animais para a proliferação do bacilo

(Scollard et. al., 2006). Em 1959, Shepard desenvolveu a técnica de cultivo do *M. leprae* em coxim plantar de camundongos (Shepard, 1960), e, posteriormente a Dra. Eleanor Storrs introduziu a utilização do tatu de nove bandas, *Dasybus novencintus* (Trautman, 1984).

A parede celular do bacilo de Hansen é formada principalmente por peptidoglicano, arabinoglicano e ácido micólico, de forma semelhante à composição da parede celular de outras micobactérias. A região da parede celular mais próxima da membrana plasmática (core) é formada por peptidoglicano e cadeias ramificadas de arabinana ligadas ao galactano. Além disso, a micobactéria apresenta uma região semelhante a uma cápsula, formada por glicolípidos fenólicos (PGL) e fosfatidilinositol liberados da parede celular após sua síntese (Scollard et. al., 2006). Nesta região, o PGL-1 é o lipídeo dominante, sendo de extrema importância para a especificidade imunológica contra o *M. leprae* (Spencer et. al., 2011), além de estar relacionada com a interação do bacilo e as células de Schwann, resultando em danos nos nervos periféricos (Ng et. al., 2000).

Em 2001, foi publicada a análise completa do genoma do *M. leprae*, que apresenta um tamanho de 3.3 Mb, cuja a relação Guanina + Citosina é igual a 57,8% do total, além disso, apenas 49,5% do genoma do bacilo corresponde a genes responsáveis por codificar proteínas. Em comparação ao *M. tuberculosis* ocorreu uma deleção de genes no processo evolutivo, com menos da metade do genoma contendo genes funcionais, porém, a presença de pseudogenes homólogos do *M. tuberculosis* são abundantes, e essa caracterização está descrita na Tabela 1. Acredita-se que tal redução no genoma do *M. leprae* esteja relacionada à eliminação de certas vias metabólicas e conseqüentemente à impossibilidade de cultivo *in vitro* do bacilo (Cole et al., 2001).

**Tabela 1** - Comparação das características genômicas entre *M. leprae* e *M. tuberculosis*.

<b>Características</b>	<b><i>M. leprae</i></b>	<b><i>M. tuberculosis</i></b>
Tamanho do genoma (bp)	3.268.203	4.411.532
G+C (%)	57,79	65,61
Codificação de proteínas (%)	49,5	90,8
Genes codificadores de proteína (nº.)	1.604	3.959
Pseudogenes (nº.)	1.116	6
Densidade gênica (bp por gene)	2.037	1.114
Comprimento médio do gene (bp)	1.011	1.012

Bp, pares de base. Tabela adaptada de Cole et al., 2001.

#### **1.4 Mecanismo de Transmissão**

A hanseníase consiste em uma doença que apresenta uma alta infectividade, uma vez que o *M. leprae* é capaz de infectar um grande número de indivíduos, porém, o bacilo apresenta uma baixa patogenicidade, já que mesmo em contato com a bactéria poucos indivíduos adoecem (Scollard et al., 2006).

O mecanismo preciso para a transmissão do *M. leprae* ainda é pouco consensual (Scollard et al., 2006), acredita-se que a principal fonte de infecção seja pacientes multibacilares não tratados, que apresentam alta carga bacilar, entretanto, uma outra fonte de infecção possível consiste em indivíduos infectados que não apresentam manifestações clínicas, porém, apresentam a micobactéria na mucosa nasal. Enquanto nenhum bacilo é liberado a partir da pele lesionada dos pacientes hansênicos, um grande número de micobactérias viáveis são liberadas a partir das secreções nasais de indivíduos lepromatosos (Martinez et al., 2011). Desta forma, a mucosa nasal corresponde ao principal sítio de entrada e saída do *M. leprae* estando muito relacionada ao início da infecção (Suneetha et al., 1998). Por outro lado, a importância da mucosa oral também foi demonstrada, vez que Martinez e colaboradores apontaram para uma maior prevalência do *M. leprae* da cavidade oral de pacientes paucibacilares podendo apresentar implicações importantes para a transmissão do bacilo (Martinez et al., 2011).

Outras possíveis formas de transmissão da hanseníase estão relacionadas à inoculação acidental, tatuagem, ou via animais vetores e/ou reservatórios (Scollard et

al., 2006; Deps et al., 2008). Com relação a este último, o tatu silvestre de nove bandas (*Dasyurus novencintus*) é considerado um hospedeiro natural altamente susceptível ao *M. leprae* sendo confirmada a presença de tais animais infectados no centro-sul dos Estados Unidos. O impacto destes animais na infecção pelo *M. leprae* em humanos é difícil de ser determinado, entretanto os tatus são um grande reservatório natural e podem ser um veículo para a exposição a grandes quantidades do bacilo (Scollard et al., 2006). No Brasil, 10,6% dos tatus examinados em um estudo realizado no estado do Espírito Santo apresentam sorologia positiva para o *M. leprae*, e este mesmo estudo apontou para uma associação entre o aumento da incidência da hanseníase e o contato direto com os tatus, principalmente em decorrência da caça e alimentação com a carne de tais animais (Deps et al., 2008).

### **1.5 Diagnóstico**

O diagnóstico da hanseníase é basicamente clínico, estando relacionado à identificação dos sintomas que incluem lesões de pele características e espessamento dos nervos periféricos com perda de sensibilidade e função motora. Além disso, alguns exames podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico principalmente quando há dúvida sobre a classificação operacional do paciente. Entre tais exames encontram-se principalmente a baciloscopia e a análise histopatológica (Saunderson e Groenen, 2000), entretanto, em alguns casos, a reação em cadeia de polimerase (PCR) e a sorologia podem também ser úteis.

A classificação proposta pela OMS para determinação do tratamento poliquimioterápico baseia-se no número de lesões cutâneas, sendo que na presença de até cinco lesões os pacientes são classificados como paucibacilares, já pacientes que apresentam mais que cinco lesões são classificados como multibacilares (WHO, 2000).

A baciloscopia de esfregaço intradérmico corresponde a um exame complementar para o diagnóstico que deve ser utilizada em casos de dúvida na classificação operacional para instituição da poliquimioterapia, para diagnóstico diferencial com outras doenças dermatoneurológicas ou em casos suspeitos de recidiva e o resultado negativo não exclui o diagnóstico para a doença. Além disso, a baciloscopia positiva classifica o paciente como multibacilar independentemente do número de lesões. O exame baciloscópico é um procedimento de baixo custo e fácil

execução, permitindo, portanto, sua realização em qualquer laboratório de Unidade Básica (MS, 2010).

Ademais, o método da hematoxilina e eosina é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico da hanseníase, que consiste na obtenção de amostra de lesão cutânea obtida por biópsia, fixada em formalina tamponada neutra e embebida em parafina. As principais características a serem reconhecidas neste método são os padrões histológicos da resposta imunológica do hospedeiro, e o envolvimento dos nervos cutâneos (Scollard et al., 2006).

A sorologia utilizando PGL-I corresponde a outro exame que, apesar de não poder ser utilizado como critério para diagnóstico da doença, pode ser utilizado de forma complementar. Pacientes lepromatosos produzem uma grande quantidade de imunoglobulinas do tipo IgM que reconhecem o antígeno PGL-1 da bactéria, apresentando uma soropositividade entre 80 e 100%. Já nos pacientes tuberculóides a soropositividade encontra-se em torno de 20 a 50% (Parkash et al., 2008). Segundo Buhner-Sekula e colaboradores, o teste sorológico pode ser de extrema utilidade no acompanhamento dos pacientes, podendo auxiliar na determinação da forma clínica, permitir a identificação precoce de indivíduos com maior probabilidade de desenvolver reações, além de poder ser útil no acompanhamento dos contatos (Buhner-Sekula, 2008). Por outro lado, a sorologia apresenta como ponto negativo o fato de poder estar relacionada a uma infecção passada, além do fato da positividade do exame estar ligada a endemidade do local.

Uma outra forma diagnóstica é por meio de PCR, que corresponde a uma técnica molecular simples e muito sensível, que permite a amplificação de ácidos nucleicos do *M. leprae*. Apesar de tal exame apresentar um custo alto, o que dificulta sua utilização em países pobres onde a hanseníase apresenta maior prevalência, essa técnica vem apresentando uma importância cada vez maior, principalmente em pacientes paucibacilares, cujos títulos de anticorpos anti-PGL-1 são baixos, o que dificulta a detecção por técnicas convencionais, quando a histopatologia é inconclusiva e, principalmente, nos casos de hanseníase neural pura (Banerjee et al., 2011; Martinez et al., 2011; Rosa et al., 2013).

## 1.6 Formas clínicas e estratégias terapêuticas

O desenvolvimento da hanseníase está relacionado a fatores genéticos do hospedeiro assim como a condições ambientais, tais como condições nutricionais, vacinação pelo BCG e nível de exposição ao *M. leprae*. A hanseníase é uma doença que apresenta um amplo espectro clínico cada um deles com características específicas que não podem ser explicadas pela variedade genética do patógeno visto que esta é extremamente baixa, sendo assim, o principal fator para o desenvolvimento das diferentes formas da doença está relacionado à resposta imune do hospedeiro ao bacilo (Moraes et al., 2006). Uma vez infectado pelo bacilo de Hansen, o indivíduo pode evoluir para a cura espontânea ou desenvolver a doença, sendo que devido à baixa patogenicidade do *M. leprae* menos de 5% dos indivíduos infectados são suscetíveis a hanseníase (Scollard et al., 2006).

Até 1966, os indivíduos que desenvolviam a doença eram classificados em dois grupos, pertencendo ao polo lepromatoso (LL) ou ao polo tuberculóide (TT). Porém, em 1966, Ridley e Jopling propuseram uma nova classificação que passou a ser amplamente aceita. Nesta nova classificação, além das duas formas polares da doença (TT e LL), acrescentou-se também três formas intermediárias classificadas como *borderline*.

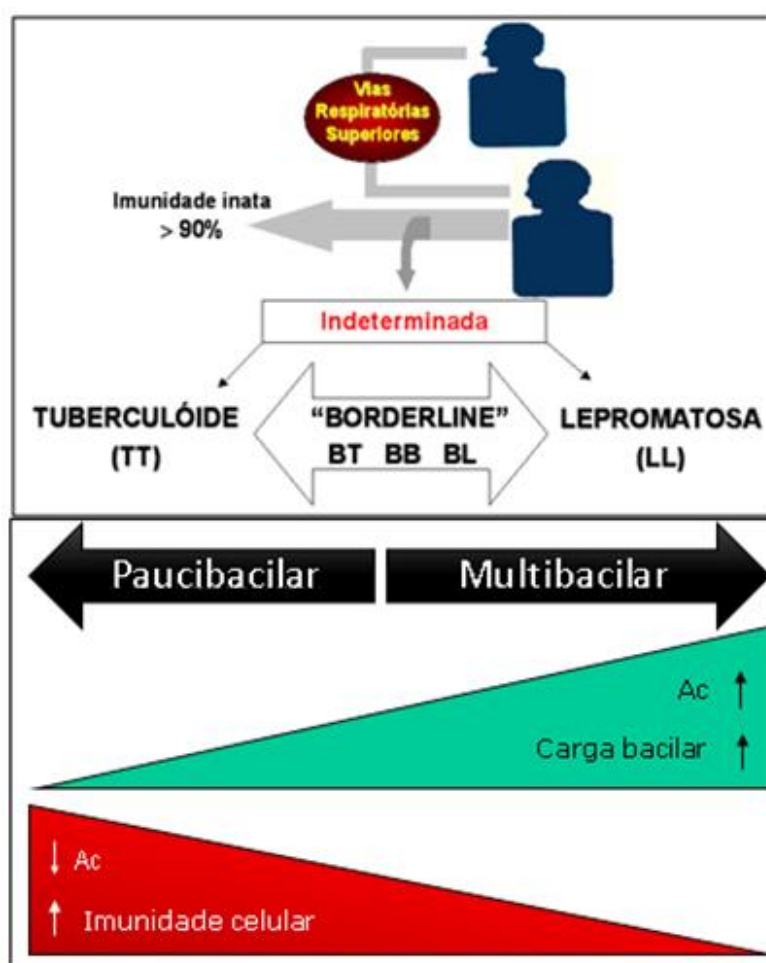
A forma tuberculóide é caracterizada por uma resposta imune celular expressiva e por lesões que se apresentam como grandes placas eritematosas, com as bordas externas elevadas, aparência áspera, sem pelos, escamosas e com perda de sensibilidade. O número de lesões é pequeno, muitas vezes sendo observada apenas uma, além disso, o nervo periférico na proximidade da lesão encontra-se espessado e doloroso. Nestes pacientes, o teste cutâneo da lepromina (reação de Mitsuda) geralmente é positivo, a presença de bacilos nas lesões é rara e na análise histopatológica da lesão cutânea são observados granulomas e infiltrado linfocitário (Ridley & Jopling, 1966).

Já em relação a forma lepromatosa, as lesões iniciais apresentam-se como pápulas e máculas pequenas e com bordas vagas, as lesões são múltiplas e geralmente não é observado o espessamento do nervo periférico. A medida que a doença progride comumente observa-se a presença de edemas nos membros inferiores, aprofundamento das linhas na testa e espessamento do nariz (face leonina), além disso, pode haver perda das sobrancelhas e cílios. O teste da lepromina



costuma ser negativo devido à baixa resposta imune celular ao patógeno e a análise histopatológica das lesões há a presença de numerosos macrófagos ricos em bacilos e ausência de granulomas (Ridley & Jopling, 1966).

Com relação as formas *borderline*, que são subdivididas em *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatosa* (BL), estas encontram-se em uma posição intermediária entre os dois polos, tanto em relação à carga bacilar, como em relação a capacidade do hospedeiro de responder imunologicamente ao patógeno (Figura 2; Ridley & Jopling, 1966)

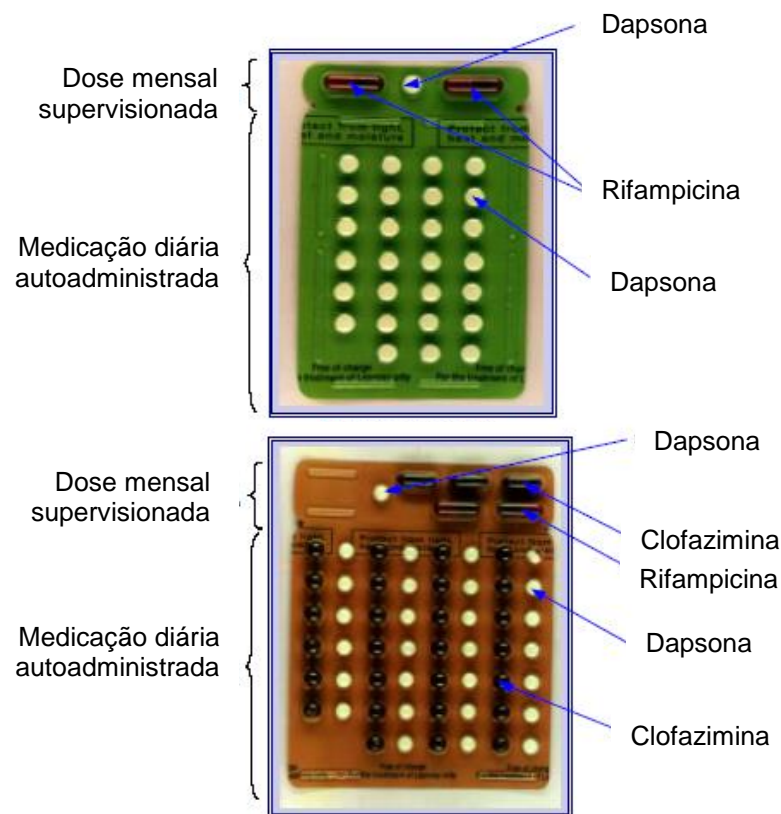


**Figura 2: Espectro de formas clínicas e resposta imune ao *M. leprae* de acordo com a classificação de Ridley e Jopling.** (TT, Tuberculóide Tuberculóide; BT, Borderline Tuberculóide; BB, Borderline Borderline; BL, Borderline Lepromatosa; LL, Lepromatosa Lepromatosa; Ac, anticorpo). Adaptada de *Dermatologia - Guias de Actualización Clínica - Cilad, 2015*.

Além da variedade de formas clínicas observadas na hanseníase, outro fator que contribui para a singularidade desta doença são as reações. As reações são definidas como complicações inflamatórias agudas que podem ocorrer durante o

curso da hanseníase tratada ou não, elas podem ser de dois tipos: Reação do tipo 1 ou Reação Reversa (RR) e Reação do tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH). A reação do tipo 1 acomete principalmente pacientes *borderline* (BT, BB e BL), e apresenta-se como endurecimento e edema de lesões já existentes, muitas vezes acompanhado de neurite progressiva causando neuropatia sensorial e motora, além disso a reação do tipo 1 apresenta um curso gradual se desenvolvendo ao longo de muitas semanas. Já a reação do tipo 2 ocorre principalmente em pacientes multibacilares (LL e BL), caracterizando-se pelo aparecimento abrupto de nódulos eritematosos sem predileção por lesões já existentes. Pacientes acometidos por este tipo de reação geralmente apresentam um quadro de febre, mal-estar e algum grau de neurite com neuropatia sensorial e motora, sendo que o curso natural da reação dura em média de 1 a 2 semanas (Scollard et al., 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde utiliza uma outra classificação a fim de definir a estratégia terapêutica indicada para o paciente, sendo considerados paucibacilares (PB) pacientes com as formas TT e BT que apresentam índice baciloscópico inferior a 2, já pacientes LL, BL e BB que apresentam índice baciloscópico igual ou superior a 2 são classificados como multibacilares (MB). O tratamento poliquimioterápico definido pela OMS em 1981 determina a utilização de dois esquemas principais de tratamento. O esquema padrão para pacientes paucibacilares é realizado em um período de 6 meses, sendo composto por uma dose mensal supervisionada de Rifampicina de 600mg em associação com uma dose diária, autoadministrada, de Dapsona 100 mg, além de sua dose mensal supervisionada de 100mg. Enquanto que o esquema padrão para pacientes multibacilares tem duração de 12 meses, neste esquema além da dose mensal de Rifampicina e da dose diária e mensal de Dapsona, como descrito acima, também há a administração da Clofazimina 300mg em dose mensal supervisionada e 50mg/dia (Figura 3). Tal esquema terapêutico possui uma importância fundamental na interrupção da cadeia de transmissão do *M. leprae*, uma vez que o paciente deixa de expelir o bacilo logo após o início do tratamento (Gallo et al., 2005).



**Figura 3. Tratamento Poliquimioterápico da Hanseníase.** Cartelas para tratamento das formas PB (superior) e MB (inferior) conforme preconizado pela OMS. Adaptado de Guia para o controle da hanseníase, 2002.

Com relação ao tratamento das reações, a droga de escolha é específica para cada tipo reacional e o tratamento poliquimioterápico não deve ser interrompido neste período. No caso da reação do tipo 1, o tratamento é realizado com corticosteroide, geralmente prednisona 1 a 2 mg/kg ao dia (Naafs, 1996). Já na reação do tipo 2, a droga de escolha no Brasil é a talidomida de 100 a 400 mg/dia, devendo-se sempre levar em consideração seus efeitos teratogênicos durante a gestação. Em países onde a talidomida é proibida o tratamento da reação é realizado com prednisona (Ito & Handa, 2012).

### 1.7 Mecanismos gerais da resposta imune ao *M. leprae*

Como já mencionado, o fenótipo clínico da hanseníase é determinado pela resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro. Sendo o polo tuberculóide caracterizado por imunidade celular do tipo T<sub>H</sub>1, enquanto que o polo lepromatoso

caracteriza-se por uma reduzida resposta imune celular com predominância da resposta humoral (Britton & Lockwood, 2004).

A primeira linha de defesa contra os patógenos ocorre através da imunidade inata, em que o receptor tipo Toll (TLR: toll-like receptor), altamente conservado na superfície de macrófagos e monócitos apresenta um papel extremamente importante. No caso do *M. leprae*, seu reconhecimento ocorre principalmente através do heterodímero TLR2/1 que promove a diferenciação de monócitos em macrófagos e células dendríticas que irão apresentar o antígeno do *M. leprae* as células T naïve, promovendo sua ativação através da secreção de Interleucina 12 (IL-12) (Walker & Lockwood, 2006).

A porção IL-12 $\beta$ R2 do receptor de IL-12 é mais expressa em linfócitos T<sub>H1</sub>, deslocando, portanto, a resposta imune para este perfil. Nas lesões de indivíduos tuberculóides, é observada a secreção intensa de Interferon gama (INF- $\gamma$ ), IL-2 e linfotóxina- $\alpha$ , resultando em uma maior atividade fagocítica, além disso, a liberação de citocinas, principalmente fator de necrose tumoral (TNF), leva a ativação de macrófagos que, juntamente aos linfócitos, promovem a formação de granulomas, os quais contêm principalmente linfócitos T CD4+ em seu interior, promovendo assim a contenção do bacilo (Modlin, 2010).

Já nos indivíduos lepromatosos, as principais citocinas produzidas são IL-4, IL-5 e IL-10, sendo que IL-4 tem sido mostrada como responsável pela regulação negativa do TLR2 em monócitos e a IL-10 por suprimir a produção de IL-12 (Yamamura et al., 1991; Libraty et al., 1997). Desta forma, há a predominância de linfócitos T CD8+ e ausência de granulomas nas lesões lepromatosas. Com relação às formas *borderlines* do espectro, são imunologicamente dinâmicas, apresentando uma diminuição da intensidade da imunidade celular à medida que se aproximam do polo lepromatoso (Walker & Lockwood, 2006).

## **1.8 Aspectos genéticos**

A ocorrência da hanseníase entre indivíduos com grau de parentesco próximo já era conhecida desde o século XIX, estando relacionada com o surgimento de teorias que apontavam a doença como tendo caráter hereditário (Pandya, 1998). Tais teorias foram derrubadas após a descoberta do bacilo de Hansen, entretanto, já em 1937,

Rotberg, estudando a reação de Mitsuda, sugeriu a existência de um componente genético relacionado com a susceptibilidade à doença. Nas últimas décadas, diversos estudos vêm evidenciando a importância da genética, não só no surgimento da doença como também em sua evolução clínica. E, atualmente, vários genes e regiões genômicas já foram identificados como estando relacionados ao controle da susceptibilidade à hanseníase (Prevedello & Mira, 2007).

O primeiro passo na direção da identificação de genes relacionados com a susceptibilidade à hanseníase ocorreu em 1960, quando, após Shepard desenvolver um método para crescimento do bacilo em coxim plantar de camundongos, observou-se que apenas em camundongos Balb/C houve crescimento do *M. leprae* por mais de 9 meses. A diferença do camundongo Balb/C para outras linhagens de camundongos resistentes ao bacilo consiste em uma mutação simples no gene *Nramp*, com alteração de uma glicina para ácido aspártico, induzindo a inativação de uma das principais vias inatas para controle do *M. leprae*, através da inativação de um transportador de ferro que limita a disponibilidade deste metal à microrganismos, exportando-os do fagolisossoma. Após tal descoberta, vários genes humanos candidatos ao controle da susceptibilidade vem sendo sugeridos a partir de camundongos-modelo, inclusive a molécula NRAMP1. Além disso, estudos populacionais para investigação de genes candidatos através de casos controle, análise de genes relacionados utilizando-se multiplex, meta-análise e estudos de associação genômica são estratégias que vem sendo utilizadas para validar genes importantes no controle da susceptibilidade à doença (Cardoso et al., 2011).

A interação e reconhecimento inicial do *M. leprae* pelas células hospedeiras ocorre através dos receptores de reconhecimento padrão (PAMPs), principalmente TLRs e NOD2, assim como através dos receptores associados à adesão e entrada do bacilo em células de Schwann e macrófagos (MRC1,  $\alpha$ 2-laminina e receptor do complemento). Variações genéticas nesta fase inicial podem interferir na resistência natural dos hospedeiros ao *M. leprae*, simplesmente modulando a ativação através de TLRs ou bloqueando/diminuindo a taxa de captação de bacilos pelas células de Schwann e macrófagos. Assim, espera-se que, nestes indivíduos susceptíveis, após a fagocitose do *M. leprae* por tais células, o mesmo se evadirá dos mecanismos de morte micobacteriana e infectará com sucesso a célula (Cardoso et al., 2011).

Durante esta primeira interação do *M. leprae* com a resposta imune inata, o gene do TLR1 tem grande relevância quando o polimorfismo I602S está presente. Na presença desse polimorfismo, o TLR1 apresenta sinalização anormal, que resulta na diminuição da produção de certas citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF nas células mononucleares do sangue periférico quando estimuladas com *M. leprae* (Misch et al., 2008). Com relação ao receptor intracelular NOD, foi demonstrada uma associação entre dois polimorfismos do gene NOD2 e a susceptibilidade à hanseníase (Zhang et al., 2009). Assim como ocorre com TLR1, os polimorfismos em NOD2 resultam na regulação negativa da resposta imune inflamatória, consequentemente diminuindo a ativação da imunidade adaptativa e contribuindo para a instalação da infecção pelo *M. leprae* (Cardoso et al., 2011).

O gene MRC1, responsável por codificar o receptor de manose humana presente nos macrófagos, que reconhece resíduos de manose presentes na parede celular do *M. leprae*, localiza-se em uma região cromossômica associada a polimorfismos no exon 7 do gene MRC1. Em um estudo de associação familiar de 580 famílias vietnamitas e um estudo de caso controle de 783 brasileiros, o SNP G396S do gene MRC1 foi associado com a proteção contra a hanseníase *per se* e ainda, contra a forma multibacilar da doença. (Alter et al., 2010).

Além dos genes acima citados, que são considerados importantes na imunidade inata contra o patógeno, há outros genes que vem sendo relacionados com uma fase mais tardia da imunidade inata ou uma fase precoce da imunidade adaptativa. Entre eles, destaca-se o gene TNF localizado na região cromossômica 6p21 e pertencente ao grupo de genes HLA classe III. O TNF é uma importante citocina com papel na ativação de macrófagos e estabilização da formação do granuloma contra o *M. leprae* (Cardoso et al., 2011). Um estudo de meta-análise, utilizando quatro populações brasileiras independentes, apontou o genótipo TNF-308A como um marcador de resistência contra a hanseníase, uma vez que resulta em uma maior produção de TNF. Já indivíduos portadores do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) TNF-308GG são menos eficientes em manter a integridade do granuloma, favorecendo a progressão da infecção (Moraes et al., 2001).

Outro conjunto de genes, também localizados na região cromossômica 6p21, e relacionado com a susceptibilidade à hanseníase é o complexo HLA, em particular HLA-DR2 e HLA-DR3, ambos da classe HLA II. A participação de tal complexo na

susceptibilidade a doença é sustentada pelo fato de que as formas clínicas da doença estão associadas ao perfil de resposta  $T_H1/T_H2$  apresentado pelo hospedeiro. Tal resposta é parcialmente controlada por mecanismos de apresentação antigênica e interação célula-célula dependentes da expressão de genes HLA. Desta forma, tal complexo está relacionado principalmente a determinação do espectro clínico do paciente (Prevedello & Mira, 2007).

O  $IFN-\gamma$  é uma citocina produzida por linfócitos T  $CD4+$  ou  $CD8+$  ativados, que é essencial para o controle efetivo de patógenos intracelulares. Em macrófagos, o  $IFN-\gamma$  estimula resposta micobactericida envolvendo a produção de óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas de oxigênio (Flynn & Chan, 2001). Além disso, o  $IFN-\gamma$  produzido por células dendríticas, macrófagos e células Natural Killer (NK) também aumenta a expressão da subunidade de sinalização do receptor IL-12 em linfócitos T, permitindo que as células ainda virgens respondam à IL-12 a partir de células imunes inatas, sofram diferenciação para  $T_H1$  e produzam mais  $IFN-\gamma$  (Trinchieri, 1993). Camundongos deficientes em  $IFN-\gamma$ , quando expostos ao *M. tuberculosis* através de aerossóis ou por via intravenosa, desenvolvem a doença de forma disseminada. Da mesma forma, em um modelo experimental de infecção da hanseníase usando coxim plantar de camundongos, os macrófagos de tecidos muito infectados foram refratários à ativação de  $IFN-\gamma$  e não foram capazes de matar patógenos intracelulares não relacionados, ou mesmo, de produzirem níveis normais de superóxido (Misch et al., 2010).

Polimorfismos no gene *INFG* têm sido muito investigados em estudos de associação à tuberculose, com vários SNPs comuns estando relacionados à susceptibilidade a essa doença (Cooke et al., 2006). O gene *INFG* contém um polimorfismo de microssatélite no íntron 1 com um número variável de repetições de CA; certos alelos desta repetição estão associados a níveis elevados de produção de  $IFN-\gamma$  em indivíduos saudáveis. Com relação à hanseníase, embora nenhum alelo tenha sido associado individualmente a um risco alterado à doença *per se* ou a seus subtipos, houve diferença significativa na distribuição de repetições de CA curtas *versus* longas entre pacientes com hanseníase tuberculóide em comparação com voluntários sadios (Fitness et al., 2004). Além disso, quando os indivíduos foram divididos em grupos de pessoas com alelos mais longos e aqueles com alelos mais

curtos, uma porcentagem significativamente maior de pacientes com hanseníase apresentou os alelos mais longos (Misch et al., 2010).

Também associado com a modulação da ação microbicida, o gene responsável por codificar a proteína conhecida como receptor de vitamina D (VDR) tem papel importante no mecanismo da resistência contra infecções micobacterianas. Quando ativado pela vitamina D, o VDR atua como um fator transcricional para vários genes envolvidos na resposta inflamatória (Cardoso et al., 2011). Esta modulação pode ser inibitória ou estimulatória de acordo com o tipo celular e a natureza do patógeno. Nas células dendríticas, a vitamina D inibe a maturação bloqueando a expressão de MHC classe II, CD40, CD80 e CD86 e reduzindo a expressão de IL-12. Também nos macrófagos, a vitamina D regula negativamente a expressão de IL-12. Em monócitos e macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, a vitamina D aumenta a expressão de catelicidina estimulada por TLR1/2, aumentando, assim, a ação microbicida nessas células (Misch et al., 2010).

No entanto, em relação a resposta imune adaptativa, a vitamina D leva a um aumento da resposta celular T<sub>H</sub>2 em detrimento da resposta T<sub>H</sub>1. A vitamina D bloqueia a resposta T<sub>H</sub>1 através da inibição da expressão de citocinas, como IL-2, IFN- $\gamma$ , Fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e supressão da proliferação de linfócitos. Não obstante, a vitamina D também aumenta a produção de linfócitos T supressores inespecíficas e inibe a indução de linfócitos T CD8+. Vários polimorfismos localizados próximos da região não traduzida 3' do gene do receptor da vitamina D (VDR) tem sido relacionados com a regulação da estabilidade ou atividade transcricional do mRNA de VDR, como por exemplo BsmI, ApaI e TaqI. O polimorfismo TaqI C tem sido associado a maiores níveis de transcrito de mRNA de VDR, embora este achado ainda seja controverso (Misch et al., 2010).

Um *scan* genômico para genes de susceptibilidade à hanseníase *per se* em população vietnamita identificou uma forte evidência de ligação entre a doença e a região cromossômica 6q25-q27. O estudo apontou para 17 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) relacionados com a hanseníase *per se* na população vietnamita, sendo que destes 15 SNPs estavam localizados em um mesmo bloco com 80 quilobases de extensão, onde encontra-se a região reguladora do gene do parkinsonismo juvenil autossômico recessivo, denominado Parquina (PARK2) e do gene corregulador da parquina (PACRG). Foram detectados dois *tag* SNPs que



capturavam completamente a informação observada nesta região, e haplótipos definidos por esses dois *tag* SNPs apresentaram um aumento de até 5 vezes do risco de contrair hanseníase. Tais achados foram replicados em uma população brasileira de casos-controle (Mira, 2004). Parquina é uma proteína-ubiquitina ligase E3 codificada pelo gene PARK2, responsável por transferir resíduos de ubiquitina do peptídeo E2 para proteínas marcadas para degradação. Entretanto, a Parquina vem sendo associada a outras funções como: efeito antiapoptótico, através da associação com mitocôndrias e inibição da liberação do citocromo C, e regulação da autofagia sobre certas condições. Deste modo, fica evidente o papel protetor da Parquina contra infecções, uma vez que ela não só evita a apoptose como também promove a morte microbiana por autofagia (Cardoso et al., 2011).

## **1.9 Imunossenescência**

A imunossenescência é definida como um estado de função imunológica desregulada nos idosos, que contribui para o aumento da susceptibilidade à infecções, câncer e autoimunidade, além de levar a uma diminuição da resposta vacinal. O sistema imunológico possui como principal função o combate a agentes infecciosos e células malignas. Para isso, há o comprometimento de dois mecanismos de defesa que interagem intimamente entre si, a imunidade inata e a adaptativa. As alterações progressivas que ocorrem com a idade, atingem principalmente a imunidade adaptativa, uma vez que esta apresenta um mecanismo mais complexo no que diz respeito a manutenção do equilíbrio entre homeostase e adaptação às agressões externas. Desta forma, o envelhecimento imunológico atinge tanto a experiência gerada pelo contato com diversos antígenos, como o armazenamento mantido pela memória imunológica (Agondi et al., 2012).

As células do sistema imunológico são derivadas das células tronco hematopoiéticas e, com o avanço da idade, a habilidade de tais células proliferarem tende a diminuir, e, tal fato ocorre principalmente em decorrência do encurtamento dos telômeros. Os telômeros são sequências de DNA repetidas, que juntamente com seis proteínas de proteção, envolvem a extremidade dos cromossomos para evitar que os telômeros sejam reconhecidos como danos ao DNA. A falha na síntese de DNA da fita *lagging* para ser totalmente replicada, resulta na perda de DNA nos telômeros após cada ciclo de replicação do DNA celular. Desta forma, todos os

telômeros de células somáticas humanas tornam-se progressivamente mais curtos à medida que as células se dividem. Tal fato irá resultar em um ou mais telômeros criticamente curtos, iniciando um sinal de resposta de dano ao DNA que é referido como senescência replicativa, que nos linfócitos T CD8+, é caracterizada pelo seu aumento com alterações notáveis em seu fenótipo e função. Para compensar a perda de telômeros durante a divisão celular, algumas células proliferativas expressam transitoriamente a telomerase, uma transcriptase reversa celular que mantém telômeros ao adicionar repetições teloméricas nas extremidades cromossômicas durante a replicação do DNA. No entanto, em células e tecidos normais, a expressão de telomerase é altamente regulada e restrita a alguns compartimentos de células-tronco que ampliam transitoriamente (Huang et al., 2017).

A ação funcional de células constituintes da imunidade inata, como neutrófilos e macrófagos, também é afetada durante o envelhecimento. Entre essas alterações, destaca-se a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio nessas células. A sinalização intracelular prejudicada tem sido considerada como uma das principais causas para a produção alterada de radicais livre de oxigênio nos idosos. O cálcio intracelular encontra-se diminuído em neutrófilos estimulados de voluntários idosos, sugerindo que há comprometimento no fluxo de cálcio durante a sinalização celular nesta população. Além disso, a actina, que pode desempenhar um papel no movimento e expressão do receptor da superfície celular, tem sido sugerida para contribuir com a produção alterada de radicais livres, uma vez que, em neutrófilos de idosos voluntários estimulados com agentes de estabilização e interrupção da actina, a liberação de superóxidos ( $O_2^-$ ) é significativamente menor (Plackett et al., 2004). Além disso, outras alterações na imunidade inata decorrente do envelhecimento incluem o aumento do número de células Natural Killer (NK) com diminuição de sua atividade antitumoral e alteração na expressão de moléculas coestimulatórias pelas células dendríticas (DC; Agondi et al., 2012).

Com relação às alterações ocorridas na imunidade adaptativa, estas são decorrentes tanto de fatores intrínsecos, como a diminuição no tamanho e função do timo, quanto por fatores extrínsecos, principalmente a exposição a vários patógenos ao longo da vida. A imunidade adaptativa é representada por dois tipos células principais, os linfócitos B e os linfócitos T, sendo ambos afetados pela imunossenescência. Com o envelhecimento, as células do estroma da medula óssea

apresentam uma redução na capacidade de manter a expansão dos linfócitos B devido a diminuição da produção de IL-7, resultando na diminuição da recombinação V-DJ dos genes da imunoglobulina e bloqueio da maturação dos linfócitos, sendo a perda de linfócitos B *naive* um marcador para a imunossenescência. Além disso, o envelhecimento está associado ao desvio do perfil de citocinas T<sub>H1</sub> para T<sub>H2</sub>, resultando em aumento da incidência das doenças autoimunes, devido ao aumento da produção de anticorpos autorreativos. Com relação as alterações relacionadas aos linfócitos T, destaca-se a diminuição da população de linfócitos T *naive* que deixam o timo, e um aumento na proporção de vários tipos de linfócitos T de memória, porém com baixa capacidade proliferativa (Agondi et al., 2012).

Outra característica importante no processo de envelhecimento é o *Inflamm-aging*, termo em inglês que é definido como o estado inflamatório crônico e de baixo grau observado nos idosos, que resulta na redução da capacidade de lidar com agentes antigênicos e no aumento progressivo de marcadores pró-inflamatórios. Uma importante evidência desse fenômeno decorre do aparecimento, nesta população, de inúmeras doenças aparentemente distintas, porém, que possuem uma patogênese inflamatória comum, como aterosclerose, diabetes tipo 2, síndrome metabólica, sarcopenia, entre outras (Cevenini et al., 2013).

## 2. JUSTIFICATIVA

É bastante conhecido o aumento da longevidade da população mundial desde a década de 70. No Brasil, segundo dados do IBGE, somente na década de 90 a taxa de idosos aumentou em 35,5 %, perfazendo 8,7% da população total. No caso do Estado do Rio de Janeiro, local do presente estudo, estima-se que até o ano de 2030, 16,5% da população total seja composta por idosos. A hanseníase ultrapassa esse perfil, uma vez que o número de casos em idosos vem crescendo em uma taxa superior ao aumento da longevidade da população. Em 2010 foram diagnosticados 7.571 casos de hanseníase em idosos, em 2011 esse número passou para 7.670 e em 2012 chegou a 7.834, correspondendo a 20,6% do total de casos diagnosticados. Além disso, um estudo retrospectivo desenvolvido no Ambulatório da Fiocruz, apontou para um aumento de 5,5% na incidência de hanseníase em idosos acompanhados no local entre os períodos de 1990-2001 e 2002-2014. O mesmo estudo ainda revelou a chance duas vezes maior que esta faixa etária apresenta para o desenvolvimento da forma multibacilar da doença, cujo prognóstico em geral é considerado pior (Nobre et al., 2016). Visto que a idade média para o aparecimento da hanseníase ocorre geralmente entre a terceira e quarta década de vida, e levando-se em consideração que a maioria dos indivíduos expostos ao patógeno reside em área endêmica para a doença ao longo da maior parte da vida, faz-se necessário a compreensão de quais mecanismos estão envolvidos no aparecimento tardio da doença.

A imunossenescência, ou seja, queda na atividade imunológica decorrente do envelhecimento, pode estar intimamente envolvida nesse processo. Assim como o restante do organismo, os órgãos linfóides são afetados pelos mecanismos biológicos responsáveis pela perda da atividade funcional e consequente morte das células em decorrência da idade. Dentre tais mecanismos, o estresse oxidativo e o encurtamento dos telômeros são um dos principais responsáveis pela senescência celular replicativa que tem como consequência a diminuição do repertório imunológico relacionado ao envelhecimento. A correlação entre imunossenescência e aumento da susceptibilidade a infecções já se encontra bem fundamentada, entretanto, até o momento, nenhum estudo investigou a interferência de tais mecanismos no aparecimento da hanseníase em idosos, fazendo-se, portanto, necessária a investigação de tal associação.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Principal**

Analisar a expressão de genes relacionados com susceptibilidade à hanseníase e imunossenescência em idosos acompanhados no Ambulatório Souza Araújo (ASA) da FIOCRUZ.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar a expressão dos genes IFNG e VDR, por meio de PCR quantitativo em tempo real.
- Correlacionar os dados referentes à expressão gênica com os dados demográficos e clínicos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 População de Estudo, Biossegurança e Considerações Éticas**

O presente estudo foi composto por um total de 20 indivíduos sendo: 10 idosos hansênicos multibacilares e 10 idosos hansênicos paucibacilares. Todos os indivíduos hansênicos incluídos neste trabalho residiam na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, área endêmica para a hanseníase. Todos os pacientes eram acompanhados no Ambulatório Souza Araújo (ASA), ligado ao Laboratório de Hanseníase (LAHAN) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, no Rio de Janeiro. As amostras de sangue total periférico de tais pacientes foram coletadas imediatamente após o diagnóstico da doença, ou seja, antes do início do tratamento poliquimioterápico (PQT).

A participação de cada indivíduo no estudo ocorreu após a concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (Protocolo nº 518/09). Para o desenvolvimento do presente trabalho foram considerados idosos indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos. Foram excluídos do estudo indivíduos com comorbidades infecciosas agudas ou crônicas, indivíduos em estado reacional e aqueles que não concordaram em participar do projeto em questão. Os dados clínicos e sócio-demográficos dos participantes foram coletados na fase diagnóstica e encontram-se especificados na Tabela 2, onde, para proteção dos mesmos, os nomes foram ocultados.

As amostras de sangue total periférico foram coletadas em tubos vacuntainer PAXgene Blood RNA™ por profissional capacitado, transportadas até o laboratório em caixa isotérmica apropriada onde permaneceu pelo intervalo de duas horas em temperatura ambiente, antes de sua correta armazenagem à oitenta graus negativos até o momento da extração. Todos os cuidados necessários foram tomados de modo a diminuir as chances de contaminação entre as amostras. As amostras foram codificadas através de um código numérico e registradas em uma tabela mãe, acessível apenas aos pesquisadores participantes, de modo a evitar a possibilidade de quebra de sigilo.

## 4.2 Extração de RNA

Os RNAs foram extraídos do sangue total armazenado em solução conservada contida no tubo PAXgene através do Kit de extração de RNA (PreAnalytix Handbook™) produzido pela QIAGEN, conforme as instruções do fabricante descritas a seguir.

As amostras foram retiradas do freezer e em seguida descongeladas a temperatura ambiente durante 2 horas. Em seguida, foram homogeneizadas manualmente e centrifugadas por 10 minutos a 3.000 x g. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram retirados por decantação e adicionou-se 4 mL de RNase-Free ao sedimento. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vortex até o pellet ser visivelmente dissolvido. Então, centrifugou-se novamente por 10 minutos a 3.000 x g. Aos sobrenadantes foram adicionados 350 µL do tampão de ressuspensão (BR1) e, então, foram agitados em vortex. As amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga, adicionou-se 300 µL de tampão de ligação (BR2) e 40 µL de proteinase K. Subsequentemente, as mesmas foram incubadas a 55 °C por 10 minutos em banho seco e depois transferidas para cada coluna lilás fornecida pelo Kit e centrifugadas por 3 minutos a 12.000 xg. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo e adicionou-se 350 µL de etanol. De cada amostra, 700 µL foram transferidos para cada coluna vermelha, em seguida centrifugou-se por 1 minuto a 20.000 xg. Em cada coluna, acrescida de novos tubos, adicionou-se os lisados restantes. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 20.000 xg. Após a centrifugação, as colunas foram transferidas para um novo tubo. O tampão de lavagem 1 (350 µL; BR3) foi adicionado em cada coluna e centrifugou-se por 1 minuto a 20.000 xg. Posteriormente a centrifugação, as colunas foram novamente transferidas para um tubo novo. O tratamento dos RNAs foi realizado com 70 µL do tampão de digestão contendo Dnase I, acrescentado a cada coluna. As colunas permaneceram em temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 350 µL do tampão BR3 e as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 20.000 xg. As colunas foram transferidas para um novo tubo e adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem 2 (BR4) para uma nova centrifugação. Esta etapa foi realizada duas vezes. Finalmente, as colunas foram transferidas para um tubo Eppendorf™. Os RNAs foram eluídos com 80 µL do tampão BR5, incubados por 5 minutos a 65°C e

transferidos imediatamente para o gelo. Em seguida, os RNAs foram estocados no freezer a -70°C até sua utilização nas etapas seguintes.

### **4.3 Quantificação e avaliação da pureza do RNA**

Para a quantificação e avaliação de pureza foi usado o equipamento Espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000, mediante leitura da absorbância nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260nm, 280nm e 230nm, que quantificam ácidos nucleicos, proteínas e contaminação por álcool, fenol e EDTA, respectivamente. Características ótimas de pureza para uma amostra foram: razão entre a absorbância em 260nm e 280nm com valores entre 1,8 a 2,0 e razão entre a absorbância em 260nm e 230nm entre 1,8 a 2,2. A qualidade do RNA extraído de algumas amostras também foi avaliada por gel de agarose (Life Technologies/Invitrogen) a 1,2% (p/v) em tampão MOPS 1X (Sigma-Aldrich) coradas com SYBR Green II 100X (Life Technologies/Applied Biosystems), 35% (v/v) formamida, MOPS 1X e 0,125% (p/v) corante azul de bromofenol. Após a corrida eletroforética o gel foi analisado por um sistema de fotodocumentação (I-Pix Touch, Loccus Biotecnologia, SP, Brasil).

### **4.4 Síntese de cDNA**

A conversão do RNA para o cDNA e a reação de síntese de cDNA foram realizadas através do kit SuperScript™ VILO™ Master Mix (Invitrogen, USA) e os procedimentos foram realizados conforme orientação do fabricante. O volume final para a reação de transcrição do RNA foi de 20 $\mu$ l. Para cada amostra, em um tubo Eppendorf contendo 2 $\mu$ l do Master Mix SuperScript™ VILO™, foi adicionado 400ng de RNA (o volume necessário em  $\mu$ l variou de acordo com cada amostra, porém nunca ultrapassando o volume máximo de 18  $\mu$ l), em seguida a mistura foi avolumada com RNase-Free Water (H<sub>2</sub>O RF) até chegar no volume final da reação. Após uma breve homogeneização e repouso por 10 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram incubadas por 1 hora a 42°C e após esse período seguiu-se uma incubação de 5 min a 85°C para inativação da enzima. Por fim, as amostras foram mantidas em gelo por 1 minuto e armazenadas a -20°C até o uso.



#### **4.5 Quantificação da expressão gênica de fatores transcricionais por PCR quantitativo em tempo real (RTqPCR)**

Para análise da expressão gênica a reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o sistema SYBR Green I (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Para isso, foi realizada uma reação de 10  $\mu$ L, onde foram adicionados 1  $\mu$ L de cada cDNA na concentração de 10ng, transcrito com Oligo (dT), 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems). Para cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse e do gene de referência GAPDH. As reações foram incubadas no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus<sup>®</sup> (Applied Biosystems, EUA), seguindo as condições da reação: 95° C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos de 95° C por 3 segundos e 60° C por 30 segundos. Ao final da reação de amplificação, as amostras foram submetidas a uma nova incubação para geração da curva de dissociação, onde se determina o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos oligonucleotídeos de suas sequências alvo.

Para os ensaios acima, os seguintes genes SYBR<sup>™</sup> Green foram utilizados: VDR (receptor de vitamina D) e IFNG (Interferon gama). Todos os oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR foram desenhados a partir de sequências de referência de cada gene obtidas no UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>), utilizando o software *Primer3* v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).

#### **4.6. Análise dos dados obtidos a partir de RT-PCR em tempo real**

A análise da expressão gênica relativa foi realizada utilizando-se o método  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Inicialmente foi calculado o  $\Delta Ct$ , subtraindo-se os valores de Ct (do inglês *threshold cycle*, limiar do ciclo) de cada gene alvo pelos valores de Ct do gene normalizador GAPDH (Life Technologies, USA). Uma vez determinado o  $\Delta Ct$  das amostras, os valores de expressão gênica relativa foram obtidos pela fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ , referente a cada gene alvo.

#### **4.7. Análise estatística**

Os resultados foram representados como mediana. Os dados foram analisados utilizando o teste de Mann-Whitney (não pareado e não paramétrico), já para as correlações, foi utilizado o método de Spearman, e a significância estatística foi considerada quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas dos dados apresentados foram realizadas através do programa Windows GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Características clínicas e demográficas dos pacientes**

Dentre os 20 pacientes com hanseníase estudados (10 PB e 10 MB), a média de idade entre os PB foi de 68,1 anos (variando de 60 a 89 anos), e de 70,2 anos (variando de 60 a 81 anos) entre os MB. Com relação ao gênero, no grupo PB 60% eram do sexo feminino e 40% do sexo masculino, no grupo MB 30% eram mulheres e 70% homens.

Quanto à presença de bacilos, nos PB a baciloscopia (IB) foi negativa para todos os pacientes estudados, enquanto que, para nos MB o IB médio foi de 3,8 (variando de 2,5 a 6). Com relação ao grau de incapacidade funcional (GI), a avaliação foi realizada em 18 dos 20 pacientes e revelou que cerca de 33% dos pacientes, PB e MB, já apresentava perda de sensibilidade ou incapacidades decorrentes da doença. Quando analisamos apenas o grupo multibacilar essa porcentagem chega a 55,5%.

As características clínicas e demográficas dos pacientes avaliados nesse estudo encontram-se detalhadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Caracterização clínica e demográfica dos indivíduos estudados.

Forma Clínica	ID	Sexo	Idade (anos)	IB	GI
<b>PB</b>	11	F	80	0	0
	16	M	66	0	0
	27	M	65	0	1
	42	F	89	0	NR
	52	F	71	0	0
	53	F	60	0	0
	56	F	64	0	0
	57	M	66	0	0
	72	F	60	0	0
	73	M	60	0	0
<b>MB</b>	15	M	81	6	0
	35	M	76	3,75	1
	39	M	73	3,5	1
	51	M	60	4	0
	60	F	74	4,5	0
	65	M	62	4	NR
	71	M	74	3,25	1
	77	F	64	2,5	0
	80	F	64	3,25	1
	91	M	74	3,25	1

ID, código do sujeito em estudo; PB, forma clínica paucibacilar; MB, forma clínica multibacilar; F, feminino; M, masculino; NR, não realizado; IB, índice bacilos cópico; GI, grau de incapacidade.

## 5.2 Avaliação da expressão dos genes IFNG e VDR

Para avaliar a expressão dos genes relacionados com susceptibilidade à hanseníase, IFNG e VDR, foi realizado PCR quantitativo em tempo real a partir do RNA mensageiro extraído do sangue periférico dos pacientes e convertido em cDNA.

A Tabela 3 mostra a expressão relativa de cada gene para cada paciente através do valor de  $2^{-\Delta Ct}$ .

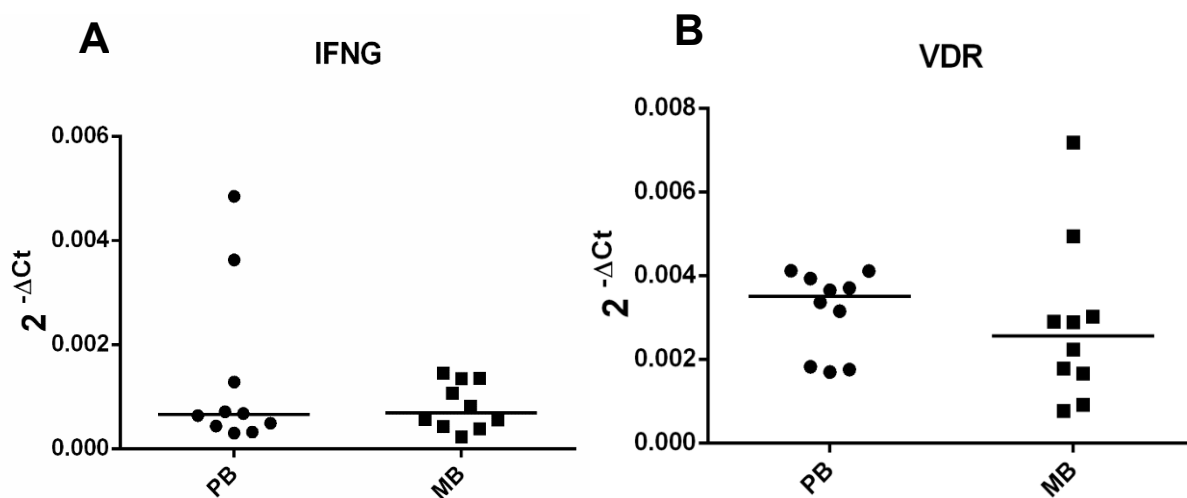
**Tabela 3** – Expressão relativa de cada gene por paciente.

Forma Clínica	ID	IFNG	VDR	
PB	11	0,001281394	0,003650697	
	16	0,000639735	0,003930297	
	27	0,000301324	0,00336432	
	42	0,003627464	0,00411266	
	52	0,000324324	0,004116669	
	53	0,004845732	0,001694734	
	56	0,000675316	0,003705504	
	57	0,000491405	0,003151012	
	72	0,000712435	0,001825655	
	73	0,000435523	0,001754892	
	MB	15	0,000421458	0,000767869
		35	0,001346937	0,00223456
39		0,000562281	0,000908368	
51		0,001453464	0,001782538	
60		0,001354349	0,002883805	
65		0,000384984	0,007180517	
71		0,00081889	0,003014999	
77		0,000558551	0,004935421	
80		0,001060554	0,001665818	
91		0,000227932	0,00289999	

Valores referente ao  $2^{-\Delta Ct}$ ; ID, código do sujeito em estudo; PB, forma clínica paucibacilar; MB, forma clínica multibacilar.

De acordo com os dados descritos na Tabela 3 e mostrados graficamente na Figura 4, as expressões de ambos os genes estudados não apresentam diferença significativa entre os grupos avaliados. Com relação a expressão de IFNG, a diferença entre os dois grupos teve  $p > 0,9999$ . Já na análise da expressão gênica do VDR,

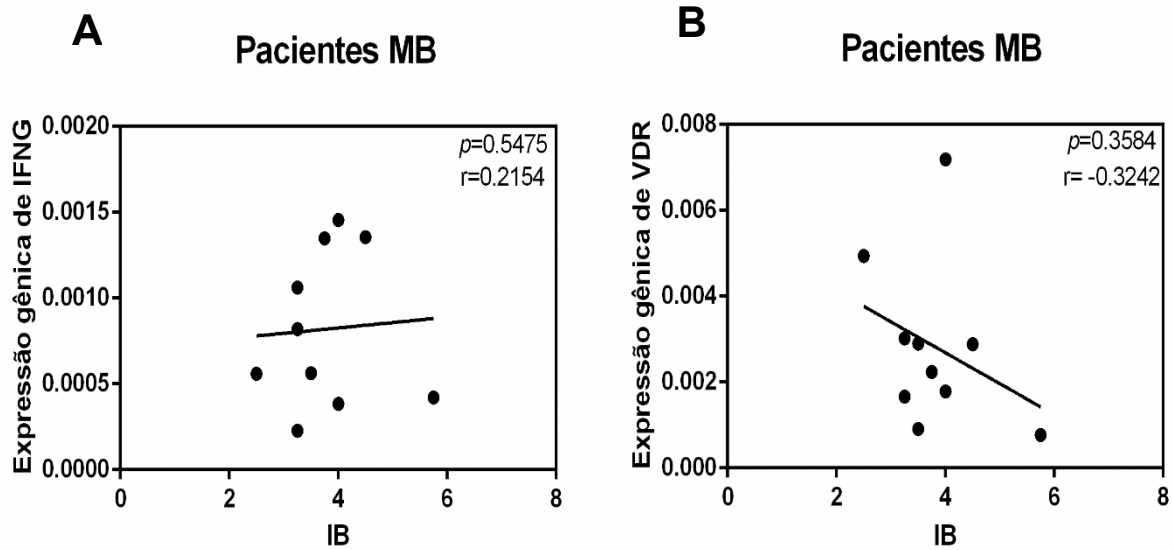
observamos uma tendência de maior expressão nos pacientes PB, entretanto, tal diferença não foi significativa ( $p=0.2475$ ).



**Figura 4. Avaliação da expressão de genes relacionados com susceptibilidade à hanseníase nos grupos PB e MB.** (A) IFNG, (B) VDR. Os resultados estão representados por  $2^{-\Delta Ct}$ , sendo  $\Delta Ct$  a diferença entre o Ct do gene constitutivo (GAPDH) e o gene de interesse. As barras representam a mediana de cada grupo.

### 5.3 Correlação entre a expressão gênica e o índice baciloscópico (IB) dos pacientes multibacilares (MB).

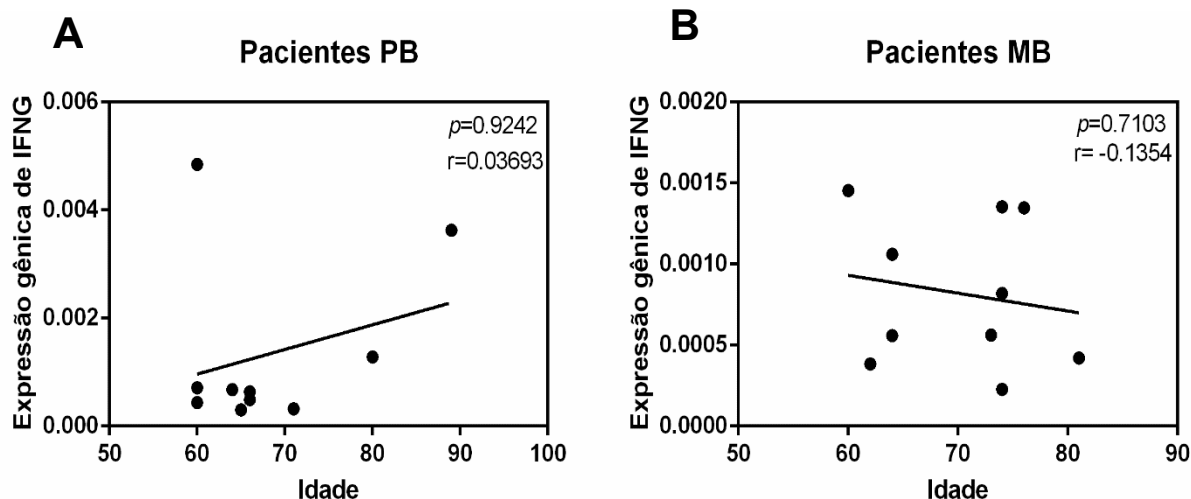
Com o objetivo de correlacionar os dados clínicos dos pacientes com os resultados da quantificação da expressão dos genes de interesse, foram feitas associações entre o índice baciloscópico (IB) e a expressão dos genes de interesse nos pacientes do grupo multibacilar (MB). O mesmo procedimento não foi feito no grupo PB pois o IB foi igual a zero em todos os pacientes. A correção entre IB e a expressão gênica do IFNG foi positiva ( $p= 0.5475$ ,  $r= 0.2154$ ), enquanto que a correção com a expressão de VDR foi negativa ( $p= 0.3584$ ,  $r= - 0,3242$ ). Esses dados indicam que há uma tendência da razão IBvsVDR em pacientes MB. Ou seja, a medida que aumenta o índice baciloscópico, a expressão gênica do VDR é menor, entretanto, nenhuma correlação significativa foi encontrada (Figura 5).



**Figura 5. Correlação entre índice baciloscópico e expressão gênica de IFNG (A) e VDR (B) em pacientes multibacilares.** Dados pareados de 10 pacientes MB, sendo que cada ponto representa um indivíduo. Os coeficientes de correlação são mostrados nas retas (valores de  $r$ ) e o nível de significância também é mostrado (valores de  $p$ ). Análise realizada pelo método de correlação de *Spearman*.

#### 5.4 Correlação entre a expressão de IFNG e VDR e a idade em pacientes paucibacilares e multibacilares.

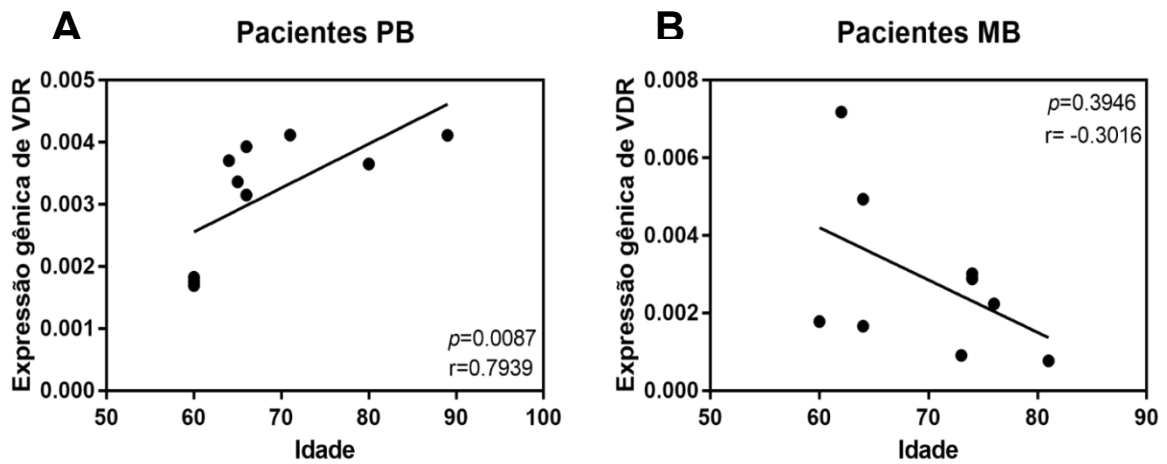
Em seguida, ainda buscando uma correlação entre os dados clínicos e a expressão dos genes estudados, correlacionamos os resultados obtidos no presente estudo com a idade dos participantes, separando-os de acordo com suas formas clínicas. Na Figura 6, estão representados os dados obtidos a partir da correlação com a expressão gênica do IFNG. No grupo paucibacilar a expressão gênica do IFNG permaneceu baixa na maioria dos pacientes, no entanto, nos pacientes acima de 80 anos a expressão foi maior. Já no grupo multibacilar, não foi possível observar nenhum padrão na expressão gênica em associação com a idade.



**Figura 6. Correlação entre idade e expressão gênica de IFNG em pacientes PB (A) e pacientes MB (B).** Dados pareados de 10 PB e 10 MB, sendo que cada ponto representa um indivíduo. Os coeficientes de correlação são mostrados nas retas (valores de  $r$ ) e o nível de significância também é mostrado (valores de  $p$ ). Análise realizada pelo método de *Spearman*.

No próximo passo, tivemos o intuito de verificar a se havia correlação entre a idade dos indivíduos analisados nesse estudo e a expressão gênica de VDR. Observamos uma correlação positiva e significativa entre esses dados nos pacientes do grupo paucibacilar, ou seja, nesse grupo, a expressão gênica do VDR tende a aumentar com o avanço da idade ( $r=0.7939$ ,  $p=0.0087$ ). Já em relação ao grupo de pacientes multibacilares, apesar dos resultados não apresentarem uma correlação significativa, é possível observar uma tendência contrária em relação aos PB, isto é, de decréscimo na expressão do gene VDR à medida que os pacientes envelhecem ( $p=0.7103$ ,  $r=-0.1354$ ). A correlação entre a idade dos pacientes e a expressão gênica de VDR para cada forma clínica, está demonstrada na Figura 7.





**Figura 7. Correlação entre idade e expressão gênica de VDR em pacientes PB (A) e pacientes MB (B).** Dados pareados de 10 PB e 10 MB, sendo que cada ponto representa um indivíduo. Os coeficientes de correlação são mostrados nas retas (valores de  $r$ ) e o nível de significância também é mostrado (valores de  $p$ ). Análise realizada pelo método de *Spearman*.

## 6 DISCUSSÃO

Os mecanismos pelos quais a hanseníase acomete alguns indivíduos apenas na terceira idade ainda não são completamente conhecidos, fazendo-se necessário uma maior investigação da doença nessa população, especialmente em países endêmicos como o Brasil, onde o *M. leprae* encontra-se disseminado na população geral. Além disso, como apenas 5% dos indivíduos que entram em contato com o patógeno adoecem, a afirmativa de que o estabelecimento da doença possui um conjunto de componentes genéticos que tornam hospedeiros susceptíveis é indiscutível. Além disso, processos comuns ao envelhecimento do organismo como a involução tímica, a perda de função da resposta imune em decorrência de estímulos crônicos e a inflamação crônica de baixo grau presente nos idosos, contribuem para o comprometimento da imunovigilância e conseqüentemente aumentam a susceptibilidade às infecções, sejam elas novas, crônicas ou latentes (Agondi et al., 2012).

Assim, o processo conhecido como imunossenescência, pode se tornar clinicamente importante em diferentes idades de acordo com o patrimônio genético de cada indivíduo e, desta forma, o impacto sobre a qualidade de vida dos mesmos também é variável (Derhovanessian et al., 2009). Sendo assim, estudos como este, que visam uma maior compreensão dos níveis de expressão de genes relacionados com a susceptibilidade à hanseníase nos idosos, fazem-se importantes, pois podem contribuir para a identificação do perfil imunológico desta população, e assim auxiliar no manejo clínico adequado, o que possibilita diminuir a morbidade e melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

Este estudo buscou aprofundar os conhecimentos acerca da expressão de dois importantes genes na imunomodulação em idosos, o IFNG e o VDR. O IFNG está relacionado com o perfil T<sub>H</sub>1 da resposta imune, amplificando a diferenciação celular e estimulando a digestão intracelular de patógenos nos macrófagos, como o *M. leprae*. No caso da hanseníase, portanto, essa molécula contribui para um melhor prognóstico da doença, sendo que sua expressão se encontra aumentada no polo tuberculóide (Britton & Lockwood, 2004).

Em relação ao VDR, este gene apresenta um efeito contrário, uma vez que a interação entre vitamina D com o seu receptor é responsável por um desvio da

resposta imune adaptativa T<sub>H1</sub> para T<sub>H2</sub>, por meio da inibição da expressão de citocinas com perfil T<sub>H1</sub>, tais como IL-2, IFN- $\gamma$  e GM-CSF. Sendo assim, espera-se que o gene codificador de VDR esteja mais expresso no polo lepromatoso (Misch et al., 2010).

As perdas neurológicas causadas pela hanseníase são responsáveis por um grande impacto na vida dos pacientes, tanto pelas restrições físicas como pelo estigma social que as acompanha (Shumet et al., 2005). Para classificar tais perdas, o Ministério da Saúde desenvolveu uma escala que varia de 0 a 2 para definir o grau de incapacidade dos pacientes. Com relação a porcentagem média de pacientes com algum grau de incapacidade, não há consenso na literatura, visto que a mesma pode variar muito de uma população estudada para outra, principalmente em função de dificuldades quanto ao diagnóstico e tratamento (Aben-Athar et al., 2017; Shumet et al., 2005). Entretanto, a idade tem sido um dos fatores associados com o maior risco de neuropatia e conseqüentemente incapacidade (Moschioni et al., 2010; Ranque et al., 2006). Em nosso estudo, a porcentagem de pacientes com perdas neurológicas foi alta, especialmente no grupo multibacilar (55,5%), e tal prevalência pode estar associada tanto ao diagnóstico tardio, como ao perfil imunológico dos pacientes.

A formação de granulomas eficientes contra o *M. leprae* está intimamente relacionada com uma alta produção da citocina IFN- $\gamma$ , uma vez que a mesma é responsável por estimular uma resposta micobactericida em macrófagos através da produção de óxido nítrico e outras espécies reativas de oxigênio (Flynn et al., 1993). Desta forma, ao compararmos expressão gênica de IFNG e o índice baciloscópico, esperávamos encontrar uma correlação negativa entre tais variáveis, ou seja, que indivíduos com um alto IB apresentassem uma menor expressão de IFNG. Entretanto, tal correlação não foi comprovada no presente estudo. Uma possibilidade é o pequeno tamanho amostral e análises de um maior número de pacientes pode validar nossa hipótese.

Na correlação entre índice baciloscópico e expressão gênica de VDR, apesar da mesma não ter sido significativa, foi possível observar uma tendência negativa, ou seja: ocorria uma diminuição da expressão de VDR a medida que os pacientes apresentavam um IB mais alto. Tais resultados podem ser explicados pelo caráter ambíguo da vitamina D, que pode apresentar um papel inibitório ou estimulatório na resposta imune, dependendo do tipo celular (Misch et al., 2010).

Curiosamente, no presente trabalho, não foi observada diferença significativa na expressão de ambos os genes no sangue periférico entre pacientes paucibacilares e multibacilares. No caso do IFNG, a expressão gênica nos dois grupos (PB e MB) foi bastante similar, apesar de dois pacientes no grupo paucibacilar apresentarem uma expressão mais elevada, como seria esperado. Com relação ao resultado da expressão gênica do VDR, nosso trabalho mostrou que o grupo paucibacilar apresentou uma tendência de maior expressão quando comparado ao grupo multibacilar. Sendo assim, uma maior investigação do papel de tais genes na modulação da resposta imune e seus mecanismos de regulação transcricional em idosos se faz necessária. Assim, mais uma vez, é possível que o número amostral baixo tenha “criado” um viés em nossos resultados.

Com relação a influência da idade na produção de IFN- $\gamma$ , um estudo recente demonstrou que há uma redução na produção de IFN- $\gamma$  em monócitos, CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>, tratados com LPS e CLO97 (agonista do TLR 7 e 8) de indivíduos idosos, quando comparados a indivíduos adultos. Mostrando, portanto, que a resposta antimicrobiana, mediada pelo IFN- $\gamma$ , em subconjuntos de monócitos foi significativamente impactada com o envelhecimento (Metcalf et al., 2017). Estes resultados ajudam a explicar o motivo pelo qual os níveis da expressão gênica de IFNG estavam próximos entre os pacientes PB e MB incluídos neste estudo, visto que, com o avanço da idade, os pacientes PB tendem a aumentar a expressão de VDR, o que pode contribuir para redução dos níveis da citocina IFN- $\gamma$ , como verificado por Metcalf e colaboradores.

A produção de IFN- $\gamma$  por monócitos sugere um importante papel dessa citocina na ligação entre a resposta imune inata e adaptativa. Além disso, o IFN- $\gamma$  afeta muitas funções biológicas relacionadas com a defesa do hospedeiro, ciclo celular, apoptose e inflamação (Schroder et al., 2003). Possui um importante papel na regulação positiva das moléculas MHC classe I e II e aumenta a apresentação de antígenos por APCs. O IFN- $\gamma$  também está relacionado ao tráfico de leucócitos, maturação e diferenciação celular (Kraaij et al., 2014). A importância do IFN- $\gamma$  na imunidade contra micobactérias está bem documentada, alguns estudos utilizando camundongos *knockout* para o gene codificador do IFNG, mostraram que quando expostos a uma dose subletal de *M. tuberculosis*, tais animais desenvolveram uma forma disseminada e fatal da doença (Cooper et al., 1993; Flynn et al., 1993).

Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo, com relação a baixa expressão gênica do IFNG em idosos, sugerem uma possível correlação entre a imunossenescência e o desenvolvimento da hanseníase em idosos. Entretanto, este achado não explica as diferentes formas clínicas, sendo necessária a investigação de outros genes que possam estar relacionados com a determinação do espectro clínico. Além disso, não é possível afirmar que a baixa expressão de IFNG seja decorrente da idade, uma vez que tais pacientes não foram acompanhados ao longo dos anos. Assim, um estudo retrospectivo seria ideal neste caso, não só analisando a expressão do gene IFNG como também dosando os níveis séricos da citocina IFN- $\gamma$ .

Com relação ao VDR, seu papel durante o envelhecimento encontra-se bem documentado, com vários estudos apontando para a correlação do mesmo com doenças características do envelhecimento tais como, doenças cardiovasculares, osteoporose, depressão, câncer, demências, doenças autoimune e do trato respiratório (Gussago et al., 2016; Meehan & Penchofer, 2014; Schöttker et al., 2013).

A influência do VDR nesta variedade de doenças está relacionada ao fato de que o receptor da vitamina D é expresso em diferentes tipos celulares, tais como enterócitos, miócitos, células imunes, neurônios e células da glia. No sistema imunológico, o VDR está envolvido em sua regulação através de ações genômicas, como aumento da expressão de citocinas, peptídeos antimicrobianos e desenvolvimento de células T reguladoras. Além disso, o VDR também é responsável por regular a proliferação, diferenciação e apoptose celular (Pusceddu et al., 2015). No entanto, sua função no controle de micobactérias ainda é controverso, uma vez que, ao mesmo tempo que alguns estudos apontam o VDR como sendo responsável por desviar a resposta imune T<sub>H1</sub> para T<sub>H2</sub>, a vitamina D também vem sendo indicada no tratamento de pacientes com tuberculose por acelerar o processo de recuperação dos mesmos (Salahuddin et al., 2013; Mora et al., 2008).

Ademais, com relação ao envelhecimento saudável, a vitamina D apresenta um papel fundamental, em razão de ter sido demonstrada uma correlação inversamente proporcional entre níveis séricos da vitamina e doenças do envelhecimento (Pusceddu et al., 2015). Um estudo recente de Gussago e colaboradores, mostrou uma correlação entre polimorfismos do gene VDR (*BsmI*, *Apal*, *FokI* e *TaqI*) e o envelhecimento bem sucedido (Gussago et al., 2016).

Os resultados deste estudo mostraram um aumento significativo na expressão de VDR em correlação com a idade no grupo paucibacilar, ou seja, houve um aumento na expressão gênica em associação com o aumento da idade dos pacientes, enquanto que no grupo multibacilar essa correlação foi negativa. A partir de tais dados, é possível sugerir que, assim como já demonstrado na tuberculose, o VDR possa contribuir no *clearance* do *M. leprae* e conseqüentemente no melhor prognóstico da doença. Já a respeito da diminuição da expressão de VDR no grupo multibacilar podemos sugerir que esse fato esteja ligado ao avanço do processo de imunossenescência nos idosos, uma vez que vem sendo demonstrado o adiamento do envelhecimento celular pela vitamina D, por meio de sua ação na preservação dos telômeros (Pusceddu et al.,2015).

No entanto, para que tais dados sejam confirmados faz-se necessário o desenvolvimento de outros experimentos, como por exemplo, a análise de polimorfismos no gene do VDR para identificar possíveis associações com a longevidade, já que nem sempre os mesmos refletem em um aumento ou diminuição da expressão gênica. Polimorfismos na região não traducional 3', por exemplo, afeta a estabilidade do mRNA e a eficiência da tradução da proteína, isto é, uma regulação pós-transcricional (Valdivielso & Fernandez, 2006). Além disso, o aumento na população estudada, bem como a introdução de outros dois grupos, a saber: idosos sem hanseníase e pacientes jovens com hanseníase, certamente possibilitariam uma maior compreensão da influência do *M. leprae* e do envelhecimento na imunopatogênese da hanseníase *per se* e na formação do seu espectro clínico.

## 7 CONCLUSÕES

- A expressão gênica do IFNG não apresentou alteração entre os grupos estudados, enquanto que a expressão do VDR mostrou uma tendência de aumento no grupo paucibacilar (PB). Sendo assim, esse aumento pode estar relacionado com a baixa expressão do IFNG no grupo PB, uma vez que o VDR é responsável pelo desvio da resposta T<sub>H1</sub> para T<sub>H2</sub>.
- A correlação entre expressão gênica dos pacientes multibacilares (MB) e índice baciloscópico (IB) não apresentou significância para nenhum dos dois genes analisados.
- Na correlação entre expressão gênica e idade dos pacientes estudados, houve um aumento significativo da expressão gênica do VDR com o aumento da idade no grupo paucibacilar (PB), assim como uma tendência de decréscimo na expressão do VDR com o aumento da idade no grupo multibacilar (MB). Logo, é possível sugerir que o receptor de vitamina D possa ter um papel importante no prognóstico da doença durante o envelhecimento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEN-ATHAR CY, LIMA SS, ISHAK R, VALLINOTO AC. Assessment of the sensory and physical limitations imposed by leprosy in a Brazilian Amazon Population. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2017; 50(2):223-228.

AGONDI RC, RIZZO LV, KALIL J, BARROS MT. Imunossenescência. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol**. 2012; 35(5):169-76.

ALTER A, DE LESELEUC L, VAN THUC N, THAI VH, HUONG NT, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. **Hum Genet**. 2010; 127:337–348.

BANERJEE S, BISWAS N, KANTI DAS N, SIL A, GHOSH P, HASANOOR RAJA AH, DASGUPTA S, KANTI DATTA P, BHATTACHARYA B. Diagnosing leprosy: revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis. **Int J Dermatol**. 2011; 50:1522-1527.

BENCHIMOL, JL, SÁ, MR, orgs. Adolpho Lutz: Hanseníase - Leprosy. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004. 660 p. **Adolpho Lutz Obra Completa**, vol. 1, book 2.

BRITTON WJ, LOCKWOOD DN. **Leprosy. Lancet**. 2004; 363: 1209-19.

BUHRER-SEKULA, S. PGL-I leprosy serology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. 2008, vol.41, suppl.2, pp. 3-5.

CANDIANI, JO. Dermatologia. **Guias De Diagnostico Y Tratamiento Del Cilad**. V.1, p.493. Editora: Gen grupo editora nacional. 2015.

CARDOSO CC, PEREIRA AC, DE SALES MARQUES C, MORAES MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiol**. 2011;6(5):533-49

CEVENINI E, MONTI D, FRANCESCHI C. Inflamm-ageing. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. 2013; 16:14-20.

COLE ST, EIGLMEIER K, PARKHILL J, JAMES KD, THOMSON NR, WHEELER PR, HONORÉ N, GARNIER T, CHURCHER C, HARRIS D, MUNGALL K, BASHAM D, BROWN D, CHILLINGWORTH T, CONNOR R, DAVIES RM, DEVLIN K, DUTHOY S, FELTWELL T, FRASER A, HAMLIN N, HOLROYD S, HORNSBY T, JAGELS K,



LACROIX C, MACLEAN J, MOULE S, MURPHY L, OLIVER K, QUAIL MA, RAJANDREAM MA, RUTHERFORD KM, RUTTER S, SEEGER K, SIMON S, SIMMONDS M, SKELTON J, SQUARES R, SQUARES S, STEVENS K, TAYLOR K, WHITEHEAD S, WOODWARD JR, BARRELL BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**. 2001. 22;409(6823):1007-11.

COOKE G S, CAMPBELL SJ, SILLAH J, GUSTAFSON P, BAH B, SIRUGO G, BENNETT S, MCADAM KP, SOW O, LIENHARDT C, HILL AV. Polymorphism within the interferon- $\gamma$ /receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. 2006; 174:339–343.

COOPER AM, DALTON DK, STEWART TA, GRIFFIN JP, RUSSEL DG, ORME IM. Disseminated Tuberculosis in Interferon  $\gamma$  Gene-disrupted Mice. **J. Exp. Med**. 1993; 2243-2247.

DEPS PD, ALVES BL, GRIPP CG, ARAGAO RL, GUEDES B, FILHO JB, ANDREATTA MK, MARCARI RS, PRATES I, RODRIGUES LC. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**. 2008;74(4):338-42.

DERHOVANESSIAN E, Larbi A, Pawelec G. Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection. **Current Opinion in Immunology**. 2009; 21:440–445.

FITNESS J, FLOYD S, WARNDORFF DK, SICHALI L, MWAUNGULU L, CRAMPIN AC, FINE PE, HILL AV. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **Am. J. Trop. Med**. 2004; 71:330–340.

FLYNN JL, CHAN J. Immunology of tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol**. 2001; 19:93–129

FLYNN JL, CHAN J, TRIEBOLD KJ, DALTON DK, STEWART TA, BLOOM BR. An Essential Role for Interferon  $\gamma$  in Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **J. Exp. Med**. 1993; 2249-2254

GALLO MEN, SAMPAIO EP, NERY JAC, MORAES MO, ANTUNES SLG, PESSOLANI MCV, SARNO EN. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. Em: Coura, JR (ed.) Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Rio de Janeiro, RJ. **Ed. Guanabara Koogan**. 2005; p.1383-94.

GUSSAGO C, AROSIO B, GUERINI FR, FERRI E, COSTA AS, CASATI M, BOLLINI EM, RONCHETTI F, COLOMBO E, BERNARDELLI G, CLERICI M, MARI D. Impact

of vitamin D receptor polymorphisms in centenarians. **Endocrine**. 2016; DOI 10.1007/s12020-016-0908-7

HUANG E, TEDONE E, O'HARA R, CORNELIUS C, LAI T, LUDLOW A, WRIGHT WE, SHAY JW. The Maintenance of Telomere Length in CD28+ T Cells During T Lymphocyte Stimulation. **Scientific Reports**. 2017; 7:6785

ITO T, HANDA H. Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. **Congenit Anom**. 2012; 52(1):1-7.

KRAAIJ MD, VEREYKEN EJF, LEENEN PJM, VAN DEN BOSCH TPP, REZAEI F, BETJES MGH, BAAN CC, ROWSHANI AT. Human monocytes produce interferon-gamma upon stimulation with LPS. **Elsevier Ltd**. 2014; 1043-4666.

LIBRATY DH, AIRAN LE, UYEMURA K, et al. Interferon-gamma differentially regulates interleukin-12 and interleukin-10 production in leprosy. **J Clin Invest** 1997;99:336–41.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. 2001;25(4):402-8.

LOCKWOOD, DN, SUNEETHA, S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. **Bull World Health Organ**. 2005; 83(3):230-5

MARTINEZ TS, FIGUEIRA MM, COSTA AV, GONÇALVES MA, GOULART LR, GOULART IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clin Microbiol Infect**. 2011;17(11):1653-8.

MEEHAN M, PENCKOFER S. The Role of Vitamin D in the Aging Adult. **J. Aging Gerontol**. 2014; 2(2): 60–71.

METCALF TU, WILKINSON PA, CAMERON MJ, GHNEIM KHADER, CHIANG C, WERTHEIMER AM, HISCOTT JB, NIKOLICH-ZUGICH J, HADDAD EK. Human Monocyte Subsets Are Transcriptionally and Functionally Altered in Aging in Response to Pattern Recognition Receptor Agonists. **The Journal of Immunology**. 2017

Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Hanseníase, Verminoses, Tracoma têm cura: a experiência de uma campanha integrada. Secretaria de Vigilância em Saúde: Ministério da Saúde; 2016<sup>a</sup>.

Ministério da Saúde. Hanseníase. **Situação Epidemiológica**. 2001-2016<sup>b</sup>. Disponível em <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/10/Indicadores->

[epidemiol--gicos-e-operacionais-de-hansen--ase.%20Brasil,%202001-.pdf](#). Acessado em 13/10/2017.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase/Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 54 p.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portal Saúde. Ministério recomenda: é preciso envelhecer com saúde, Brasil, 2016<sup>d</sup>. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/25924-ministerio-recomenda-e-preciso-envelhecer-com-saude>. Acessado em 08/12/2017.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portal Saúde. Registro ativo: número e percentual, casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2016<sup>e</sup>. Disponível em: [http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/11/Tabela%20Geral\\_12016.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/11/Tabela%20Geral_12016.pdf). Acessado em 08/12/2017.

MIRA MT, ALCAÏS A, NGUYEN VT, MORAES MO, DI FLUMERI C, VU HT, MAI CP, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**. 2004;427(6975):636-40.

MISCH EA, MACDONALD M, RANJIT C, SAPKOTA BR, WELLS RD, SIDDIQUI MR, KAPLAN G, HAWN TR. Human TLR1 Deficiency Is Associated with Impaired Mycobacterial Signaling and Protection from Leprosy Reversal Reaction. **PLoS Negl Trop Dis**. 2008; 2(5): e231.

MISCH EA, BERRINGTON WR, VARY J C, HAWN TR. Leprosy and the human genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 2010; 74, 589–620

MODLIN RL. The innate immune response in leprosy. **Curr Opin Immunol**. 2010; 22(1): 48–54.

MONTEIRO, YN. Hanseníase: história e poder no Estado de São Paulo. **Hansenologia Internationalis**. 1987; v. 12, n.1, p.1-7.

MORA JR, IWATA M, ANDRIAN UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nat Rev Immunol**. 2008; 8(9):685-698.

MORAES MO, CARDOSO CC, VANDERBORGHT PR, PACHECO AG. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev**. 2006; 77(3):189-202.

MORAES MO, DUPPRE NC, SUFFYS PN, et al.: Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. **Immunogenetics**. 2001; 53(1): 45–47.

MOSCHIONI C, ANTUNES CM, GROSSI MA, LAMBERTUCCI JR. Risk factors for physical disability at diagnosis of 19,283 new cases of leprosy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2010; 43(1):19-22

NAAFS B. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Treatment of reactions and nerve damage. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. 1996;64:S21-8

NG V, ZANAZZI G, TIMPL R, TALTS JF, SALZER JL, BRENNAN PJ, RAMBUKKANA A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**. 2000; 103:511–529.

NOBRE ML. Estratégias para bloquear a transmissão da hanseníase em município hiperendêmico - Mossoró-RN. 2016. 254 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2016.

PANDYA, SS. Anti-Contagionism in Leprosy, 1844-1897. **Int J Lepr** 1998; 66(3): 374-84.

PARKASH O, KUMAR A, PANDEY R, NIGAM A, GIRDHAR BK. Performance of a lateral flow test for the detection of leprosy patients in India. **Journal of Medical Microbiology**. 2008; 57: 130-132.

PINTO, PGHR. O estigma do pecado: a lepra durante a idade média. **Revista de saúde coletiva**. 1985; Vol. 5, No.1.

PLACKETT, T. P., E. D. BOEHMER, D. E. FAUNCE, E. J. KOVACS. Aging and innate immune cells. **J. Leukoc. Biol**. 2004; 76: 291-299

PREVEDELLO FC, MIRA MT. Leprosy: a genetic disease? **An Bras Dermatol**. 2007; 82: 451-9.

PUSCEDDU I, FARREL CJ, PIERRO AM, JANI E, HERRMANN W, HERRMANN M. The role of telomeres and vitamin D in cellular aging and age-related diseases. **Clin Chem Lab Med**. 2015; 53(11): 1661-1678

RANQUE B, NGUYEN VT, VU HT, NGUYEN TH, NGUYEN NB, PHAM XK, SCHURR E, ABEL L, ALCAIS A. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal

reactions in Vietnamese patients with leprosy. **Clinical Infectious Diseases**. 2007; 44:33–40

RIDLEY DS, JOPLING WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis**. 1966;34(3):255-273.

ROSA FB, SOUZA VC, ALMEIDA TA, NASCIMENTO VA, VÁSQUEZ FG, CUNHA MDA G, NAVECA FG. Detection of Mycobacterium leprae in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2013;108(5):572-7.

SALAHUDDIN N, ALI F, HASAN Z, RAO N, AQEEL M, MAHMOOD F. Vitamin D accelerates clinical recovery from tuberculosis: results of the SUCCINCT Study [Supplementary Cholecalciferol in recovery from tuberculosis]. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of vitamin D supplementation in patients with pulmonary tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**. 2013; 13:22.

SAUNDERSON P, GROENEN G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES project, ALERT, Ethiopia. **Leprosy Review**. 2000; 71: 34-42.

SCHÖTTKER B, HAUG U, SCHOMBURG L, KÖHRLE J, PERNA L, MÜLLER H, HOLLECZEK, BRENNER H. Strong associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with all-cause, cardiovascular, cancer, and respiratory disease mortality in a large cohort study. **Am. J. Clin. Nutr**. 2013; 97:782-93.

SCHRODER K, HERTZOG PJ, RAVASI T, HUME DA. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol**. 2004; 75:163–189.

SCOLLARD, DM, ADAMS, LB, GILLIS, TP, KRAHENBUHL, JL, TRUMAN, RW, WILLIAMS, DL. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**. 2006;19(2):338-81.

SHEPARD CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. **J Exp Med**. 1960;112(3):445-54.

SHUMET T, DEMISSIE M, BEKELE Y. Prevalence of disability and associated factors among registered leprosy patients in all Africa Tb and leprosy rehabilitation and Training Centre (ALERT), Addis Ababa, Ethiopia. **Ethiop J Health Sci**. 2015; Vol. 25, No. 4

SPENCER JS, KIM HJ, WHEAT WH, CHATTERJEE D, BALAGON MV, CELLONA RV, TAN EV, GELBER R, SAUNDERSON P, DUTHIE MS, REECE ST, BURMAN W,

BELKNAP R, MAC KENZIE WR, GELUK A, OSKAM L, DOCKRELL HM, BRENNAN PJ; IDEAL Consortium. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. **Clin Vaccine Immunol.** 2011;18(2):260-7.

SUNEETHA S, ARUNTHATHI S, JOB A, DATE A, KURIAN N, CHACKO CJ. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. **Lepr Rev.** 1998; 69(4):358-66.

TRAUTMAN, JR. A brief history of hansen's disease. **Bulletin of the New York academy of medicine.** 1984; Vol. 60, No. 7.

TRINCHIERI G. Interleukin-12 and its role in the generation of T<sub>H</sub>1 cells. **Immunol. Today.** 1993; 14:335–338.

VALDIVIELSO JM, FERNANDEZ E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. **Elsevier.** 2006; 1- 12.

WALKER SL, LOCKWOOD DN. The clinical and immunological features of leprosy. **Br Med Bull.** 2006; 77-78:103-21.

WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2013.

WHO. Weekly epidemiological record. Geneva: World Health Organization; 2015  
World Health Organization. Leprosy Elimination Project: status report 2003– 2004. Geneva: WHO; 2004.

WHO. World Health Organization. Leprosy Elimination advisory group. Guide to eliminate leprosy as a public health problem: multidrug therapy cures leprosy, stops transmission and prevents disabilities. Geneva: Leprosy Elimination Group. WHO,2000.

YAMAMURA M, UYEMURA K, DENS RJ, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science.** 1991; 254:277–9.

ZHANG FR, HUANG W, CHEN SM, SUN LD, LIU H, LI Y, CUI Y, et al. Genomewide association study of leprosy. **N Engl J Med.** 2009; 361(27):2609-18.