

Resposta de citocinas aos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA em pacientes com hanseníase e contatos intradomiciliares provenientes de regiões endêmicas do Rio de Janeiro e Minas Gerais

Pedro Henrique Ferreira Marçal^{2,3,5}
Gabriel Coimbra Carvalho Schuwarden¹
Vitória Eler Fava¹
Leonardo Oliveira Leão e Silva⁴
Suely Maria Rodrigues⁴
Sueli Siqueira⁴
Lúcia Alves de Oliveira Fraga⁶
Henrique Couto Teixeira⁷

¹Acadêmico(a) do curso de Medicina da Universidade Vale do Rio Doce - Univale

²Acadêmico do programa de doutorado em Imunologia e Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF/Campus Juiz de Fora

³Professor(a) do curso de Farmácia da Universidade Vale do Rio Doce - Univale

⁴Professor(a) do curso de mestrado em Gestão Integrada do Território da Universidade Vale do Rio Doce - Univale

⁵Coordenador do curso de Farmácia da Universidade Vale do Rio Doce - Univale

⁶Professora do Departamento de Ciências da Vida da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF/Campus Governador Valadares

⁷Professor da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF/Campus Juiz de Fora

Resumo

A hanseníase ainda permanece como um grave problema de saúde pública no Brasil e em diversas regiões do mundo. Dificuldades no diagnóstico resultam em atraso no tratamento, aumento de casos severos da doença e maior frequência de incapacidades. Ainda não existe um teste sorológico rotineiramente utilizado no diagnóstico da hanseníase. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial diagnóstico de três antígenos específicos do *M. leprae*: (i) LID-1 ou “Leprosy IDRI diagnostic 1”, uma proteína de fusão das proteínas recombinantes ML0405 e ML2331; (ii) NDO-HSA, um conjugado formado pelo dissacarídeo natural octil (NDO), uma versão sintética do glicolípido fenólico 1 (PGL-1) ligado à albumina sérica humana (HSA); e, (iii) NDO-LID, um conjugado originado da combinação de LID-1 com o NDO. No presente estudo, foram também analisados os níveis de IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 após estímulo de PBMC com os antígenos LID-1, NDO-LID and NDO-HSA em pacientes com hanseníase MB (10) e PB (10) e indivíduos dos grupos CPB (08) e CMB (09). Nossos resultados mostram que com relação à contribuição das citocinas na infecção pelo *M. leprae*, os resultados demonstraram que a produção de IL-17 foi significativamente maior no grupo PB após estímulo com os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA. Além disso, a estimulo com o antígeno LID-1 também levou ao aumento da produção de IFN, TNF e IL-2 neste mesmo grupo de indivíduos. Por outro lado, foi possível observar que o grupo MB apresentou maior produção de IL-6 após estímulo com LID-1, e IL-4 após estímulo com LID e NDO-LID. Esses resultados sugerem que testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos IgG, IgG1 e IgM podem representar ferramentas úteis no diagnóstico da hanseníase. Neste sentido, os resultados indicam um melhor desempenho dos antígenos LID-1 e NDO-LID, em comparação ao antígeno NDO-HSA. E que a pesquisa de citocinas contra os antígenos em questão constitui bons biomarcadores para a caracterização das formas clínicas de hanseníase.

Palavras-Chave: Hanseníase, Sorodiagnóstico, proteínas recombinantes, LID-1, NDO-LID, NDO-HSA

Introdução

Apesar da queda da prevalência mundial ocorrida nos últimos anos, após a instituição do tratamento através da poliquimioterapia (PQT) e do simples diagnóstico, a hanseníase ainda constitui um relevante

problema de saúde pública, devido à sua magnitude e seu alto poder incapacitante, atingindo principalmente a faixa etária economicamente ativa (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; GOULART et al., 2008; WHO, 2007).

Mesmo com a sua baixa contagiosidade, a doença continua a ser endêmica, atingindo uma população estimada entre 10 e 15 milhões de pessoas que vivem em países tropicais pobres (KUMAR; FAUSTO; ABBAS, 2005; SILVA, 2008; WHO, 2007).

O Ministério da Saúde define como caso de hanseníase para tratamento a presença de dois ou mais desses sinais: lesão de pele com alteração de sensibilidade, espessamento neural e baciloscopia positiva (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A hanseníase, ou doença de Hansen, é uma doença infecciosa, crônica, granulomatosa, causada por um microorganismo intracelular, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que afeta principalmente a pele, os olhos e o tecido nervoso, causando lesões cutâneas e neuropatias, que podem levar a deformidades físicas e alterações funcionais (BRASILEIRO FILHO, 2006).

Suas características clínicas e histológicas irão depender da resposta imunológica do indivíduo infectado ao *M. leprae* e que podem variar de uma hanseníase tuberculoide à forma lepromatosa no outro polo (WALKER; LOCKWOOD, 2006; LOCKWOOD; COLSTON; KHANOLKAR-YONG, 2002).

A doença, em sua forma inicial, é classificada como grupo indeterminado, mal de Hansen forma indeterminada (MHI), que pode regredir espontaneamente ou evoluir para uma das principais formas da doença: hanseníase tuberculoide, mal de Hansen forma tuberculoide (MHT), hanseníase virchowiana, mal de Hansen forma virchowiana (MHV) e hanseníase dimorfa, mal de Hansen forma dimorfa (MHD), segundo a classificação de Madri (AMADOR, 2004; ARAÚJO, 2003; MENDONÇA et al., 2008).

A hanseníase tuberculoide e a hanseníase virchowiana são as duas formas polares e estáveis da doença. A primeira está relacionada com forte resposta imunológica celular, e a segunda, com resposta imunológica celular deficiente. A hanseníase dimorfa é uma forma clínica instável, em que o paciente apresenta uma mistura de características das duas formas estáveis, podendo um mesmo indivíduo apresentar episódios reacionais que variam em características clínicas das duas formas polares (ALVES et al., 2006; AMADOR, 2004).

Na hanseníase tuberculoide (HT) ocorre uma forte reação imunológica mediada por células com

baixos níveis de anticorpos. O padrão de resposta imunológica das células T, que ocorre em alguns indivíduos nesse polo, é dado pela diferenciação das células T CD4+ naive, em células TH1, as quais ativam fagócitos para eliminar microorganismos ingeridos através da liberação do interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 2 (IL-2) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

As células CD4+, na HT, serão encontradas principalmente dentro de granulomas formados por macrófagos, que expressam CD68, e em seu processo de fagocitose, as lisozimas e linfócitos sob a influência das citocinas, particularmente o TNF- α . As células CD8+ são encontradas na superfície desses granulomas (WALKER; LOCKWOOD, 2006; ABBAS; LICHTMAN, 2005; ARAÚJO, 2003).

A resposta imunológica ocorrida no polo lepromatoso se dá através de um grande número de anticorpos específicos, mas com fraca resposta mediada por células ao *M. leprae*. O bacilo irá se proliferar dentro dos macrófagos e será detectado em grande número, resultando em lesões de pele e tecidos subjacentes (WALKER; LOCKWOOD, 2006; MENDONÇA et al., 2008).

Há pouca formação de granulomas. A diferenciação das células T CD4+ naive em células TH2, apresentada por alguns indivíduos, promove a produção de IL-10, IL-4 e IL-13 o que acarretará na inibição da ativação dos macrófagos, levando a uma falha no controle da propagação dos bacilos e uma alta contagem de bactérias (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ARAÚJO, 2003; WALKER; LOCKWOOD, 2006).

O bacilo, em alguns indivíduos infectados, se propaga para nervos periféricos onde será fagocitado por células de Schwann e macrófagos ocasionando o dano neural ou neuropatia, responsável pela instalação de incapacidades físicas nestes indivíduos (GOMES; FRADE; FOSS, 2007).

A neuropatia periférica ocorre, então, como uma doença inflamatória dos nervos, com uma patogênese não muito bem compreendida, mas é evidente a importância do processo inflamatório na destruição das fibras nervosas (ANTUNES et al., 2006; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

Sendo o diagnóstico da doença essencialmente clínico, torna-se relevante a utilização de técnicas que permitam uma melhor avaliação do espectro clínico da doença. A incorporação de ferramentas para diagnóstico contribui na identificação de potenciais casos novos, entre contatos. Mais recentemente, a decodificação do genoma completo do *M. leprae*, e o advento

de novas ferramentas de biologia molecular, têm permitido a produção de proteínas recombinantes, e sua avaliação como antígenos potenciais para o diagnóstico da hanseníase (GELUK et al., 2010, RICHARDUS e OSKAM, 2015). O monitoramento dos contatos com o auxílio dessas ferramentas subsidiará elaboração de modelos que detectem indivíduos com maior risco de adoecer e que precisariam de acompanhamento diferenciado (DUPPRE et al., 2012; MARTINEZ et al., 2011; CABRAL et al., 2013;). Dessa maneira, o principal objetivo do estudo foi avaliar a resposta imune humoral e celular de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares utilizando proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* com potencial aplicação para o diagnóstico da hanseníase.

Metodologia

População Estudada

A tabela 1 apresenta características sociodemográficas dos indivíduos incluídos no estudo. Foram incluídos também no estudo, pacientes e contatos residentes na região de Governador Valadares/MG. Casos de hanseníase Multibacilar (n=10), casos de hanseníase paucibacilar (n=10). Os casos de hanseníase foram diagnosticados pelo corpo técnico do Centro de Referência de Doenças Endêmicas e Programas Especiais (CREDEN-PES), Secretaria Municipal de Saúde de Gov. Valadares. O diagnóstico ocorreu após o exame clínico de critérios dermatoneurológico, com suporte laboratorial. Os pacientes foram agrupados de acordo com o sistema de classificação Ridley-Jopling de manifestações clínicas (Ridley & Jopling, 1966). Todos os pacientes e controles deram um consentimento por escrito. Os pacientes foram estratificados em paucibacilares (PB) ao apresentar cinco ou menos lesões cutâneas e baciloscopia negativa, ou multibacilares (MB), ao apresentar mais de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva, conforme descrito pela classificação operacional adotada pela Organização Mundial da Saúde (WHO 1991). Contatos familiares (HHC) que residiam com pacientes com hanseníase multibacilares (HHC-MB, n = 09) ou paucibacilares (HHC-PB, n = 08) ou tinham residido com pacientes com hanseníase cinco anos antes do diagnóstico confirmativo foram selecionados e examinados por médicos com formação específica. Onze (11) indivíduos saudáveis do residentes na região leste de Minas Gerais, sem história prévia de doença micobacteriana foram incluídos como controles endêmicos (EC).

Foram critérios de inclusão dos pacientes: diagnóstico de hanseníase, de acordo com critérios do Ministério da Saúde; contatos intradomiciliares que não possuíam sinais e sintomas clínicos de hanseníase; controles sadios sem história prévia de hanseníase ou contato com pacientes hansenianos; fornecer/assinar TCLE. Os critérios de exclusão foram: disfunção hepática/alcoolismo, diabetes melitus, gravidez, pacientes HIV-positivo e uso de drogas imunossupressoras.

Tabela 1: Características dos participantes do estudo

Grupos	n	Sexo (M/F)	Idade em anos
			(media) Gov. Valadares
Pacientes - PB	10	7/3	12-68 (43,6)
Pacientes - MB	10	4/6	47-66 (55,5)
Contato de PB (CPB)	08	5/3	7-60 (39)
Contato de MB (CMB)	09	3/6	13-56 (31,2)
Controle Endêmico (EC)	11	4/7	11-74 (43,25)
Total	48	23/25	7-74 (42,51)

Coleta de dados e Exame Clínico

Para obtenção de informações relativas aos participantes do estudo, que permitiram melhor caracterização da população, foram coletados dados fornecidos pelo SINAN, e prontuários clínicos. Todos os participantes do estudo passaram por exame clínico para o diagnóstico de hanseníase, que é baseado em um ou mais dos três sinais: manchas hipocrômicas ou avermelhadas com perda de sensibilidade, nervos periféricos espessados e exame bacterioscópico para detecção de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) em esfregaços de pele ou biópsia de lesão, segundo protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Após o exame clínico a prescrição de BCG é feita de acordo com as normas do Ministério da Saúde.

Coleta de sangue.

As amostras de sangue dos participantes do estudo foram coletadas por profissionais qualificados da área de saúde, respeitando as técnicas de biossegurança, tais como uso de luvas, material estéril e descartável. Foram coletados 30 ml de sangue utilizando tubos estéreis a vácuo e descartáveis (VACUTAINER, Grand Island, NY, USA), para os ensaios sorológicos de detecção de anticorpos e citocinas.

Os soros foram obtidos por meio de centrifugação de amostras de sangue a 800g por 10 min a 4°C.

As amostras de soro foram acondicionadas à -20°C em alíquotas de 1ml e utilizadas posteriormente para determinação dos isotipos específicos e citocinas.

Antígenos

No presente trabalho foram utilizados os antígenos NDO-HSA, LID-1 e NDO-LID, gentilmente cedidos pelo Dr. Malcon Duthie, do Infectious Disease Research Institute (IDRI), Seattle, USA. Os antígenos utilizados foram diluídos inicialmente em água ultra-pura e estocados a -20 °C, até serem usados nos ensaios.

Detecção da produção de citocinas pelo método CBA

Amostras de 5 µl dos soros dos participantes do estudo, foram utilizadas para quantificação de citocinas por meio do método "cytometric bead array" (CBA). Os reagentes utilizados nesta etapa foram provenientes dos kits ("Human chemokine – kit I" e "Human Th1/Th2 cytokine kit II") adquiridos da Becton Dickinson. Em cada tubo com essas alíquotas foram adicionados 20 µl de diluente G. Posteriormente, as amostras receberam 3ul de cada reagente, para marcar a presença de cada citocina (IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-6, IL-10, IL-2, IL-17), e em seguida os tubos foram lavados com 500 µl de reagente F e centrifugados a 1300 rpm durante 7 minutos. Em cada tubo os sobrenadantes provenientes dessa centrifugação foram aspirados com bomba à vácuo, restando aproximadamente 100 µl de amostras marcadas. Foram adicionados 18 ul de revelador (reagente B) em cada amostra, para incubação à temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos. Após esse período, as amostras foram novamente lavadas, centrifugadas e aspiradas nas mesmas condições citadas acima. Em cada tubo foram colocados 100 µl de reagente F para leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson). Após a leitura dos tubos contendo padrões e amostras, os dados foram analisados no software BD CBA Isotype Analysis (Becton Dickinson), onde os valores serão representados em concentração (pg/ml) de cada citocina.

Análise estatística

A comparação das medianas entre os grupos foi realizada, para cada antígeno, através do teste não paramétrico Mann Whitney U, como apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de diferença estatística significativa entre os grupos estudados.

Resultados

Produção de citocinas em resposta às proteínas recombinantes LID-1, NDO-LID e NDO-HSA

As proteínas recombinantes LID-1, NDO-LID e NDO-HSA foram utilizadas para induzir a produção de citocinas em PBMC de pacientes com hanseníase Paucibacilar (PB), Multibacilar (MB), contatos intradomiciliares de pacientes Paucibacilares (CPB) e Multibacilares (CMB), bem como em controles endêmicos (CE). A produção de IL-17, IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2, foi avaliada no sobrenadante de cultura de PBMC, utilizando o método CBA. A figura 5 (próxima página) mostra que as proteínas recombinantes LID-1 e NDO-LID foram capazes de estimular alta produção de IL-17, em pacientes PB, em comparação com os demais grupos estudados. A produção de IL-17 frente a proteína NDO-HSA foi significativamente maior no grupo PB, quando comparado com o grupo MB. Interessantemente, observa-se também alta produção de IFN-γ e TNF-α (figura 5), no sobrenadante de cultura de PBMCs de pacientes PB, estimulados com LID-1, comparando com os resultados obtidos de pacientes MB. A produção de IL-2 (figura 5) em pacientes PB, foi também maior frente ao estímulo com os antígenos LID-1 e NDO-LID, em comparação com o grupos de pacientes MB ($p < 0,05$).

A produção de IL-6 (Fig. 6 - próxima página), no sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes MB, estimulados com LID-1, foi significativamente maior, quando comparado com pacientes PB. Além disso, houve alta produção de IL-4 frente aos estímulos com LID-1 e NDO-LID, em pacientes com hanseníase MB.

Em conjunto esses resultados sugerem a possibilidade de uso dessas proteínas recombinantes para avaliação da resposta celular. Além da discriminação entre grupos de indivíduos com hanseníase Multibacilar e Paucibacilar, o que pode auxiliar na diagnóstico e classificação das formas clínicas da doença. Soma-se a isso, a possibilidade de encontrar entre os contatos intradomiciliares, indivíduos com predisposição ao desenvolvimento da hanseníase.

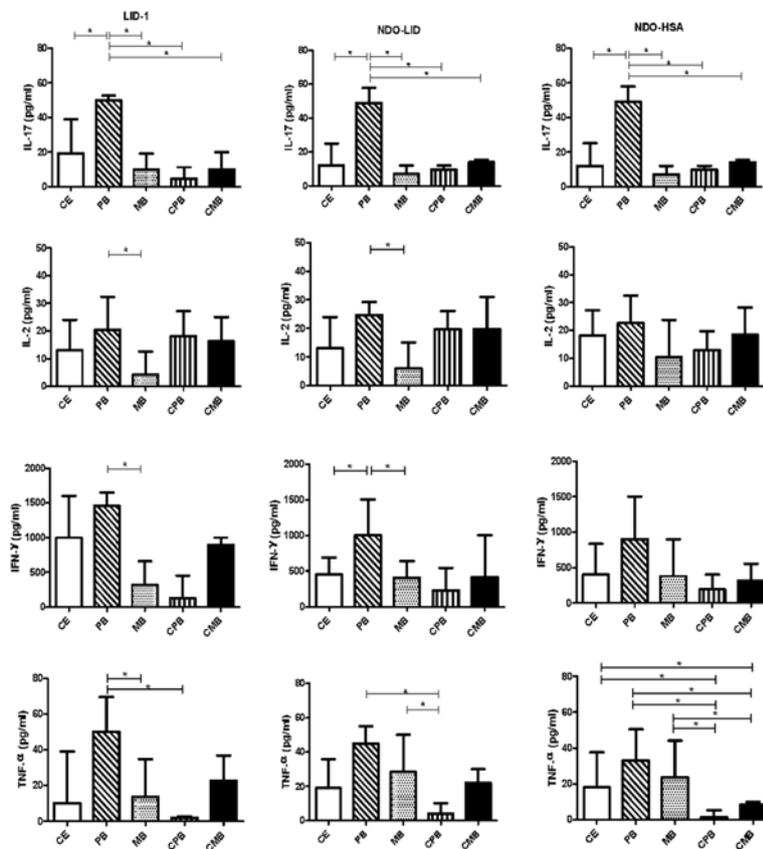


Figura 5: Produção de IL-17, IL-2, IFN- γ e TNF- α por PBMCs estimulados com LID-1, NDO-LID e NDO-HSA (2 μ g/ml) em indivíduos controle edêmico (CE), pacientes com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), contatos intradomiciliares de PB (CPB) e MB (CMB). As barras representam as medianas. *p < 0.05.

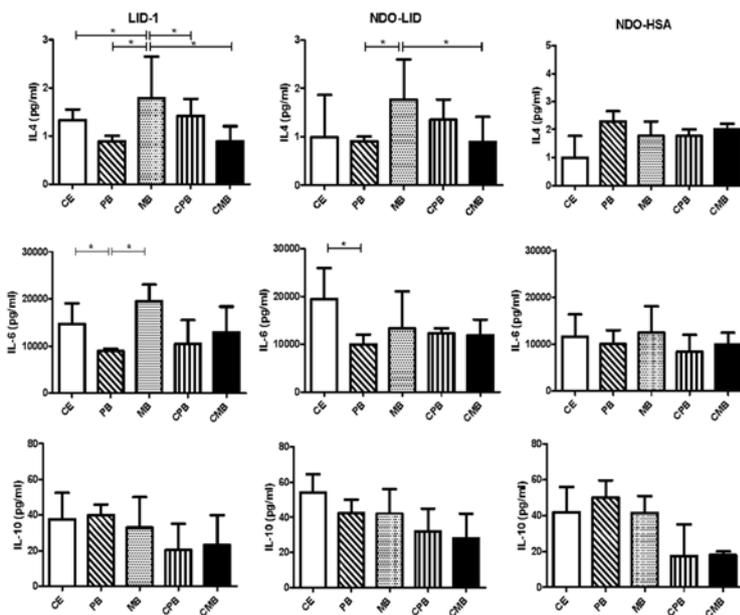


Figura 6: Produção de IL-4, IL-6 and IL-10 por PBMCs estimulados com LID-1, NDO-LID e NDO-HSA (2 μ g/ml) em indivíduos controle edêmico (CE), pacientes com hanseníase paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), contatos intradomiciliares de PB (CPB) e MB (CMB). As barras representam as medianas. *p < 0.05.

Discussão

Em um estudo realizado por SAMPAIO et al., 2011, os autores sugeriram que possíveis testes diagnósticos devem considerar a capacidade de proteínas recombinantes de *M. leprae* de induzir respostas celulares, visto que segundo o espectro imunológico da doença, indivíduos com hanseníase paucibacilar apresentam pouca resposta humoral e alta resposta imune celular. De acordo a literatura, os pacientes PB e os seus contatos apresentam predomínio da resposta imune do tipo Th1 e baixa resposta do tipo Th2, havendo reduzida carga bacilar (SAMPALIO et al., 2011; RADA et al., 2012; KUMAR et al., 2014). Em concordância, notamos que os grupos PB e CPB apresentaram uma baixa detecção de anticorpos. Desta forma, testes para avaliação da resposta imune celular, como a determinação de IFN- γ , são, em tese, mais indicados que os testes sorológicos, para a identificação precoce dos pacientes PB e seus contatos. A hanseníase tuberculóide é caracterizada por uma forte resposta das células de tipo Th1 com lesões localizadas, enquanto a hanseníase lepromatosa é marcada por sua anergia seletiva de células T ao *Mycobacterium leprae* levando a doença disseminada e progressiva (SAINI et al., 2013). Diante dessas informações, nesse estudo foi analisada resposta imune celular dos indivíduos com base na produção das citocinas IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 por meio da técnica de CBA.

Observou-se que os antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA foram capazes de estimular produção significativa das citocinas IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-2 em pacientes com hanseníase Paucibacilar (PB). Visando desenvolver um método diagnóstico para hanseníase PB, diversos estudos tem utilizado a detecção de IFN- γ como marcador de imunidade celular após estímulo de células sanguíneas com proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos do *M. leprae*. Corroborando com os achados do estudo atual, tem sido mostrado que a secreção de IFN- γ em resposta a proteínas e peptídeos do *M. leprae* é observada tipicamente em pacientes TT/BT, contatos domiciliares e em alguns controles saudáveis de áreas endêmicas que foram expostos/infectados pelo *M. leprae* (ARAOZ et al., 2006; DUTHIE et al., 2008a; GELUK, 2013a;2013b; GELUK et al., 2012; GELUK et al., 2005; GELUK et al., 2009; GELUK et al., 2010; SAMPAIO et al., 2011). Saini et al., (2013), mostraram frequência aumentada de células Th17, produtoras de IL-17 em pacientes com hanseníase tuberculóide.

As células Th17 são uma subpopulação de linfócitos T CD4+ que desempenham importante papel na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas. Entre as formas clínicas da hanseníase, as citocinas IL-17, IL-21, IL-22 e o fator de transcrição RORC (*retinoic acid-related orphan nuclear hormone receptor C*) apresentaram maior expressão em pacientes com hanseníase TT do que em pacientes LL. Este estudo sugere que as células Th17 atuam como uma via alternativa de diferenciação celular para o controle da carga bacilar em pacientes que foram incapazes em montar uma resposta Th1 ou Th2 (SAINI et al., 2013).

O estudo demonstrou claramente um perfil de citocinas inflamatórias (IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-2) produzidas no sobrenadante de cultura de PBMC de indivíduos com hanseníase tuberculóide. Diferentemente do observado em pacientes com hanseníase multibacilar, que apresentaram produção aumentada de citocinas IL-6 e IL-4, características da resposta Th2.

Em resumo, nossos dados sugerem que produção de IgG e IgG1 anti LID-1 e NDO-LID por ELISA, em pacientes multibacilares, bem como o uso dos antígenos LID-1, NDO-LID e NDO-HSA para a avaliação da resposta imune celular em pacientes paucibacilares, pode auxiliar na identificação de populações em risco de desenvolver hanseníase. Em áreas endêmicas para hanseníase é essencial a utilização de ferramentas que auxiliem no diagnóstico clínico. De acordo com os resultados e a fácil execução de testes sorológicos, é interessante considerá-los com potencial para discriminação de indivíduos doentes de uma população sadia em risco de adoecimento e conseqüente controle da doença.

Referências Bibliográficas

- ALVES L; DE MENDONÇA LIMA L; DA SILVA MAEDA E; CARVALHO L; HOLY J; SARNO EN, et al. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. **FEMS Microbiol.** set. 2004; 238(2):429-437.
- AMORIM FM, NOBRE ML, FERREIRA LC, NASCIMENTO LS, MIRANDA AM, MONTEIRO GR, DUPNIK KM, DUTHIE MS, REED SG, JERONIMO SM. Identifying Leprosy and Those at Risk of Developing Leprosy by Detection of Antibodies against LID-1 and LID-NDO. *PLoS Negl Trop Dis.* Sep 22;10(9). 2016
- ANNUNZIATO F, COSMI L, LIOTTA F, MAGGI E, ROMAGNANI S. Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. **Immunology.** v. 144, p. 343–351, 2014

- ARAOZ R; HONORE N; CHO S; KIM JP; CHO SN; MONOT M; DEMANGEL C; BRENNAN PJ; COLE ST. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infection and Immunity**. out. 2006: 175-182.
- ARAÚJO, S.; LOBATO, J.; REIS, E. M.; SOUZA, D. O.; GONÇALVES, M. A; COSTA, A. V.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. Unveiling healthy carriers and sub-clinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.107, suppl I, p. 55-59, dez. 2012.
- ATTIA, E. A. et al. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *Int J Dermatol*, v. 49, n. 10, p. 1152-8, Oct 2010.
- BAHMANYAR ER, SMITH WC, BRENNAN P, CUMMINGS R, DUTHIE M, RICHARDUS JH, SAUNDERSON P, SHWE T, ROSEN S, GELUK A. Leprosy Diagnostic Test Development As a Prerequisite Towards Elimination: Requirements from the User's Perspective. *PLoS Negl Trop Dis*. 10(2): e0004331. 2016
- BARRETO, J.G. et al. Spatial analysis spotlighting early childhood transmission in a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon region. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2665, feb. 2014.
- BARRETT DJ AND AYOUB EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin. Exp. Immunol*. 63:127-134.1986
- BETTELLI E, CARRIER Y, GAO W, KORN T, STROM TB, OUKKA M, WEINER HL, KUCHROO VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441(7090):235-8, 2006.
- BEUTLER, B. A. TLRs and innate immunity. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1399-407, Feb 12 2009.
- BOER M, JOOSTEN S, OTTENHOFF T. Regulatory T-cells at the interface between human host and pathogens in infectious diseases and vaccination. **Frontiers in immunology**. v. 6, p. 1-15, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento Nacional de Saúde. Manual de leprologia. Brasília: Ministério da Saúde, 1960. 192 p.
- BRASIL MTLRF, OLIVEIRA LR, RÍMOLI NS, CAVALARI FS, GONÇALVES OS, LESSA ZL. Anti PGL-1 serology and the risk of leprosy in a highly endemic area in the State of São Paulo, Brazil: four-year follow-up. *Rev Bras Epidemiol*. 6(3):262-71.2003
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Normas para a eliminação da hanseníase no Brasil**. Brasília, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM N 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. **Diário Oficial da União**. 2010
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases : **plano de ação 2011-2015**. Brasília, 2013.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil - análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v. 44, p.1-12, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Informações demográficas. [2016] Disponível em: <www.datasus.gov.br.
- BRITTON WJ; LOCKWOOD DN. Leprosy. **Lancet**. 2004: 1209-1219.
- BRITO, M. F. M.; XIMENES, R. A.; GALLO, M. E.; BÜHRER-SÉKULA. S. Association between leprosy reactions after treatment and bacterial load evaluated using anti PGL-I serology and bacilloscopy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 41, suppl. II, p. 67-72, 2008.
- BUHRER-SEKULA, S. et al. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Lepr Rev**, v. 78, n. 1, p. 70-9, mar. 2007.
- CABALAR, M. et al. The clinical & Neurophysiological study of leprosy. **Pak J Med Sci**, v. 30, n. 3, p. 501-6, may. 2014.
- CABRAL, PB et al. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal Mycobacterium leprae DNA in individuals with household contact with leprosy. **Int J Infect Dis**. Jul 16, 2013
- CARDOSO LP, DIAS RF, FREITAS AA, HUNGRIA EM, OLIVEIRA RM, COLLOVATI M, REED SG, DUTHIE MS, STEFANI M MA. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **BMC Infect Dis**. v. 13:497. 2013
- CARVALHO AP, FABRI ACOC, CORRÊA OLIVEIRA R, LANA FC. Factors associated with anti-phenolic glycolipid-I seropositivity among the household contacts of leprosy cases. *BMC Infect Dis*. May 30;15:219. 2015
- CHEN, G.; PEDRA, J. H. The inflammasome in host defense. *Sensors (Basel)*, v. 10, n. 1, p. 97-111, 2010.
- COLE, S.T.; SUPPLY, P.; HONORE, N. Repetitive sequences in Mycobacterium leprae and their impact on genome plasticity. **Lepr Rev**, v. 72, n. 4, p. 449-61, dec. 2001.
- CONTIN L, ALVES C, FOGACNOLO L, NASSIF P, BARRETO J, LAURIS J, NOGUEIRA M. Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 91-95. Jan/feb. 2011.
- DAGUR et al. Phenolic-glycolipid-1 and lipoarabinomannan preferentially modulate TCR- and CD28-triggered proximal biochemical events, leading to T-cell unresponsiveness in mycobacterial diseases. **Lipids in Health and Disease** 2012

- DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol*, v. 78, n. 4, p. 318-24, Aug 2000.
- DOUGLAS, J.T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 11, n. 5, p. 897-900, sep. 2004.
- DUPPRE NC et al. Impact of PGL-1 seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(6): e1711, 2012.
- DURÃES, Sandra M. B. et al. Estudo epidemiológico de 107 focos familiares de hanseníase no município de Duque de Caxias – Rio de Janeiro, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [S.l.], v. 85(3), pp. 339-45, 2010.
- DUTHIE, M.S. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol*, v. 14, n. 11, p. 1400-08, nov. 2007.
- DUTHIE, M.S. et al. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. *Clin Vaccine Immunol*, v. 15, n. 11, p. 1659-65, nov. 2008a.
- DUTHIE, M.S. et al. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*, v. 15, n. 10, p. 1590-97, oct. 2008b.
- DUTHIE, M.S. et al. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v. 30, n.10, p. 1257-65, oct. 2011.
- DUTHIE MS, RAYCHAUDHURI R, TUTTERROW YL, MISQUITH A, BOWMAN J, CASEY A, BALAGON MF, MAGHANOY A, BELTRAN-ALZATE JC, ROMERO-ALZATE M, CARDONA-CASTRO N, REED SG. A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 79(2): 233-239, 2014.
- DUTHIE MS, BALAGON MF, MAGHANOY A, ORCULLO FM, CANG M, DIAS RF, COLLOVATI M, REED SG. Rapid quantitative serological test for detection of infection with mycobacterium leprae, the causative agent of leprosy. *J Clin Microbiol*. 52(2): 613–619, 2014.
- DUTHIE MS, ORCULLO FM, ABBELANA J, MAGHANOY A, BALAGON MF. Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:3267–3275. 2016
- EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas Dermosifiliogr*, v. 104, n. 7, p. 554-63, sep. 2013.
- FABRI ACOC, CARVALHO APM, ARAUJO S, GOULART LR, GOULART IMB, MATTOS AMM, TEIXEIRA HC, DUTHIE MS, CORREA-OLIVEIRA R, LANA FCF. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. *BMC Infect Dis*.15:218-218, 2015.
- FERNANDES, C. et al. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. *PLoS One*, v. 8, n. 11, p. e79072, 2013.
- FERREIRA, M. A. A.; ANTUNES, C. M. D. F. Factors associated with ML Flow test seropositivity in leprosy patients and household contacts under the age of 18. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 41, suppl. II, p. 60-66, 2008.
- FINE, Paul E.M. et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in Northern Malawi. *American Journal of Epidemiology*, v. 146, p. 91-102,1997. Disponível em: <<http://aje.oxfordjournals.org/content/146/1/91.full.pdf+html>> Acesso em 09.abr.2012.
- FINKELMAN FD, KATONA IM, MOSMANN TR, COFFMAN RL. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J. Immunol*. 140:1022–1027.1988
- FOSS, N.T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *An Bras Dermatol*, v. 74, n. 2, p. 113-9, 1999.
- FLANAGAN K, MOROZIEWICZ D, KWAK H, HÖRIG H, KAUFMAN HL. The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatoryCD4+ T cells. *Cell Immunol*. 231(1-2): 75-84, 2004.
- FUKUTOMI Y; MAEDA Y; MATSUOKA M; MAKINO M. Temperature dependency for survival of Mycobacterium leprae in macrophages. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*. fev. 2009: 7-16.
- GALLO MEN, SAMPAIO EP, NERY JAC, MORAES MO, ANTUNES SLG, PESSOLANI MCV, SARNO EN. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. **Coura, JR (ed.) Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**, Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Koogan, p.1383-94, 2005.
- GARFIELD J; PIETERS J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. jun 2000:1647- 50.
- GELUK A, OTTENHOFF TH. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. *Human Immunology*. p. 439-445, 2010.