

***Mycobacterium leprae* e *Toxoplasma gondii*: EFEITOS DO CO-PARASITISMO NA
IMUNOMODULAÇÃO DE AMBAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS E
ENDÊMICAS NO NORTE FLUMINENSE**

LETICIA SILVA NASCIMENTO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL DE 2024**

***Mycobacterium leprae* e *Toxoplasma gondii*: EFEITOS DO CO-PARASITISMO
NA IMUNOMODULAÇÃO DE AMBAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS E
ENDÊMICAS NO NORTE FLUMINENSE**

LETICIA SILVA NASCIMENTO

Defesa de Tese de Doutorado
apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para obtenção
do título de Doutor em Biociências
e Biotecnologia

Orientadora: Alba Lucínia Peixoto Rangel

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL DE 2024**

***Mycobacterium leprae* e *Toxoplasma gondii*: EFEITOS DO CO-PARASITISMO
NA IMUNOMODULAÇÃO DE AMBAS DOENÇAS NEGLIGENCIADAS E
ENDÊMICAS NO NORTE FLUMINENSE**

LETICIA SILVA NASCIMENTO

Defesa de Tese de Doutorado
apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para obtenção
do título de Doutor em Biociências
e Biotecnologia

Aprovada em 05 de Abril de 2024

Banca Examinadora:

Andrea Arnholdt (Doutora em Biociências e Biotecnologia) -LBR/UENF

Sergio Seabra (Doutor em Ciências Biológicas) -LBCT/UENF

Thaís Louvain de Souza (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – FMC

Milton Masahiko Kanashiro (Doutor em Ciências Biológicas) – LBR/UENF

Alba Lucínia Peixoto Rangel (Doutora em Biociências e Biotecnologia) - LBR/UENF

Em Capitães de Areia, Jorge Amado escreveu que, certos homens têm estrelas no lugar do coração, e quando morrem o coração fica no céu. Posso dizer que, com certeza, meu pai tinha uma estrela no coração. Toda minha trajetória agora é guiada e cuidada por Ele. Por isso, dedico esta tese a mantê-lo vivo em cada linha que eu escrevo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que iluminou todo o meu caminho nessa caminhada, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem. Autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, e a CAPES pela bolsa concedida.

À Prof^a Alba, pela amizade e paciência no desenvolvimento deste trabalho e por todos esses anos de parceria e orientação. Obrigada por tudo!

As minhas heroínas Roselane Miranda, Maria José Rodrigues e Maria Helena, que me deram apoio, incentivo e colo nas horas difíceis de desespero, cansaço e desânimo, me incentivando a nunca desistir, obrigada por serem as melhores mães e avós do mundo.

Ao meu pai e avô, que apesar de todas as dificuldades, me fortaleceu e que para mim foi muito importante. Aos meus tios que sempre torceram muito por mim e me deram muito apoio durante toda essa jornada.

A todos os amigos do Laboratório LBR, Juju, Luisa, Juliana e Rebeka, que sempre estiveram lá, me apoiando e incentivando.

Meus amigos Ronaldo, Brunielli, por caminharem junto comigo durante essa jornada. Em especial Bellinha e Yuri que não foram apenas amigos, mas irmãos, que me mostraram que para ser irmão não precisa de laços sanguíneos. Amo vocês!

Amigos do JBM, Nádia, Ruliana, Taynara, Fellipe, Jonathan, por me mostrarem que grandes amizades ultrapassam todas as distâncias.

A toda a equipe do Centro de Referência da Hanseníase (Jô e Dr Edilbert Pellegrini), que estiveram lá por todos esses anos, nos auxiliando em todos os momentos. E a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1.1- Histórico da Hanseníase	19
2.1.2 – Epidemiologia.....	20
2.1.3- Classificação	21
2.1.4- Diagnóstico	22
2.1.5- Transmissão	23
2.1.6- Tratamento	23
2.1.7- Resposta imune do hospedeiro ao <i>Mycobacterium leprae</i>	24
2.2.1 Histórico da Toxoplasmose	25
2.2.2 - Ciclo Biológico do <i>Toxoplasma gondii</i>	26
2.2.3- Epidemiologia	28
2.2.4- Transmissão	29
2.2.5- Diagnóstico	29
2.2.6- Tratamento	30
2.2.7– Resposta imune a <i>Toxoplasma gondii</i>	30
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVO GERAL.....	33
4.1Objetivos específicos	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Sujeitos da pesquisa.....	34
5.2 Obtenção das Células a partir do Sangue Periférico	34
5.3 Detecções de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> em amostrasde soro de indivíduos participantes dos estudo meio de ELISA.....	35
5.4 Questionários para inquérito epidemiológico e sociodemografico	35
5.5 Fenotipagem de Células Mononucleares do Sangue Periférico e Análise por Citometria de Fluxo.....	36
5.6 Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico	36
5.7 Obtenção de Sobrenadante de Culturas Celulares para Caracterização do Perfil de Citocinas Secretadas	37
5.8 Análise de Citocinas em Sobrenadantes de Culturas de PBMC	37
5.9 Análises Estatísticas	38
6. RESULTADOS	40

6.1 Casuística do Estudo.....	40
6.2- Soroprevalência da infecção por <i>T. gondii</i> em portadores de hanseníase e controles ..	40
6.3- Questionários para inquérito epidemiológico e sociodemográfico	41
6.4- Quantificação do percentual das diferentes subpopulações de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em pacientes.	43
6.6. Análise de Citocinas em Sobrenadantes de Culturas de PBMC	45
6.6.1- Dosagem de IL-12	46
6.6.2- Dosagem de TNF- α	47
6.6.3- Dosagem de IL-1- β	48
6.5.4- Dosagem de IL-6	50
6.5.5- Dosagem de IL-8	52
6.5.6- Dosagem de IL-10	53
7. DISCUSSÃO	55
8- CONCLUSÃO.....	66
9- REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO I.....	78

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo completo do protozoário <i>Toxoplasma gondii</i>	28
Figura 2. Titulação padrão que é usada para determinar a concentração de cada analito na amostra de teste, usando software de análise CBA.....	38
Figura 3. Percentual de linfócitos <i>ex vivo</i> nos indivíduos controle sem hanseníase e positivos para <i>T. gondii</i> (CH-/Tg+), controle sem hanseníase e negativos para <i>T. gondii</i> (CH-/Tg+), portadores de hanseníase positivos para <i>T. gondii</i> (H+/Tg+) e portadores de hanseníase negativos para <i>T. gondii</i> (H+/Tg-).....	44
Figura 4. Percentual da população de células TCD4+ <i>ex vivo</i> nas diferentes formas clínicas da hanseníase. Indivíduos controle sem hanseníase e positivos para <i>T. gondii</i> (CH-/Tg+), controle sem hanseníase e negativos para <i>T. gondii</i> (CH-/Tg+), portadores de hanseníase positivos para <i>T. gondii</i> (H+/Tg+) e portadores de hanseníase negativos para <i>T. gondii</i> (H+/Tg).....	45
Figura 5: Dosagem de IL-12 em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos infectados pelo <i>M.leprae</i> ou <i>T.gondii</i> , controles saudáveis e coinfectados estimuladas <i>in vitro</i> com antígenos de <i>T.gondii</i> e <i>M.leprae</i> ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle).....	47
Figura 6: Dosagem de TNF- α em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos infectados pelo <i>M.leprae</i> ou <i>T.gondii</i> , controles saudáveis e coinfectados estimuladas <i>in vitro</i> com antígenos de <i>T. gondii</i> e <i>M. leprae</i> ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle).....	48
Figura 7: Dosagem de IL-1 β em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos infectados pelo <i>M.leprae</i> ou <i>T.gondii</i> , controles saudáveis e coinfectados estimuladas <i>in vitro</i> com antígenos de <i>T. gondii</i> e <i>M. leprae</i> ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle).....	49
Figura 8: Dosagem de IL-6 em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos de indivíduos infectados pelo <i>M.leprae</i> ou <i>T.gondii</i> , controles saudáveis e coinfectados estimuladas <i>in vitro</i> com antígenos de <i>T. gondii</i> e <i>M. leprae</i> ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle).....	51
Figura 9: Dosagem de IL-8 em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos infectados pelo <i>M.leprae</i> ou <i>T.gondii</i> , controles saudáveis e coinfectados estimuladas <i>in vitro</i> com antígenos de <i>T. gondii</i> e <i>M. leprae</i> ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle).....	53

Figura 10: Dosagem de IL-10 em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de de indivíduos infectados pelo *M.leprae* ou *T.gondii*, controles saudáveis e coinfectados estimuladas *in vitro* com antígenos de *T. gondii* e *M. leprae* ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle).....54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	36
Tabela 2. Características gerais dos indivíduos participantes da pesquisa.....	40
Tabela 3. Prevalência de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em indivíduos portadores de hanseníase.....	40
Tabela 4- Relação entre a infecção por <i>T.gondii</i> e grau de escolaridade dos participantes do estudo.....	41
Tabela 5 : Comparação entre renda familiar e raça dos participantes do estudo.....	42
Tabela 6: Comparação entre a ingestão de água não filtrada e a Infecção pelo <i>T.gondii</i>	42
Tabela 7- Comparação entre o abastecimento de água e a Infecção pelo <i>T.gondii</i>	43
Tabela 8: Condições dos sistemas de esgotamento sanitário dos participantes do estudo.....	43
Tabela 9: Relação da quantidade de amostra para a análise de citocinas.....	46

Lista de Abreviaturas

A.C.- Antes de Cristo

OMS - Organização Mundial da Saúde

APC - células apresentadoras de antígenos

B - forma borderline

BB - borderline-borderline

BL - borderline-lepromatoso

BT - borderline-tuberculóide

HIV - vírus da imunodeficiência humana

I – indeterminada

MB - Multibacilar

PB -Paucibacilar

L- lepromatoso

LL- lepromatoso-lepromatoso

mL - mililitros

NK - natural killer

OR - odds ratio

PAMP - padrões moleculares associados a agentes patogênicos

PQT - poliquimioterapia

PRR - receptores de reconhecimento de padrões

T - tuberculóide

TLR - Toll-like receptors

TLR-1 - toll-like receptor 1

TLR-2 - toll-like receptor 2

TLR -4 - toll-like receptor 4

TLR -9 - toll like receptor 9

TLR-11 - toll-like receptor 11

TT- hanseníase tuberculóide/ tuberculóide-tuberculóide

uL- microlitros

V - virchoviano

VV- hanseníase virchowiana.

PGL-1 - Glicolípídeo fenólico-1

PDIMs - ftiocerol dimicocerosato
LAM - lipoarabinomananas
IL - interleucina
IL -1 - interleucina 1
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
IL-12 - interleucina 12
IFN- γ - interferon gamma
DCs - células dendríticas
Th - linfócitos T help
D - dimorfa
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay
STAg - Antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*
IL-4 - interleucina - 4
IL-10 - interleucina -10
IgG - imunoglobulinas G
IgM - imunoglobulinas M
IgA - imunoglobulinas A
IgE - imunoglobulinas E
BSA - albumina de soro bovino
HC - Indivíduos controles
CT - Indivíduos contatos de pacientes de hanseníase
DL-Dimorfo
IDL-indeterminada
PBMC - Células Mononucleares do Sangue Periférico
TCD4+ - Linfócito TCD4+
TCD8+ - Linfócito TCD8+
Th1 - Células T Helper do Tipo 1
Th2 - Células T Helper do Tipo 2
°C - graus Celsius

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* que acomete pele e nervos periféricos. A toxoplasmose, cujo agente etiológico é o protozoário *Toxoplasma gondii*, é também uma doença também infecciosa que pode se apresentar sob as formas congênitas e adquirida. Campos dos Goytacazes é considerado um município endêmico para ambas as doenças. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou, através de um estudo de co-infecção, que a infecção por *T. gondii* apresenta-se como fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase, em especial, em sua forma clínica mais severa. Entretanto, não é sabido se e quais mecanismos imunológicos influenciam para tal gravidade da hanseníase nos pacientes coinfetados por *T.gondii*. Neste sentido, este estudo teve como objetivo investigar parâmetros da resposta imune celular e produção de citocinas em indivíduos que vivem em áreas endêmicas para *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium leprae* e a possível correlação destes parâmetros na diversidade clínica da hanseníase. Amostras de sangue periférico de 97 indivíduos foram coletadas por venopunção, sendo 75 de portadores da hanseníase e 22 controles saudáveis, grupados da seguinte forma: 1) pacientes portadores de hanseníase co- infectados com *T. gondii*, 2) sem co-infecção por *T. gondii* e 3) controles saudáveis sem hanseníase infectados por *T. gondii* e 4) controles sem hanseníase e sem infecção por *T. gondii*. As PBMCs foram marcadas para imunofenotipagem de células TCD4, TCD8 e Linfócitos B *ex vivo* e cultivadas sob estímulos antigênicos específicos de *M. leprae*, *T. gondii* e na ausência de estímulo. Os sobrenadantes das culturas foram coletados no 6º dia após o início da cultura e o perfil de secreção das citocinas foi analisado por uso de kit CBA (*Cytometric Bead Array*). Paralelamente, foram aplicados questionários epidemiológicos a 25 participantes do estudo. Mais de 50% dos indivíduos participantes do estudo não possuíam sistema de esgotamento sanitário nas suas residências e possuem baixa escolaridade. A análise da imunomarcagem *ex vivo* das células mostrou uma marcada redução do percentual de linfócitos totais nos pacientes coinfetados para ambos os patógenos (*M.leprae/T.gondii*) comparado aos controles. Quando as subpopulações foram avaliadas separadamente, constatou-se que esta redução foi referente aos percentuais de linfócitos TCD4⁺. Em relação ao perfil de secreção de citocinas, observou-se que as citocinas, IL-12 e TNF- α IL-1 β , IL-6 e IL-10 apresentaram aumentados níveis nos sobrenadantes de cultura dos indivíduos coinfetados por ambos os patógenos após reestimulação comparados com os controles não infectados estimulados. Enquanto a citocina IL-8 apresentou níveis

diminuídos nos coinfectados quando comparados aos controles após reestimulação. Esses dados indicam que de fato o coparasitismo de *T.gondii* em pacientes com hanseníase exerce influência no sistema imunológico desses pacientes elevando o padrão inflamatório, principalmente, naqueles pacientes portadores das formas mais severas da hanseníase (Dimorfa e Virchowiana).

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*, *Toxoplasma gondii*, Co-infecção.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that affects the skin and peripheral nerves. Toxoplasmosis, whose etiological agent is the protozoan *Toxoplasma gondii*, is also an infectious disease that can present itself in congenital and acquired forms. Campos dos Goytacazes is considered an endemic municipality for both diseases. Recently, our research group showed, through a co-infection study, that *T. gondii* infection is a risk factor for the development of leprosy, especially in its more severe clinical form. However, it is not known whether and which immunological mechanisms influence such severity of leprosy in patients co-infected with *T.gondii*. In this sense, this study aimed to investigate parameters of the cellular immune response and cytokine production in individuals living in areas endemic for *Toxoplasma gondii* and *Mycobacterium leprae* and the possible correlation of these parameters in the clinical diversity of leprosy. Peripheral blood samples from 97 individuals were collected by venipuncture, 75 from leprosy patients and 22 healthy controls, grouped as follows: 1) leprosy patients co-infected with *T. gondii*, 2) without co-infection with *T. gondii* and 3) healthy controls without leprosy infected by *T. gondii* and 4) controls without leprosy and without *T. gondii* infection. PBMCs were marked for immunophenotyping of TCD4, TCD8 and B lymphocytes ex vivo and cultured under specific antigenic stimuli of *M. leprae*, *T. gondii* and in the absence of stimulation. Culture supernatants were collected on the 6th day after the start of culture and the cytokine secretion profile was analyzed using a CBA kit (*Cytometric Bead Array*). At the same time, epidemiological questionnaires were administered to 25 study participants. More than 50% of the individuals participating in the study did not have a sewage system in their homes and had low education. *Ex vivo* immunostaining analysis of cells showed a marked reduction in the percentage of total lymphocytes in patients co-infected with both pathogens (*M.leprae/T.gondii*) compared to controls. When the subpopulations were evaluated separately, it was found that this reduction was related to the percentages of TCD4+ lymphocytes. Regarding the cytokine secretion profile, it was observed that the cytokines, IL-12 and TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10, presented increased levels in the culture supernatants of individuals coinfecting by both pathogens after restimulation. compared with stimulated uninfected controls. While the cytokine IL-8 showed decreased levels in co-infected patients when compared to controls after restimulation. These data indicate that in fact *T.gondii* coparasitism in patients with leprosy exerts an influence on the immune system of these

patients, increasing the inflammatory pattern, especially in those patients with the most severe forms of leprosy (Dimorph and Lepromatous).

Keywords: *Mycobacterium leprae*, *Toxoplasma gondii*, Co-infection.

1. INTRODUÇÃO

Com a chegada de novas metodologias científicas para identificar e diagnosticar patógenos conhecidos e emergentes é evidente que as coinfeções sejam um fenômeno comum. Estima-se que a coinfeção com mais de um patógeno, como HIV, *Mycobacterium tuberculosis*, vírus da hepatite, helmintos e *Plasmodium*, afete cerca de um terço da população humana nos países em desenvolvimento (Teo et al., 2018). Os dados epidemiológicos sugerem uma maior incidência de efeitos negativos nas respostas imunes específicas do hospedeiro contra patógenos durante a coinfeção (Stelekati et al., 2014). No entanto, os mecanismos subjacentes permanecem pouco compreendidos (Teo et al., 2018)

Muitos patógenos são adquiridos através de rotas semelhantes de exposição (por exemplo, por via oral após ingestão de água, comida ou pasto contaminados), é comum humanos infectados por múltiplos patógenos, especialmente em regiões com falta de saneamento e / ou acesso limitado à água potável (Mabbott et al., 2018).

Quando nos referimos a coinfeções as características da resposta imune por outros tipos de parasitas podem diferir substancialmente no hospedeiro. Muitos estudos indicam que alterações nas respostas imunes devido à coinfeção com outros patógenos podem influenciar drasticamente a suscetibilidade à doença. Muitos dos exemplos encontrados na literatura indicam ligações entre distúrbios induzidos pelo parasita ao equilíbrio *Th1 / Th2* e/ou fenótipo de macrófagos (ativados alternativamente vs. ativados classicamente) e susceptibilidade ou patogênese alteradas após coinfeção subsequente com outros patógenos (Gerbe et al., 2016; Mabbott, 2018; Perez-Mazliah e Langhorne, 2015).

Sendo assim, como o Brasil possui altos índices de infecções parasitárias e helmínticas, é de grande importância um melhor entendimento sobre as coinfeções e o padrão de resposta imune envolvido nas mesmas, principalmente por grande parte da população viver em regiões com falta de saneamento básico e acesso limitado à água potável fazendo com que sejam mais susceptíveis a diversas infecções (Mabbott, 2018).

A hanseníase, amplamente conhecida como lepra até meados do século XX, é uma doença crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* (Edit, 2004). A hanseníase pode afetar a pele, sistema nervoso periférico e, ocasionalmente, outros órgãos e sistemas. Ao serem contaminados muitos dos indivíduos apresentam resistência ao *M. leprae*, uma

condição que pode ser alterada em função da relação entre meio ambiente, agente e hospedeiro (Souza, 1997).

Estudos relacionando a hanseníase a outras infecções parasitárias já foram realizados, um desses estudos foi um relato de caso de um paciente co-infectado com hanseníase da forma vichorwiana e leishmaniose mucocutânea, duas formas polares opostas dessas doenças, foi observado em cultura de PBMC, que durante a hanseníase ativa, os antígenos de *M. leprae* induziam a supressão das respostas de IFN- γ ao antígeno *L. braziliensis*, e essa supressão foi eliminada por anticorpos anti-IL-10 neutralizantes. Esse efeito supressor foi perdido após a cura da hanseníase e o desaparecimento desse efeito foi acompanhado pelo agravamento das lesões da leishmaniose mucosa. Esses resultados indicam que a hanseníase induziu uma resposta regulatória mediada por IL-10 que poderia ter controlado a imunopatologia da leishmaniose mucosa, demonstrando que, no contexto desta coinfeção, a resposta imune a um patógeno pode influenciar a resposta imune do outro patógeno e ao curso clínico da infecção causada por ele (Azevedo- Coltinho et al., 2012).

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um parasita intracelular obrigatório e pode infectar praticamente todo animal de sangue quente. Avalia-se que a infecção por *T. gondii* ocorra em pelo menos um terço da população mundial com maiores taxas de prevalência em locais quentes e úmidos (Montoya e Liesenfeld, 2004)

Alguns estudos mostram como a co-infecção pode modular a resposta imune do hospedeiro. Em condições sanitárias precárias em área endêmica para *T. gondii* e *A. lumbricoides*, duas infecções que induzem no hospedeiro resposta imune contrárias, Th1 e Th2, respectivamente, foi demonstrado *in vitro* por Bahia- Oliveira e colaboradores (2009) que a resposta imune contra *T. gondii* e *A. lumbricoides* em indivíduos co-infectados foi marcada pelos baixos níveis secretados de IL-10, IL-4, IL-5 e TGF- β e baixos níveis de IgE contra *A. lumbricoides*, comparados aos grupos não infectados por *A. lumbricoides*, favorecendo a adaptação do helminto no hospedeiro, uma vez que a resposta imune protetora específica é regulada negativamente.

Poucos estudos foram realizados associando hanseníase a toxoplasmose em humanos, o único encontrado na literatura, tendo sido realizado pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou que a infecção por *T. gondii* se constitui como um fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase (OR=2,055, p=0,0131), em especial de sua forma clínica mais severa, a Virchowiana (OR=4,133/ p=0,0008) (Oliveira et al., 2020). Entretanto, os mecanismos

imunológicos envolvidos durante essa coinfeção são pouco compreendidos. Dessa maneira esse estudo tem como objetivo compreender os efeitos da modulação da resposta imune de ambas as doenças infecciosas nos hospedeiros humanos que vivem numa região endêmica tanto para *T. gondii* quanto para *M. Leprae*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1- Histórico da Hanseníase

A hanseníase, conhecida amplamente como lepra desde os tempos bíblicos, é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* ou bacilo de Hansen (BRASIL, 2007). Um bacilo gram-positivo, álcool-ácido-resistente e parasita intracelular obrigatório, que exibe tropismo pronunciado para células fagocíticas como células de Schwann nos nervos e macrófagos na pele (Medeiros et al.,2016).

Vários estudos foram realizados com o intuito de descobrir a origem da hanseníase, entretanto não existe um consenso em relação à origem da doença, pois não existem muitos documentos e referências sobre o assunto, o que proporciona uma interpretação indeterminada (Santos et al., 2011). Entretanto, alguns autores acreditam que o berço da doença tenha sido a Ásia, pois existem alguns documentos médicos que descrevem a doença. Outros acreditam que a doença tenha surgido na África. Ainda hoje, ocorrem discussões a respeito de sua origem (Edit, 2004).

A hanseníase já era conhecida no Egito como lepra há quatro mil e trezentos anos antes de Cristo, de acordo com um papiro da época de Ramsés II. É considerada uma doença bíblica, ligada à impureza espiritual ou a um castigo divino (Brasil, 1960). Devido a sua associação a um castigo divino, no período medieval, os doentes eram obrigados a usar um véu cobrindo o rosto e um sino que anunciava a sua presença, também eram feitas marcas em seus corpos para identificação (Cruz, 2008). O termo “lepra” com o qual era conhecida, era utilizado de maneira pejorativa e absorveu todo o estigma associado ao vocabulário.

Acredita-se que durante a Idade Média, a hanseníase teve as taxas elevadas na Europa e Oriente Médio. Os relatos médicos comprovam que a doença, até então conhecida como lepra, era uma doença altamente contagiosa e hereditária (Pinto, 1995). Porém algumas décadas depois com as melhorias nas condições sociais, a alta incidência teve uma queda, desaparecendo dos países europeus (Edit, 2004).

Foi em 1873, que o médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, refutando a ideia de hereditariedade, isolou o bacilo da então doença conhecida como lepra humana, *Mycobacterium leprae* que passou a ser conhecido como bacilo de Hansen (Brasil, 1960). Mesmo após o surgimento da bacteriologia e a confirmação que a lepra era uma doença transmissível, permaneceu a incerteza sobre o seu meio de propagação. Estudiosos apoiavam desde a hereditariedade até a transmissão por vetores intermediários, como mosquitos (Benchimol; Sá, 2003).

Hoje sabe-se que a hanseníase é uma doença infecto-contagiosa humana de evolução crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* que se manifesta, principalmente, por lesões cutâneas as quais levam a diminuição de sensibilidade térmica e tátil. Essas manifestações são resultantes da ação da micobactéria, que compromete as células cutâneas e nervosas periféricas (Brasil, 1995). No Brasil, os primeiros casos da infecção foram notificados no ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro (Edit,2004).

2.1.2 – Epidemiologia

A hanseníase é uma doença infecciosa, crônica e transmissível, que ainda persiste como problema de saúde pública no Brasil. Possui notificação compulsória e investigação obrigatória no Brasil inteiro. Isso se deve ao fato de apresentar um grande potencial incapacitante e por acometer grande parte da população economicamente ativa (Ministério da Saúde, 2005). Alguns aspectos influenciam na alta taxa de prevalência da doença, o que impossibilita sua completa erradicação. As condições culturais e socioeconômicas são os fatores que mais influenciam devido as condições precárias de habitação, baixo grau de escolaridade e ainda, movimento migratórios que facilitam a difusão da doença (Amaral, 2008).

O Brasil segue hoje a Estratégia Global de Hanseníase 2021-2030 da Organização Mundial da Saúde (OMS), que traz algumas mudanças consideráveis na abordagem do enfrentamento da hanseníase mundialmente. As estratégias anteriores estavam focadas na eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, e conseguiu alcançar avanços significativos na redução da carga global da hanseníase nas últimas três décadas. Entretanto, a nova estratégia foca seus esforços para a interrupção da transmissão e o alcance de zero casos, trazendo uma visão mais abrangente: zero hanseníase, zero infecção e doença, zero incapacidade, zero estigma e discriminação (OMS, 2021).

A pandemia de covid-19 gerou algumas dificuldades para novos diagnósticos levando a uma redução na detecção de novos casos de quase um terço entre 2019 e 2021 e para o tratamento de pacientes com hanseníase, colaborando para a subnotificação e o pior prognóstico dos casos (Mendonça et al., 2022; Dos Reis et al., 2022). Entretanto, de acordo com a OMS (2023) durante o ano de 2022, 174.087 novos casos foram notificados globalmente, a taxa de detecção de novos casos representou um aumento de 23,8% em relação ao ano de 2021. Brasil, Índia e Indonésia relataram mais de 10 000 novos casos cada, representando em conjunto 78,1% dos novos casos globais. Estes 3 países também mostraram aumentos na detecção de novos casos em 2022 em comparação com o ano anterior (OMS, 2023). A Índia foi o país que mais

reportou casos novos em 2022, cerca de 103 819 novos casos. Na região das Américas, houve 21.398 (20,6%) casos notificados; desses, 19 635 ocorreram no Brasil. Nesse contexto, o Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo (OMS, 2023).

A prevalência da doença é observada de forma desigual entre as diferentes regiões do país e acompanhada pela desigualdade socioeconômica regional. Nos últimos cinco anos (2017 a 2021), foram diagnosticados no Brasil 119.698 casos novos de hanseníase. Desse total, 66.613 casos novos ocorreram no sexo masculino, o que corresponde a 55,7% do total. Essa predominância foi observada na maioria das faixas etárias e anos da avaliação, com maior frequência nos indivíduos entre 50 a 59 anos, totalizando 23.192 casos novos. Em 2021, Mato Grosso foi a União Federativa (UF) que apresentou a maior taxa de detecção geral, 58,76 casos novos por 100 mil habitantes; sua capital, Cuiabá, registrou a taxa de 22,45 casos por 100 mil habitantes. O Tocantins ocupou a segunda posição entre as UF, com 47,97 casos novos por 100 mil habitantes, e sua capital, Palmas, registrou uma taxa de 79,78 casos por 100 mil habitantes, a maior entre as capitais do país (Ministério da saúde, 2023).

No Estado do Rio de Janeiro, os números de casos novos sofreram queda ao longo dos últimos anos. Em 2022, foram registrados 758 casos de Hanseníase, enquanto em 2011, foram 917. Há mais de uma década, o número era mais do que o dobro: em 2005, foram 2711 casos (MASCARENHAS, 2015 e DATASUS 2023). Em Campos dos Goytacazes, o número total de pacientes diagnosticados com hanseníase e notificados no ano de 2022 foi de 16 indivíduos (DATASUS, 2023).

2.1.3- Classificação

A hanseníase tem sua classificação baseada na resposta imune estabelecida pelo hospedeiro. Vários são os sistemas de classificação utilizado atualmente para a manifestação cutânea da doença. Segundo Ridley e Jopling (1966), a doença pode ser classificada de forma espectral de acordo com o estado funcional do sistema imunológico, obedecendo os critérios clínicos, bacteriológicos e histopatológicos, dessa maneira as formas clínicas variam de acordo com o espectro clínico da doença, sendo dividido nas seguintes formas clínicas: tuberculoide-tuberculoide (T) lepromatoso-lepromatoso (L) representando os dois polos da doença, mais resistente imunologicamente e mais susceptível respectivamente. Ela apresenta três subgrupos: borderline-tuberculoide (BT), borderline-borderline (BB), borderline- lepromatoso (BL). Ainda há a forma clínica indeterminada (I) que é considerada a fase inicial da doença (Araújo, 2005).

Uma outra classificação muito utilizada é a de Madri (1953) que adota um sistema de polaridade, baseados nas características clínicas da doença associadas aos critérios bacteriológicos. Dessa maneira, os grupos polares são definidos como: tuberculoide (T) e virchowiana (V); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma borderline (B) ou dimorfa (D) (Souza, 1997).

Soma-se a essas duas classificações a proposta pela OMS, que foi desenvolvida com o objetivo de auxiliar o diagnóstico em locais em que não existe suporte laboratorial, nem centros de referências especializados. Dessa maneira, essa classificação é operacional e divide os pacientes em dois grupos baseando-se no número de lesões cutâneas, visando o tratamento. Os indivíduos são divididos em Paucibacilar (PB) que apresenta até cinco lesões cutâneas e/ou apenas um tronco nervoso afetado, que inclui as formas, I, TT, BT da classificação de Ridley-Jopling já mencionada; Multibacilar (MB) mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso afetado e com baciloscopia positiva, inclui as formas BB, BV e VV (WHO, 1998; Jacobson & Krahenbuhl, 1999).

2.1.4- Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é realizado principalmente com base na avaliação clínica, com associação ao exame dermatoneurológico realizado pelo médico, que busca identificar ao menos um dos três seguintes achados: lesão cutânea com alteração sensitiva, espessamento neural e apresentação do bacilo em baciloscopia ou biópsia (Wilder-Smith, 2008).

Os exames clínicos realizados durante o diagnóstico auxiliam na confirmação do diagnóstico. Um dos exames mais utilizados é o teste de sensibilidade térmica, que consiste em tocar sob a pele do paciente tubos, sem que o indivíduo veja, esse teste é realizado com ele de olhos vendados. Após instruções de como o teste será realizado, tubos contendo água fria ou quente devem ser tocados no local da lesão para avaliação da sensibilidade do indivíduo; ou, por exemplo, um algodão embebido de éter ou álcool e outro seco, tendo o mesmo objetivo final (LYON & GROSSI IN: ALVES et al., 2014).

Exames laboratoriais podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico diferencial para outras doenças dermatoneurológicas. Um exame muito utilizado e útil é a baciloscopia, que tem como objetivo a visualização do bacilo a partir da coloração do esfregaço intradérmico pelo método de Ziehl-Neelsen. O índice baciloscópico (IB) é determinado a partir da soma dos índices encontrados em cada local da coleta dividido pelo número de locais da coleta (TALHARI et al., 2015). Um outro exame utilizado constantemente é a histopatologia das

lesões biopsiadas, que se baseia numa observação dos nervos cutâneos afetados e identificação de bacilos álcool-ácidos-resistentes (BAAR) pela coloração de Wade ou Fite-Faraco (LASTÓRIA& MORGADO DE ABREU,2014).

2.1.5- Transmissão

A principal via de transmissão da doença é pela entrada do bacilo pela mucosa nasal, pela descarga de pacientes MB não tratados que possuem uma alta carga de bacilos no trato respiratório e na pele para seus contatos domiciliares, independente do gênero, que são os mais suscetíveis ao contágio. Esses pacientes são considerados epidemiologicamente muito importantes na transmissão da infecção, eles permanecem como fonte de transmissão da doença até que seja instituído o tratamento adequado (Sales et al., 2001).

M. leprae apresenta uma cinética de crescimento lento e por isso o período de incubação da doença costuma ser longo, podendo demorar de meses a décadas para manifestação clínica da doença (Ministério da Saúde, 2010).

2.1.6- Tratamento

Apesar de afetar a humanidade há mais de dois milênios, a hanseníase só teve os primeiros medicamentos eficazes contra a doença em meados do século XX, em 1940, e se manteve sem tratamento até então (Ministerio da Saúde, 2022). O tratamento é de grande importância para a cura da hanseníase, sendo o meio mais estratégico para o controle e eliminação da doença quanto ao problema de saúde pública (Brasil, 2002). O primeiro medicamento desenvolvido foi a dapsona, um fármaco capaz de tratar a doença, entretanto favoreceu o crescente surgimento da resistência medicamentosa em diversos países do mundo, obrigando à busca por novas opções (Misch et al., 2010).

A OMS, em 1982, implementou o tratamento de multidrogaterapia (MDT) ou poliquimioterapia (PQT) que corresponde na utilização de três fármacos: dapsona, rifampicina e clofazimina (Amorim, 2017). Este esquema terapêutico teve como objetivo de evitar o surgimento de cepas quimioresistentes e a eliminação da população micobacteriana viável em um curto período de tempo. Logo no início do tratamento, a transmissão da doença é interrompida pela ação do medicamento. A administração conjunta evita a resistência medicamentosa do bacilo que ocorre com frequência quando se utiliza apenas um medicamento durante o tratamento (Ministério da Saúde, 2010). Com a inclusão da PQT, a prevalência mundial da hanseníase declinou progressivamente de 3 milhões de casos em 1991 para cerca

de 600 mil casos no ano 2000, chegando-se a menos de 200 mil casos em tratamento ao final de 2019 (Ministerio DA Saúde, 2022).

A pouco tempo atrás, a PQT era aplicada em dois esquemas terapêuticos distintos, sendo um composto por rifampicina, clofazimina e dapsona para casos MB, e outro, composto apenas por rifampicina e dapsona, destinado aos PB, tornando assim o diagnóstico clínico fundamental para a informação sobre a classificação do paciente e seleção do tratamento adequado ao seu caso. Entretanto, desde 2018 a OMS passou a recomendar o uso dos três medicamentos para o tratamento de todos os casos de hanseníase, independentemente da classificação operacional, mantendo o tempo de seis doses mensais para casos PB e de 12 doses mensais para os casos MB. No Brasil, esse esquema terapêutico foi oficialmente utilizado em 2021, quando passou a ser chamado de PQT-U. As medicações são disponibilizadas exclusivamente para o tratamento da hanseníase e distribuídas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Ministerio da Saúde, 2022).

2.1.7- Resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*

As manifestações clínicas e histopatológicas da hanseníase são de amplo espectro isso se deve a diversidade da resposta imune desenvolvida frente ao *M. leprae* (Nath et al., 2015). As duas respostas imunes, inata e adquirida, estão envolvidas na defesa contra o patógeno. A polarização dessas duas respostas imune específicas ao *M. leprae* é considerada de grande importância na determinação da forma clínica (Nath et al., 2015). A interação inicial entre o patógeno e o homem é mediada por receptores das células do hospedeiro que reconhecem padrões moleculares das micobactérias, os receptores Toll-like (TLRs). Eles são essenciais para o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas durante a resposta imune inata. Dos TLRs que já foram identificados, os heterodímeros, TLR2-TLR1, e os homodímeros, TLR2 e TLR4, são importantes para o reconhecimento de micobactérias. Especialmente o TLR-2 que é ativado por lipoproteínas e glicolipídeos de *M. leprae* (Mendonça et al., 2008). A habilidade de começar uma resposta imunológica protetora é definida pela apresentação de mecanismos que se baseiam no reconhecimento específico de antígenos, mediado por receptores presentes nas superfícies dos linfócitos T e B. Essa resposta imune pode ser categorizada em celular (ou do tipo 1), e humoral (ou do tipo 2). A capacidade dos linfócitos auxiliares (TCD4⁺), também conhecidos como linfócitos T *helper* (*Th*), em induzir as respostas celular ou humoral está diretamente relacionada com a secreção de IL-12/23, promovendo a diferenciação de macrófagos e células dendríticas. Após a ativação inicial pelos peptídeos imunogênicos apresentados em associação ao complexo principal de histocompatibilidade

(MHC) por células apresentadoras de antígenos (APC), os linfócitos *Th* podem se diferenciar em duas grandes populações de células fenotipicamente distintas, *Th1* e *Th2*. As células *Th1* produzem caracteristicamente interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ), que induzem a ativação dos macrófagos e são muito efetivas no controle da infecção contra patógenos intracelulares. Os macrófagos ativados produzem IL-12, o qual consiste num fator dominante para a polarização de células *Th1*. Em contraste, as células *Th2* secretam IL-4, IL-5 e IL-13 como citocinas chave (Mendonça et al., 2008; Biedermann et al., 2004, Fonseca et al., 2017). Portanto, apenas as células *Th1* medeiam respostas imunes que podem controlar a hanseníase (BIEDERMANN et al., 2004). Apenas o equilíbrio das respostas *Th1/Th2* no entanto, não pode explicar completamente a resposta imune durante a hanseníase. Outros subconjuntos de células T, como células T reguladoras e *Th17*, foram identificados como tendo papéis importantes na determinação da imunidade do hospedeiro (Fonseca et al., 2017). Células *Th17* aumenta a resposta de células *Th1* e têm sido associadas a um efeito protetor a patógenos intracelulares (SANTOS et al., 2017; TARIQUE et al., 2017). O domínio da resposta imune celular e humoral, frente à infecção pelo bacilo pode influenciar a evolução da doença e estar associado indiretamente com as características clínicas observadas nos pacientes das formas tuberculoide e virchowiana (Mendonça et al., 2008). Na forma tuberculoide, os pacientes apresentam forte resposta imune celular contra *M. leprae*, com poucas lesões e as mesmas bem delimitadas. Citocinas como IFN- γ , IL-2 e linfotóxina são secretadas nas lesões, resultando em atividade fagocítica. IFN- γ tem capacidade de estimular macrófagos a matar ou restringir a proliferação de micobactérias (Nathan, 1986). A IL-2 atua na defesa do hospedeiro, pois tem capacidade de induzir a expansão clonal de células T ativadas e aumentar a produção de IFN- γ (Kasahara, 1983). Linfócitos e macrófagos são influenciados por essas citocinas acarretando na formação de granuloma bem definido (Roach et al., 2002). Os linfócitos TCD4⁺ são encontrados majoritariamente dentro do granuloma, enquanto os TCD8⁺ são encontrados na superfície do mesmo (Modlin, 1994). Na forma clínica virchowiana há pouca formação de granuloma. Ocorre proliferação do bacilo, com a ocorrência de muitas lesões e infiltrações disseminadas na pele e nos nervos. As células TCD4⁺ do tipo *Th2* secretam citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 e aumentam a resposta humoral. Há descrito na literatura que a IL-4 diminui a expressão de TLR2 nos monócitos e que a IL-10 suprime a produção de IL-12, o que está associado à dominância de linfócitos TCD8⁺ nas lesões virchowianas (Modlin 1994; Mendonça et al., 2008).

2.2.1 Histórico da Toxoplasmose

Segundo Rey (2008), a Toxoplasmose é uma zoonose que possui a capacidade de infectar gatos e uma gama de outros animais vertebrados, incluindo o ser humano. Seu agente etiológico é o protozoário *Toxoplasma gondii*, infectando com alta frequência o homem, na forma de toxoplasmose crônica assintomática.

O *Toxoplasma gondii* foi descoberto em 1908 por Alfonso Splendore, no Brasil ao analisar um parasita sob formas livre e intracelulares, em alguns tecidos de coelho (Splendore, 2009), ao mesmo tempo no Norte da África, Nicolle e Manceux descobriram, no Instituto Pasteur na Tunísia, o parasita ao isolarem células mononucleares do fígado e do baço de um roedor africano, o *Ctenodactylus gundi* (REY, 2008). A morfologia desse parasito é arqueada por isso apresenta o nome toxoplasma que tem origem grega, sendo toxo (arco) e plasma (molde), já a palavra gondii é referência ao roedor. É um parasito intracelular obrigatório e possui diferentes formas infectantes: taquizoítas, bradizoítas e oocistos (Schnell, 2011).

O primeiro caso envolvendo implicações de *Toxoplasma gondii* reconhecido em humanos foi datado em 1923, por Josef Janku na Tchecoslováquia, quando este parasita foi relacionado à ocorrência de cistos teciduais na retina de uma criança de 11 meses de idade com hidrocefalia e cegueira (Janku, 1923). Anos depois, em 1927, no Rio de Janeiro foi descrito por Torres a presença do microrganismo em cortes histológicos da musculatura cardíaca e esquelética e do cérebro de um recém-nascido falecido com 29 dias de vida, iniciando especulações acerca da possibilidade da ocorrência da doença congênita (Torres, 1927; Weiss & Dubey, 2009).

Contudo, a regularidade da infecção humana só foi descoberta a partir de 1948 com a introdução do teste clássico do corante de SABIN & FELDMAN. Essa descoberta contribuiu para a realização de inquéritos epidemiológicos e para diagnósticos sorológicos da toxoplasmose. No mesmo ano, foi descoberto por Frenkel a prova de sensibilidade cutânea à toxoplasmina no reconhecimento de parasitose. Em 1957 foi inserida a reação de hemaglutinação por Jacobs & Lunde e, em 1962, a imunofluorescência indireta por Kelen (Amato Neto et al, 1995).

2.2.2 - Ciclo Biológico do *Toxoplasma gondii*

O ciclo biológico do *T. gondii* é dividido em duas fases, uma sexuada que ocorre no intestino delgado dos hospedeiros definitivos (família dos felídeos) e uma assexuada que acontece nos demais animais homeotérmicos infectados, incluindo o homem (hospedeiros intermediários) (Saadatnia & Golkar, 2012). O parasita possui três formas de vida (esporozoítas,

taquizoítas e bradizoítas) e três estágios intermediários (oocisto imaturo, maduro e cistos teciduais). A partir de qualquer forma infectante do parasita o ciclo sexuado do *T. gondii* pode ser iniciado (Barbosa, Muno e Moura, 2014).

Após a ingestão de animais contaminados por cistos teciduais, enzimas proteolíticas presentes no estômago e no intestino delgado do felino digerem a parede dos cistos liberando bradizoítas que penetram na parede intestinal dando início a fase sexual de reprodução do *T. gondii*. No interior das células epiteliais acontecem diversos estágios esquizontes até a geração de gametas ocorrendo a fecundação dando origem assim, aos oocitos imaturos que são liberados junto do bolo fecal do felino infectado. No ambiente, os oocitos sofrem um processo de amadurecimento chamado esporulação. Os mesmos, acabam contaminando alimentos e até mesmo água e quando ingeridos, dão continuidade ao seu ciclo de vida (Brasil., 2020).

Após serem ingeridos por um hospedeiro susceptível, como o ser humano, ocorre a fase unicamente assexuada. Oocistos maduros, contendo esporozoítos, são ingeridos encontrados em alimentos ou água contaminada. Os esporozoítos acabam invadindo as células epiteliais superficiais do intestino convertendo-se imediatamente em taquizoítos, as novas formas de vida deixam a células em que se encontravam e invadem macrófagos, mantendo assim sua rápida multiplicação (Dobrowolski; Sibley, 1996). Utilizando a circulação sanguínea e linfática do hospedeiro o parasita, intracelularmente, se espalha por todo o organismo, priorizando os tecidos musculares e neurônios. Através do deslocamento dos taquizoítos para o tecido nervoso e muscular o sistema imune acaba sendo acionado modulando assim a endodiogenia para interconversão dos taquizoítos em bradizoítos e regredindo a multiplicação do parasita, nesse momento então inicia-se a formação de cistos teciduais, estrutura que caracteriza a fase crônica da doença. Os cistos teciduais podem permanecer latente no hospedeiro sem ativar uma resposta inflamatória por toda a vida do hospedeiro, evitando sua destruição, entretanto, no decorrer da infecção, os cistos podem sofrer conversão e interconversão entre as formas taquizoítos e bradizoítos gerando novos cistos. Caso ocorra a ingestão de cistos teciduais por um felino ou por outro animal de sangue quente, o ciclo de vida recomeça (Figura 1) (Barbosa; Muno; Moura., 2014).

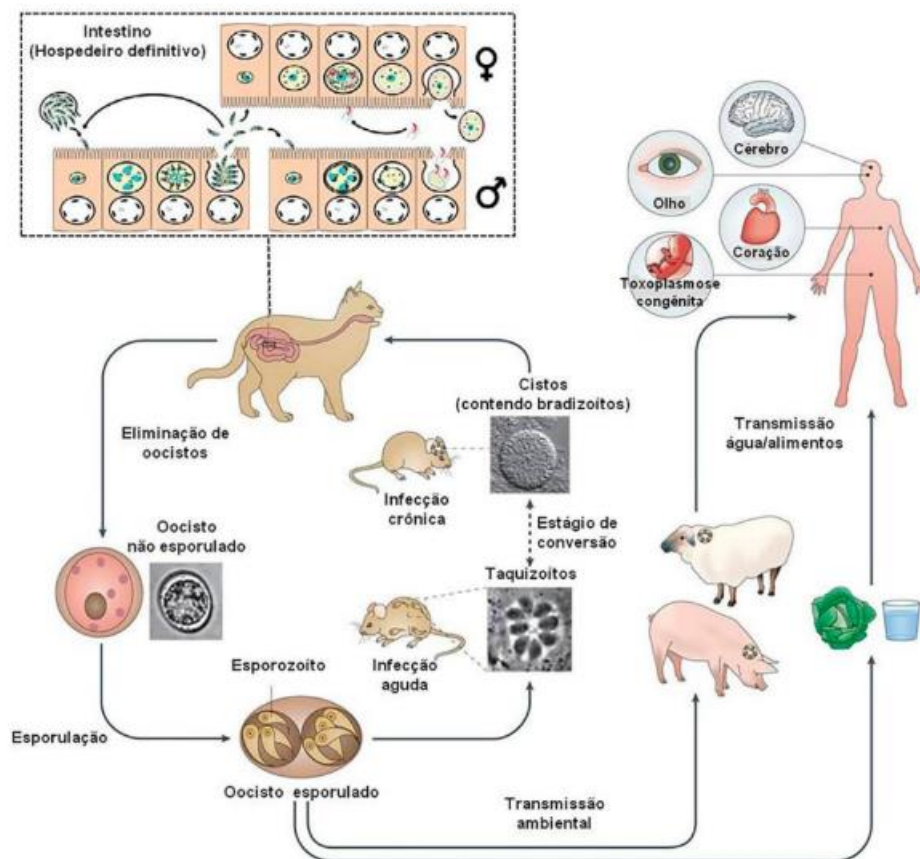


Figura 1: Ciclo completo do protozoário *Toxoplasma gondii*. Extraído de (Vieira,2015).

2.2.3- Epidemiologia

A toxoplasmose possui uma alta taxa de prevalência ao redor do mundo. Considera-se que entre 25 a 30% da população mundial esteja infectada por *T. gondii* (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). Acredita-se que 80% a 90% das infecções sejam assintomáticas (Keavertz e Federman, 2005), no entanto, a infecção por *T. gondii* é o principal motivo da morbidade e mortalidade em crianças infectadas congenitamente e pacientes imunocomprometidos, incluindo indivíduos infectados com HIV (Luft e Remington, 1992, Dubey, 1996, Hill e Dubey, 2002). A soroprevalência de *T. gondii* aumenta com a idade, mas não possui variação entre sexo e é mais baixa em áreas frias e áridas ou em altas altitudes (Montoya e Liesenfeld, 2004). Entretanto, a soroprevalência da toxoplasmose é alterada entre as diversas regiões do globo. No sudeste da Ásia, Norte da Europa e América do Norte são encontrados os menores percentuais de soroprevalência, variando entre 4 e 30%. Nas regiões centrais e sul da Europa, a soroprevalência varia entre 30 e 50%, enquanto na América Latina mais de 50% da população é soropositiva para toxoplasmose. Cerca de 60% da população adulta apresenta-se infectada por este parasito no Brasil (Guimaraes et al., 1993). Estudos realizados no município de Campos

dos Goytacazes-RJ com uma amostragem da população de 1436 indivíduos, 57, 2% apresentavam sorologia positiva para *T. gondii*. E na população com baixas condições sócio-econômicas a soroprevalência para toxoplasmose foi de 84,4% (Bahia-Oliveira et al., 2003).

2.2.4- Transmissão

Ao longo de sua evolução o parasita *T. gondii* desenvolveu várias vias potenciais de transmissão da infecção para seres humanos e outros hospedeiros intermediários. A infecção causada por *T. gondii* pode ocorrer por 3 vias basicamente: por meio da ingestão de cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal-cozidas (Weinman; Chandler, 1954), consumo de água (De Moura et al., 2006) ou alimentos (Kniel et al., 2002) contaminados com oocistos e infecção transplacentária (Desmonts; Couvreur, 1974). Outras vias de transmissão são por transplante de órgãos, transfusão de sangue e acidente de laboratório por contato com agulhas contaminadas (Montoya E Liesenfeld, 2004).

2.2.5- Diagnóstico

Diversas metodologias são utilizadas para o diagnóstico da infecção por *T. gondii*. Métodos diretos de detecção do parasita e indiretos através da sorologia, metodologia mais amplamente utilizada.

O diagnóstico laboratorial para o *Toxoplasma gondii* é geralmente realizado por técnicas imunológicas. As imunoglobolinas (Ig) são produzidas após a infecção e elas são utilizadas na realização dos testes sorológicos para definir o estágio da toxoplasmose. As primeiras Igs a serem produzidas em uma infecção por *T.gondii* são IgA e IgM, sua produção ocorre após uma semana de infecção e atinge o ápice após um mês, tendo uma queda em seu nível sérico em até seis meses. A IgG também inicia sua produção após a primeira semana de infecção alcançando altos níveis séricos em dois a três meses após infecção, em sequência seus níveis diminuem havendo resíduos por toda a vida (Zhang et al., 2016). Diversos testes sorológicos são utilizados para detectar anticorpos IgG antígeno-específico, tais como: teste de Sabin - Feldman “dye test” (atualmente utilizado em poucos laboratórios), imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA) e aglutinação direta (Sepulveda-Arias et al., 2014).

Técnicas moleculares como, a reação em cadeia de polimerase (PCR) tem sido muito utilizada por detectar ácido desoxirribonucleico (DNA) o que confere grande sensibilidade e especificidade na detecção de *T.gondii* possibilitando um diagnóstico precoce (Castro et al., 2001). Em gestantes, a sensibilidade do teste pode variar de acordo com o período de gestação

chegando ao ápice no segundo trimestre sendo o valor preditivo positivo de fluidos amnióticos próximos a 100% (Bastien., 2002).

2.2.6- Tratamento

Vários antibióticos, bacteriostáticos e antiparasitários são empregados para tratar, erradicar ou impedir a transmissão vertical por *T. gondii*. Os medicamentos mais comuns a serem administrados no tratamento da doença é a pirimetamina, sulfadiazina e ácido fólico durante 4 ou 6 semanas, seguido por reavaliação dos pacientes infectados (Mendonça., 2014). Entretanto, indivíduos imunocompetentes com linfadenite toxoplásmica geralmente não são tratados, a menos que possuam sintomas graves e persistentes (Montoya e Liesenfeld, 2004).

Alguns medicamentos específicos como a espiramicina são muito utilizados em grávidas para prevenir a infecção vertical devido a sua impressionante concentração nos tecidos incluindo o placentário, entretanto, não possui ação efetiva quando a infecção ocorreu no concepto (Mendonça., 2014).

2.2.7– Resposta imune a *Toxoplasma gondii*

Uma das características mais marcantes da infecção por *T. gondii* é a forte indução da resposta *Th1*, definida pela produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-12, IFN- γ e Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) (Montoya e Liesenfeld, 2004). Os indivíduos imunocompetentes possuem uma resposta imune celular impressionante contra a infecção pelo protozoário acarretando a lise de células infectadas e inibição de sua multiplicação (Lannes-Vieira, 2014).

As células T CD4⁺ e CD8⁺ responsáveis pela imunidade protetora possuem papel muito importante no controle da infecção na fase aguda, enquanto as citocinas pró inflamatórias IL-12, IFN- γ e TNF- α controlam a carga parasitaria (Lannes-Vieira, 2014). Após o início da infecção pelos parasitas, ocorre a liberação de quimiocinas por células infectadas que recrutam células da imunidade inata, utilizando o reconhecimento de padrões associados ao patógenos (PAMPs) pelos receptores Toll-Like (TLR), durante a fase aguda da infecção, as células apresentadoras de antígenos (APCs) são ativadas e iniciam a produção de IL-12 e IL-18 que recrutam as células assassinas naturais (NK) e promovendo a ativação de células T (BLISS et al., 2001). A produção de IFN- γ pelas NK ativa os macrófagos que começa a produzir TNF- α sendo responsável por um ciclo de expansão clonal celular (Combe et al., 2006). As células TCD4⁺ naive são ativadas e diferenciadas em *Th1* produzindo IL-2 que acaba ativando as

TCD8⁺. A ativação de TCD4⁺ juntamente com TCD8⁺ acarreta na ativação de diversos mecanismos fagocíticos com aumento na produção de intermediários reativos de oxigênio (ROs) e óxido nítrico (NO) limitando então a replicação de *T. gondii* (Pfefferkorn, 1984). O IFN- γ possui grande importância na resposta imune, sua ativação inicia o controle da infecção e gera memória imunológica, entretanto, na fase crônica da doença, sua depleção possibilita a reativação da infecção levando ao aumento de cistos teciduais e taquizoítos circulantes além de focos inflamatórios no sistema nervoso central (Lannes-Vieira, 2014).

3. JUSTIFICATIVA

Características epidemiológicas da hanseníase e toxoplasmose, peculiares à área deste estudo, devem ser consideradas de modo a melhor compreender a possível influência de cada microrganismo sobre o resultado da infecção causada pelo outro, visto que ambas as doenças infecciosas são endêmicas em Campos dos Goytacazes. Como a hanseníase afeta primariamente populações vivendo em áreas mais pobres, a infecção por *T. gondii* pode ser comumente encontrada como uma co-morbidade em indivíduos portadores de hanseníase. Entretanto, não há estudos relacionados a modulação da resposta imune em pacientes co-infectados com *M. leprae* e *T. gondii* e a influência desta imunomodulação na manifestação clínica da hanseníase e nos sintomas da toxoplasmose. Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que indivíduos infectados por *T. gondii* são mais susceptíveis ao desenvolvimento da hanseníase, em especial, em sua forma clínica mais severa. Entretanto as duas infecções possuem um padrão de resposta imune contrário: a toxoplasmose suscita uma imunidade celular Th1, que induz a produção de citocinas IL-12, IL-2, IFN- γ e TNF- α , desencadeando uma resposta imune celular; enquanto indivíduos com hanseníase em sua forma mais severa (Virchowiana) possuem um padrão de respostas Th2, que produz IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que suprimem as atividades macrofágicas e estimulam a ativação dos mastócitos e linfócitos B, caracterizando por uma resposta imune humoral. Dessa forma, os indivíduos com perfil de resposta Th1 são mais resistentes a *M. leprae* devido à resposta imune celular enquanto os indivíduos com resposta Th2 são mais susceptíveis (Oliveira, 2019). Ainda não se conhecem os mecanismos imunológicos envolvidos na co-infecção entre *M. leprae* e *T. gondii* em humanos, sendo assim, estudos devem ser realizados a fim de melhor entendermos de que forma a infecção por *T. gondii* pode contribuir para a manifestação mais severa da hanseníase como visto em trabalho anterior do nosso grupo.

4. OBJETIVO GERAL

Investigar parâmetros da resposta imune de indivíduos que vivem em áreas endêmicas para *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium leprae* e a possível correlação do co-parasitismo com a diversidade clínica da hanseníase.

4.1 Objetivos específicos

1. Investigar em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes portadores de hanseníase, estando infectados ou não por *T. gondii*, os seguintes parâmetros:
 - i. Fenótipo *ex vivo* utilizando-se os marcadores (Anti-CD3, Anti-CD4, Anti-CD8, CD19, Anti-CD5 e Anti-CD45);
 - ii. Produção de citocinas Pró- inflamatórias e Antinflamatórias em culturas de PBMC de pacientes portadores de hanseníase e controles saudáveis através do kit *Cytometric Bead Array (CBA)*
 - iii. Correlacionar estes parâmetros com a presença ou não de infecção por *T. gondii*, bem como com a ocorrência das diferentes manifestações clínicas da hanseníase;
2. Realizar inquérito epidemiológico e sociodemográfico a partir da aplicação de questionários com perguntas fechadas aos participantes do estudo;
3. Propor modelos de análises multivariadas, ajustado para condições sócio-econômicas e formas clínicas da doença, grau de incapacidade usando programas *Epi Info* e *Graph Pad Prism*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Sujeitos da pesquisa

Neste estudo participaram 97 indivíduos residentes no município de Campos dos Goytacazes/RJ. 75 indivíduos portadores da hanseníase e 22 controles. Os pacientes portadores de hanseníase foram provenientes do Programa Municipal de Controle da Hanseníase, da secretaria de saúde, do Município de Campos dos Goytacazes, o qual funciona como centro de referência regional para diagnóstico e tratamento da doença. Este ambulatório recebe pacientes encaminhados de instituições de saúde públicas e privadas. Ressalta-se aqui a colaboração neste projeto do médico dermatologista Dr. Edilbert Pellegrini Nahn Jr. Enquanto os indivíduos controle (sem hanseníase e/ou infecção por *T. gondii*) foram provenientes do Hemocentro do Hospital Ferreira Machado. Portanto os participantes do estudo foram agrupados da seguinte forma: 1) pacientes portadores de hanseníase co-infectados com *T. gondii*, 2) sem co-infecção por *T. gondii*; 3) controles sem hanseníase infectados por *T. gondii* e 4) controles sem hanseníase e sem infecção por *T. gondii*.

Todos os indivíduos voluntários no estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e sobre sua forma de participação, mediante leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O termo foi redigido segundo as regras da resolução 194/96, exigida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), para coleta de amostras de sangue periférico. Esse projeto foi submetido a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pela plataforma Brasil e aprovado sob número CAAE 32510914.7.0000.5244 .

5.2 Obtenção das Células a partir do Sangue Periférico

As amostras de sangue dos indivíduos participantes do estudo foram coletadas por venopunção para obtenção de 27mL de sangue periférico, em tubos a vácuo contendo heparina sódica. O fracionamento celular foi feito por gradiente de Ficoll (LSM®, ORGANON TEKNIKA – 1,08g/mL) para separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) por diferença de densidade, adicionando-se lentamente o sangue sobre o Ficoll, na proporção de 2:1 em tubos cônicos de 50 mL, e submetido à centrifugação à 500g, por 40 minutos, numa temperatura entre a 25°C. O plasma foi retirado e armazenado em tubos de 15 mL a -20°C. As PBMCs coletadas foram lavadas com meio RPMI-1640 (Meio HEPES modificado – GIBCO-BRL) através de duas centrifugações de 1000Xg à 4°C durante 10 minutos. Após o processo de lavagem, as células foram ressuspensas em 2mL de meio RPMI, e uma alíquota de 10 µL dessa suspensão foi retirada e diluída em 90 µL de Azul de Tripán

(0,2%) para a realização da contagem em Câmara de Neubauer do número de células e avaliação da viabilidade celular.

5.3 Detecções de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soro de indivíduos participantes dos estudo meio de ELISA

Placas (Maxi Sorp) de ELISA de 96 poços foram sensibilizadas com extrato antigênico de *Toxoplasma gondii* na concentração de 30µg/ml por poço em 100µl de Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1M (pH 9,6) durante 18-20 horas, a 4 °C. Após o período de sensibilização, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS + Tween 0,05% e bloqueadas com 100 µl em cada poço de PBS/Tween 0,05 % contendo 1% de Albumina de soro bovino (BSA – Sigma Aldrich) por um período de 30 minutos à 4°C. A solução de bloqueio foi descartada por inversão, e as placas foram lavadas conforme descrito anteriormente por mais 3 vezes. Posteriormente, o soro de cada indivíduos e 3 controles positivos e 3 controles negativos para toxoplasmose foi diluído 1:1000 em PBS/Tween 0,05% contendo 0,5% de BSA e adicionados 100µl em cada poço em duplicata. A placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente.

Após outra etapa de lavagem, anticorpos anti-IgG humano conjugados à peroxidase e diluídos 1:1000 em PBS/Tween 0,05% contendo 0,5% de BSA foram adicionados e incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período os poços foram novamente lavados, e adicionados 100µl de solução substrato ABTS (ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) para revelação. Depois de 5 minutos protegidos da luz, a reação foi parada com PBS/Tween 0,05%+ Sódium dodecyl sulfato (SDS) 1% + Azida 0,1% e novamente mantidas protegidas da luz até a leitura. As placas foram lidas no leitor de ELISA (VERSA Max, microplate reader) usando filtro de absorbância a 405 nm. O ponto de corte (cut-off), do teste foi calculado pela média dos controles negativos acrescida de três vezes o desvio padrão destas amostras, onde indivíduos que apresentaram valores menores ou igual ao ponto de corte foram considerados negativos e indivíduos que apresentaram valores maiores que o ponto de corte foram considerados positivos.

5.4 Questionários para inquérito epidemiológico e sociodemográfico

O questionário foi elaborado acerca das condições individuais, outros fatores relacionados aos níveis de endemia e às condições socioeconômicas desfavoráveis, assim como condições precárias de vida e de saúde e o alto índice de ocupação das moradias, que podem influenciar no risco de adoecer. Todos os 25 pacientes responderam o questionário durante o

diagnóstico da hanseníase, no Programa Municipal de Controle da Hanseníase. Esses indivíduos foram abordados pela assistente social do programa após descoberta do diagnóstico clínico. Os resultados obtidos foram armazenados em banco de dados no programa Excel, versão contida na licença de Microsoft Office 365, analisados pelo programa Epi Info versão 7.1.4.

5.5 Fenotipagem de Células Mononucleares do Sangue Periférico e Análise por Citometria de Fluxo

As PBMCs fracionadas (ex vivo) foram plaqueadas em placa de 96 poços com fundo arredondado (U), cinquenta mil células por poço (50.000 células/poço), e processadas para imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti-“cluster of differentiation” (CD) conjugados a fluorocromos para fenotipagem celular, como especificado na Tabela 1. Foram adicionados 5µl de cada um dos anticorpos monoclonais específicos para cada subpopulação de células, incubados por 30 minutos a 4°C e, após esse período, foram feitas duas lavagens com o meio RPMI a 1.000G a 4°C durante 10 minutos. As células foram fixadas com Max Facs Fix (0,1M de NaCl, 1,0% de paraformaldeído e 47,65mM de cacodilato de sódio, pH 7,2) e a determinação fenotípica foi realizada por citometria de fluxo (FACS Calibur - BD). As análises dos percentuais de células foram realizadas utilizando o programa Cell-quest Pro.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais utilizados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Anticorpos	Fluorocromos	Subpopulação celular	Fabricante
Anti-CD3, anti-CD8, anti-CD45 e CD4	FITC, PercP e APC	T CD8 ⁺ e TCD4 ⁺	BD
Anti- CD19 Anti- CD5 e Anti- CD45	FITC, PE e APC	Linfócitos B	BD

5.6 Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico

As PBMC separadas, como descrito no item 5.2, foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços de fundo chato, nas quais foram distribuídas, aproximadamente, $1,0 \times 10^6$ células poços. O meio utilizado para cultura “Culture Medium for Blastogenesis (CMBlast)” [RPMI-1640(GIBCO BRL); L-Glutamina 2mM (MERK); Antibiótico Penicilina – Estreptomicina

20µg/ml (GIBCO BRL) e soro humano AB normal (SIGMA) inativado, com sorologia negativa para toxoplasmose, a 5%.

As culturas de PBMC foram estimuladas antigenicamente através da adição de extratos solúveis derivados de *T. gondii* (STAG) (2µg/ml) ou de *M. leprae* whole cell Gamma-Irradiated from - BEI RESOURCES (10 µg/ml). Culturas de PBMC não estimuladas antigenicamente foram mantidas como controles experimentais. As culturas celulares foram mantidas em estufas úmidas de CO₂ (5%) a 37°C durante 6 dias.

5.7 Obtenção de Sobrenadante de Culturas Celulares para Caracterização do Perfil de Citocinas Secretadas

As suspensões celulares foram coletadas após 6 dias de cultura, transferidas para tubos cônicos para microcentrifugação (Eppendorf). Os sobrenadantes foram separados das PBMC através de centrifugação (12.000rpm) durante 50 segundos em microcentrifuga. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70°C para posterior análise quanto a secreção de citocinas.

5.8 Análise de Citocinas em Sobrenadantes de Culturas de PBMC

Dos 97 participantes do estudo 25 indivíduos foram selecionados e tiveram as PBMC separadas e cultivadas em placas de cultura de 24 poços de fundo chato para análises de citocinas.

As dosagens foram realizadas por meio da técnica de *Cytometric bead array* (CBA), que é uma tecnologia baseada em esferas de citometria de fluxo que permitiu a medição simultânea de múltiplos analitos em amostras biológicas com volumes de amostra muito pequenos para imunoenaios tradicionais. Os grânulos são diferenciados por características de dispersão de luz, e o sinal do imunoensaio é gerado através da ligação de conjugados fluorescentes. Diante disso, as dosagens de citocinas foram realizadas pelo Kit CBA, seguindo especificações do fabricante (BD Biosciences). Brevemente, reconstruímos os padrões de citocinas humanas em diluente de ensaio, posteriormente diluímos os padrões por diluições em série usando o diluente de ensaio, para obter a curva padrão nas seguintes diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32; 1:64; 1:128 e 1:256. Em seguida, preparamos as esferas de captura para as citocinas humanas, juntando em um único tubo a quantidade equivalente a 5µl para cada bead de captura por amostra. Uma vez tendo preparado a curva padrão e o mix com as beads de captura, iniciou-se o ensaio. As amostras foram descongeladas e foram adicionados 25 µL de

cada amostra aos tubos de ensaio, logo em seguida, 25 μ L da mistura contendo as esferas de captura e 25ul do reagente de detecção PE foi adicionado ao tubo. Os tubos de ensaio foram incubados por 3 horas à temperatura ambiente, protegendo-os da exposição da luz. Após a incubação, foi realizada a etapa de lavagem, utilizando 500ul de tampão de lavagem em cada tubo de ensaio e centrifugados a 200xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Logo depois, foi adicionado 300 μ L de tampão de lavagem em cada tubo para ressuspender o grânulo de esferas. Por fim, as amostras foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BectonDickinson).

A análise no citômetro de fluxo, é feita de acordo com a intensidade de fluorescência da curva padrão para determinar a concentração das amostras teste, uma vez que os padrões fornecem um meio para facilitar as comparações dos valores de concentração de citocinas determinados por experimentos conduzidos no mesmo ou em laboratórios diferentes. Desse modo, pela titulação padrão que é estabelecida pela curva padrão, demonstra que quanto menor a concentração, as esferas de captura se encontram na esquerda do gráfico, ao passo de que quando a concentração começa a aumentar, as esferas de captura vão migrar para o lado direito de gráfico (Figura 2). Dessa forma, foi possível correlacionar a intensidade de fluorescência feita pela titulação padrão, para determinar a concentração nas amostras teste, em que foi realizada uma equação da reta e determinada a concentração específica de cada amostra.

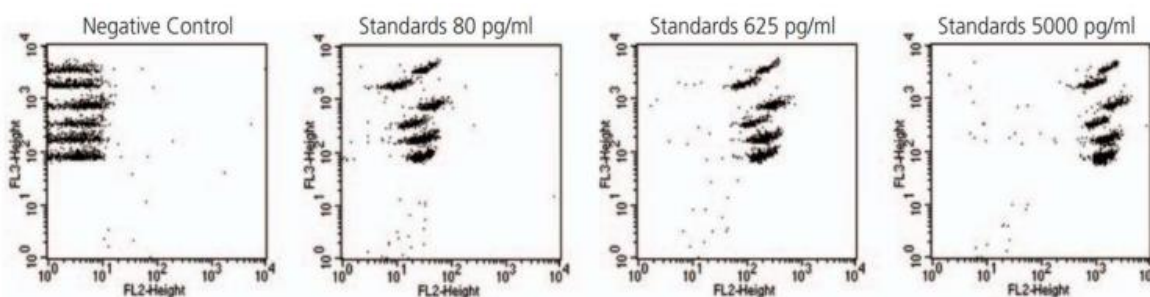


Figura 2. Titulação padrão que é usada para determinar a concentração de cada analito na amostra de teste, usando software de análise CBA

5.9 Análises Estatísticas

As análises estatísticas intra e intergrupos, para comparar o número de células, níveis de imunoglobulinas e dosagem de citocinas foram realizadas utilizando o programa estatístico Prisma (GraphPad Prism 5.0), onde utilizamos as classificações de Madri (1953) e da OMS (1982) para comparação de pacientes e controles. Os dados foram verificados inicialmente quanto à natureza paramétrica ou não paramétrica, considerando-se o seu grau de

independência, normalidade e variância. Os dados que não apresentaram distribuição normal, como é esperado, foram analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis, que é o teste usado para comparação entre três ou mais grupos, seguido pelo teste de Dunn's (pós teste). O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre dois grupos. As análises de riscos também foram feitas usando o Prisma com tabelas de contingências e aplicação do teste de Fisher. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. As análises estatísticas referentes aos dados epidemiológicos, demográficos e socioeconômicos foram realizadas usando o programa EPIINFO.

6. RESULTADOS

6.1 Casuística do Estudo

Ao todo, 97 indivíduos participaram desse estudo, sendo 75 casos portadores da doença e 22 controles. Dentre os pacientes, 52 foram do sexo masculino (69,4%) e 23 são do sexo feminino (30,6%) (Tabela 2). Todas as quatro formas clínicas da hanseníase foram encontradas no estudo: 2 indivíduos apresentaram a forma clínica indeterminada, 17 indivíduos a forma clínica tuberculóide, 32 a forma clínica dimorfa e 24 a forma clínica virchowiana (Tabela 1).

Tabela 2. Características gerais dos indivíduos participantes da pesquisa.

Variáveis	Hanseníase n (%)	Controle n (%)
Sexo		
Homens	52 (69,4%)	11 (50%)
Mulheres	23 (30,6%)	11 (50%)
Total	75 (100%)	22(100%)

6.2- Soroprevalência da infecção por *T. gondii* em portadores de hanseníase e controles

A detecção de anticorpos IgG anti-STAg foi realizada nas amostras de soro dos 97 indivíduos por meio de ELISA, destes, 75 eram portadores da hanseníase, 22 eram controles (Tabela 3). Dentre os pacientes portadores de hanseníase, 13 apresentaram sorologia negativa para *T. gondii*, enquanto 62 apresentaram sorologia positiva, o que representa 82,6% de prevalência da infecção por *T. gondii* neste grupo (Tabela 3).

Tabela 3: Prevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* em indivíduos portadores de hanseníase.

Indivíduos	Classificação	N°	IgG+ anti- <i>T.gondii</i> n° (%)	IgG- anti- <i>T.gondii</i> n° (%)	
Pacientes	OMS	Madrid			
	PB	Indeterminada	2	1 (50%)	1 (50%)
		Tuberculóide	17	10 (58,8%)	7 (41,1%)
	MB	Dimorfo	32	27 (84,3%)	5 (15,6%)
		Virchowiana	24	24 (100%)	0 (0%)
		75	62 (82,6%)	13 (17,3%)	
Controle		22	11 (50%)	11 (50%)	
TOTAL		97	73 (75,2%)	24 (24,7%)	

Quando os indivíduos foram agrupados de acordo com a classificação de Madri, a soroprevalência de IgG anti-STAg foi de 100% para os pacientes virchowianos (LL), 84,3% para dimorfos (DL), 58,8 % para tuberculóides (TT) e 50% para indeterminados (IDL).

6.3- Questionários para inquérito epidemiológico e sociodemográfico

Ao todo 25 pacientes infectados por *M. leprae* responderam o questionário epidemiológico. As análises foram realizadas utilizando o programa EPINFO. Os indivíduos eram residentes do município de Campos dos Goytacazes com idades entre 17 a 77 anos de vida. A mediana de idade da população foi de 47,3 anos. Cerca de 72,00% (18) indivíduos apresentaram positividade para a infecção pelo *T.gondii*, enquanto 28,00% (7) estavam negativos para a infecção.

O nível de escolaridade declarado foi: analfabetos 15,38% (4), fundamental incompleto 42,31% (11), ensino fundamental completo 15,38 % (4), ensino médio incompleto 7,69% (2), ensino médio completo 19,23% (5). A tabela 4 demonstra a relação entre a infecção pelo *T. gondii* e grau de escolaridade entre os pesquisados. Não tendo sido encontrada diferença estatística significativa para grau de escolaridade e infecção por *T. gondii*.

Tabela 4:Relação entre a infecção por *T.gondii* e grau de escolaridade dos participantes do estudo

Grau de Instrução	Positivo	Negativo	Total
Analfabeto	3	0	3
1º ao 5º ano do Fundamental	9	2	11
6º ao 9º ano do Fundamental	2	2	4
Ensino Médio Incompleto	0	2	2
Ensino Médio Completo	4	1	5
Total	18	7	25

* Teste Kruskal-Wallis p-valor=0.1058

** Não foram consideradas as respostas: não respondeu e não sabe informar.

Quanto a raça os pesquisados se declararam como 48,00% (12) pardos, pretos 32,00% (8), brancos 20,00% (5).

Entre as condições socioeconômico demográficas, a renda familiar mensal era menor que um salário-mínimo nacional por 16,00% (4) dos indivíduos participantes do estudo, um salário 52,00% (13), dois salários 16,00% (4) e mais de dois salários 16,00% (4).

Dados comparativos entre fatores socioeconômicos demográficos como renda familiar e raça dos pesquisados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 : Comparação entre renda familiar e raça dos participantes do estudo.

Renda Familiar	Raça: Pardo	Raça: Negro	Raça: Branco	Total
Menos de 1 Salário	3	1	-	4
1 Salário	5	5	3	13
2 Salários	3	1	-	4
Mais de 2 Salários	1	1	2	4
Total	12	8	5	25

A tabela 6 apresenta a análise sobre probabilidade de infecção por ingestão de água não filtrada associado a infecção por *T.gondii*. Não foi possível encontrar uma associação positiva estatisticamente. Entretanto a maioria dos indivíduos infectados para *T.gondii* fazem ingestão de água não filtrada.

Tabela 6: Comparação entre a ingestão de água não filtrada e a Infecção pelo *T.gondii* .

Ingestão de Água Não Filtrada	Positivo	Negativo
Sim	14	3
Não	6	2
Total	20	5

Teste Kruskal-Wallis p-valor = 0,9139

Foi também analisado a rede de abastecimento de água utilizada pelos participantes do estudo e sua relação com a coinfeção pelo *T.gondii*, esses dados são mostrados na tabela 7.

Tabela 7: Comparação entre o abastecimento de água e a Infecção pelo *T.gondii* .

Abastecimento de água	Positivo	Negativo	Total
Rede de Abastecimento	6	8	14
Poço artesiano	8	2	10
Nascente	1	0	1
Total	15	10	25

* Teste Kruskal-Wallis p-valor=0.1838

As condições de saneamento básico também foram avaliadas e indicaram que mais de 50% dos indivíduos participantes do estudo não possui sistema de esgotamento sanitário nas suas residências; as instalações sanitárias nos domicílios dos participantes são ligadas por sistema de fossas, em 2 habitações os participantes não possuíam sanitário no domicílio. Na tabela 8 são descritas as condições sanitárias dos participantes. O grau de subdesenvolvimento socioeconômico é demonstrado através da falta de abastecimento de água canalizada em 16% das residências; 4% não possuíam sanitário no domicílio (**Tabela 8**).

Tabela 8: Condições dos sistemas de esgotamento sanitário dos participantes do estudo.

Sistema de Esgotamento Sanitário	Nº	%
Serviço de rede de coleta pública	10	40%
Mato	0	0%
Queimado	0	0%
Fossa	14	56%
Outros	1	4%
Total	25	100%

6.4- Quantificação do percentual das diferentes subpopulações de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em pacientes.

O gráfico da Figura 1A apresentam os valores percentuais de linfócitos totais no sangue periférico dos indivíduos portadores ou não da coinfeção. Observou-se que os indivíduos co-infectados por *T.gondii* e *M.leprae* (CH+/Tg+) apresentaram uma marcada redução do número de linfócitos totais quando comparado aos indivíduos por *T.gondii* (CH-/Tg+) ou

controles saudáveis (CH-/Tg-) (**Figura 3B**). Quando separamos os grupos de análises considerando linfócitos T e B, observamos que essa redução de percentual de linfócitos no grupo de indivíduos co-infectados *M. leprae*/*T. gondii* foi mantida apenas quanto ao percentual de linfócitos TCD4⁺ (**Figura 3 C**), não tendo sido observado nas análises de linfócitos T totais, linfócitos B e linfócitos TCD8⁺ (**Figura 3D, E e F**).

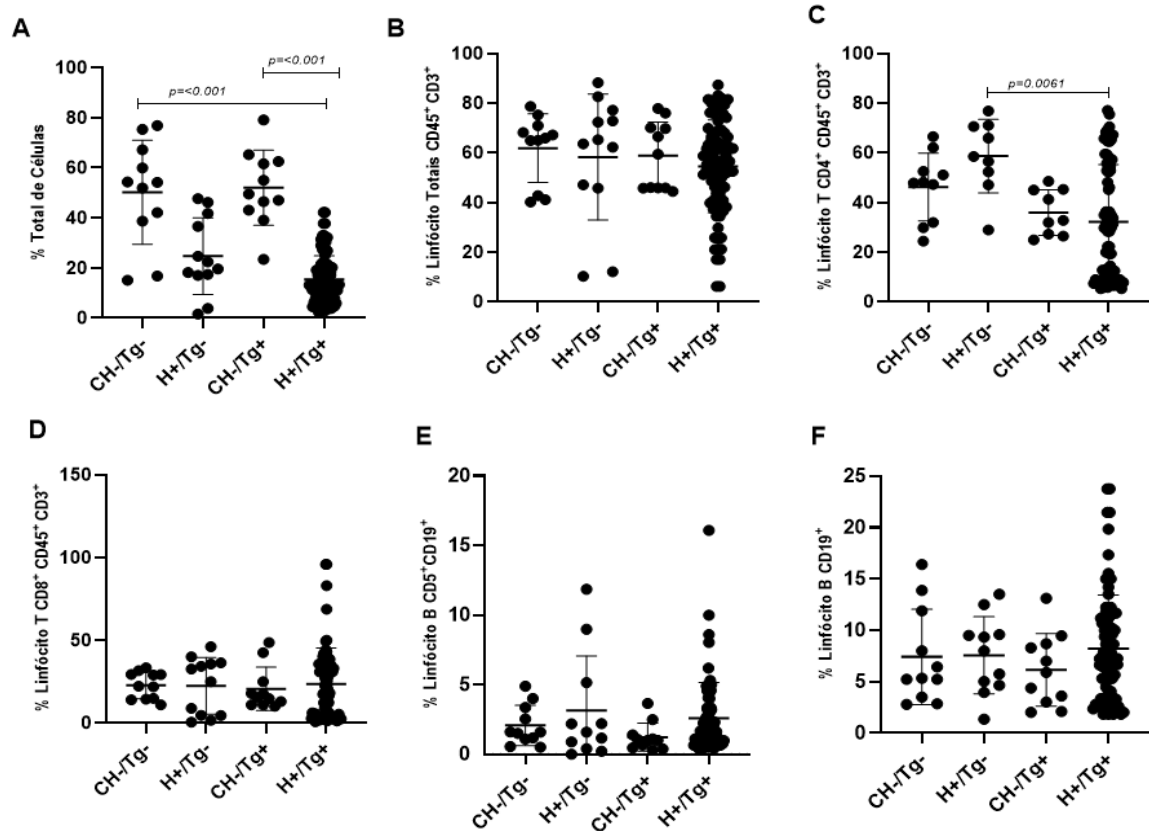


Figura 3. Percentual de linfócitos *ex vivo* nos indivíduos controle sem hanseníase e positivos para *T. gondii* (CH-/Tg+), controle sem hanseníase e negativos para *T. gondii* (CH-/Tg-), portadores de hanseníase positivos para *T. gondii* (H+/Tg+) e portadores de hanseníase negativos para *T. gondii* (H+/Tg-). **A-** Percentual da população de linfócitos totais no sangue periférico **B-** Percentual da população de linfócitos T totais. **C-** Percentual da população de células TCD4+. **D-** Percentual da população de células TCD8+. **E-** Percentual da população de células B CD5+. **F-** Percentual da população de células B. Teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's, considerando o valor de *p* significativo < 0,05.

Para avaliarmos se havia alguma forma clínica associada a redução do percentual de linfócitos TCD4⁺, separamos os pacientes coinfectados nas diversas formas clínicas e foi possível observar que essa marcada redução estava associada a forma clínica mais severa da doença, a virchowiana (Figura 4).

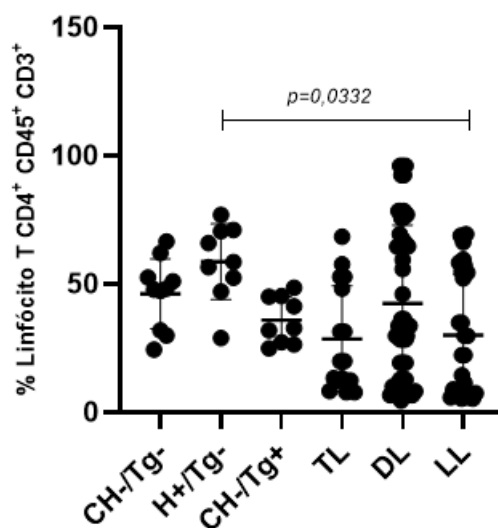


Figura 4. Percentual da população de células TCD4+ *ex vivo* nas diferentes formas clínicas da hanseníase. Indivíduos controle sem hanseníase e positivos para *T. gondii* (CH-/Tg+), controle sem hanseníase e negativos para *T. gondii* (CH-/Tg-), portadores de hanseníase positivos para *T. gondii* (H+/Tg+) e portadores de hanseníase negativos para *T. gondii* (H+/Tg-). Classificação de Madrid: as formas clínicas LL- Lepromatosa ou virchowiana, DL- Dimorfa, IDL- Indeterminada, TL-Tuberculoide. Teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido por Dunn's.

6.6. Análise de Citocinas em Sobrenadantes de Culturas de PBMC

As citocinas foram dosadas em sobrenadantes de cultura com os diferentes estímulos dos indivíduos participantes estudo. Os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para analisar as diferenças estatísticas. A quantidade específica de amostras incluídas para as citocinas analisadas foi de 19 pacientes com três estímulos diferentes e o controle da placa. Os indivíduos foram selecionados considerando-se a representatividade de indivíduos de cada subgrupo abordado nessa investigação, a tabela 9 mostra como foram selecionados os pacientes.

Foram realizadas análises comparativas entre todos os indivíduos infectados por *T.gondii*, por *M.leprae*, coinfectados e controles saudáveis. Os pacientes foram separados na forma clínica operacional para melhor análise.

Tabela 9: Relação da quantidade de amostra para a análise de citocinas.

Indivíduos	Classificação	Nº	IgG+ anti- <i>T.gondii</i> n° (%)	IgG- anti- <i>T.gondii</i> n° (%)
	OMS			
	Madrid			
	Tuberculóide	6	4	2
	Dimorfo	5	3	2
	MB			
	Virchowiana	4	4	0
		15	11	4
Controle		4	2	2
TOTAL		19	13	6

6.6.1- Dosagem de IL-12

Foi possível observar que na presença do reestímulo de *T. gondii* os níveis de IL-12 aumentaram em comparação aqueles indivíduos que não foram previamente infectados ao longo da vida. Esse aumento está relacionado aos indivíduos que são infectados por ambos os patógenos (*T.gondii*/*M.leprae*) e está associado ao reestímulo por *T.gondii* como mostrado na figura 5A. A fim de relacionarmos a qual forma clínica esse aumento estava relacionado, separamos os pacientes na forma clínica operacional Paucibacilar e Multibacilar. Foi possível observar que esse aumento está relacionado a forma clínica mais severa a Multibacilar apesar de não apresentado significância estatística (Figura 5B).

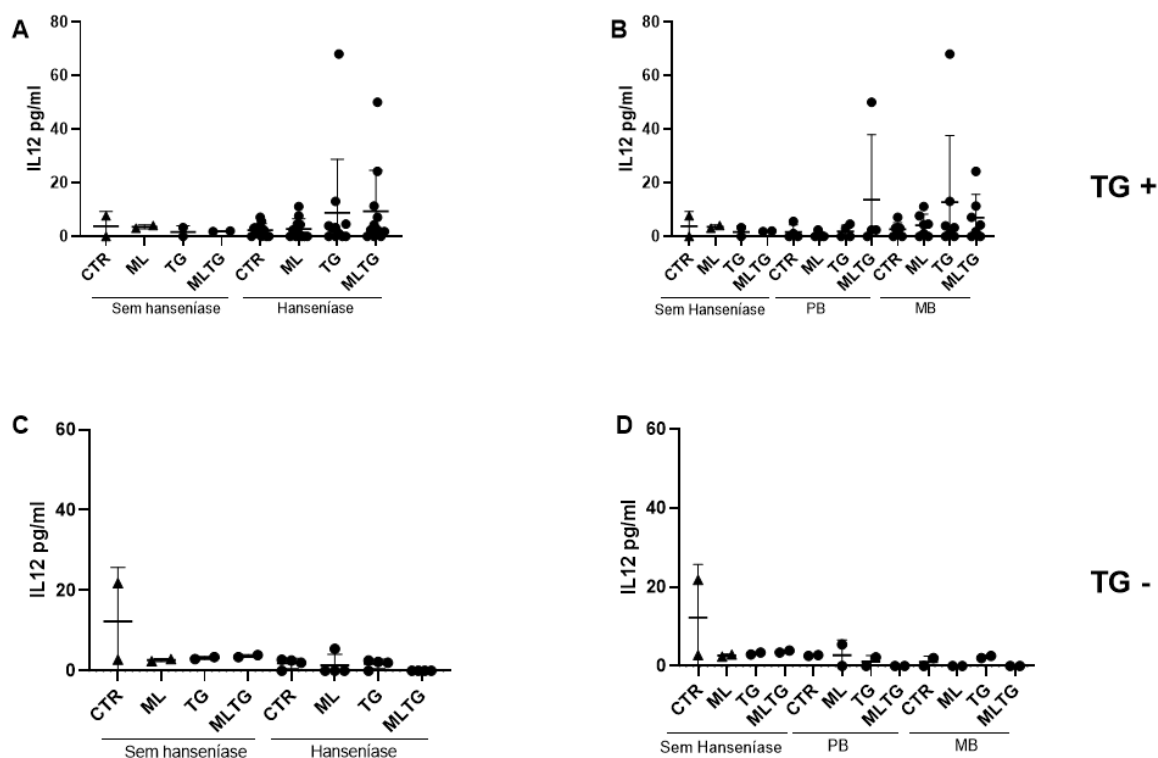


Figura 5: Dosagem de IL-12 em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos infectados por *M.leprae* ou *T.gondii*, controles saudáveis e coinfectados estimuladas *in vitro* com antígenos de *T.gondii* e *M.leprae* ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle). **(A)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(B)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a e infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da hanseníase. **(C)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(D)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da hanseníase. CTR- controle, ML -*M.leprae*, TG- *T.gondii* e MLTG- *M.leprae/T.gondii*, TG+-*T.gondii* positivo e TG- - *T.gondii* negativo.

6.6.2- Dosagem de TNF- α

As maiores dosagens de TNF- α foram observadas nos indivíduos coinfectados e reestimulados com ambos os patógenos. Entretanto, aqui fica possível observar que apesar de não ter apresentado significância estatística o reestímulo com *M. leprae* está elevando a produção dessa citocina nos pacientes coinfectados (**Figura 6A**). Quando comparados entre a classificação operacional essa diferença fica ainda mais visível para ambas as classificações nos grupos reestimulados com *M. leprae* e ambos os estímulos (**Figura 6B**).

Na ausência de infecção prévia por *T.gondii*, a dosagem de TNF- α foi pouca ou nenhuma sob os estímulos antigênicos (**Figura 6C e D**).

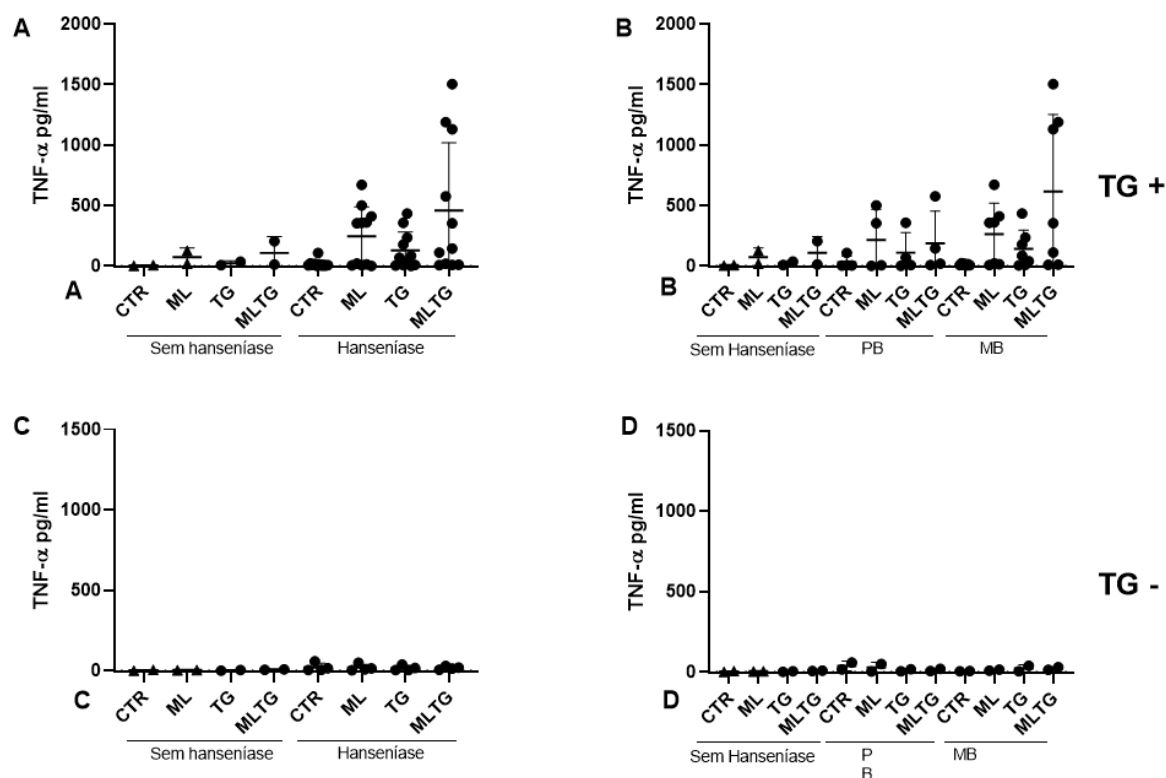


Figura 6: Dosagem de TNF- α em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos infectados por *M. leprae* ou *T. gondii*, controles saudáveis e coinfectados estimuladas *in vitro* com antígenos de *T. gondii* e *M. leprae* ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle). **(A)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T. gondii* comparando a infecção ou não por *M. leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(B)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T. gondii* comparando a e infecção ou não por *M. leprae* e as diferentes classificações operacionais da Hanseníase. **(C)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T. gondii* comparando a infecção ou não por *M. leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(D)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T. gondii* comparando a infecção ou não por *M. leprae* e as diferentes classificações operacionais da Hanseníase. CTR- controle, ML -*M. leprae*, TG- *T. gondii* e MLTG- *M. leprae/T. gondii*, TG+-*T. gondii* positivo e TG- - *T. gondii* negativo.

6.6.3- Dosagem de IL1- β

Pôde-se observar que, assim como TNF- α , a citocina IL-1 β possui uma dosagem elevada nos pacientes coinfectados por ambas as doenças (**Figura 7A**), reestimuladas por *M. leprae* *in vitro*. É possível observar que os indivíduos controle e infectados por *M. leprae* produz um pouco dessa citocina mas de maneira bem mais baixa (**Figura 7 C e D**), diferente dos indivíduos infectados com ambas as doenças. Na figura 5A é possível observar que indivíduos infectados por *T. gondii*, quase não produz essa citocina mesmo na presença dos estímulos antigênicos. Já a dosagem dos sobrenadantes de cultura dos indivíduos coinfectados sob ambos os estímulos

foi significativamente maior em comparação aos indivíduos infectados por *T.gondii* sem estímulo ($p=0,0256$). É possível observar que esse aumento está relacionado ao reestímulo por *M.leprae*, quando comparados com as dosagens do sobrenadante de cultura sem estímulo dos indivíduos infectados por *T.gondii* ocorreu um aumento significativo ($p=0,0256$). Dentro do grupo de indivíduos infectados por ambas as doenças foi possível observar que esse aumento permanecia significativo ao compararmos as culturas de PBMCs que não haviam sido estimuladas antigenicamente com o sobrenadante das culturas estimuladas por *M.leprae* ($p=0,0049$) e sobrenadante das culturas reestimuladas por *M.leprae/T.gondii* ($p=0,0023$). Mostrando que o estímulo de *M. leprae* está tendo um papel importante no aumento dessa citocina.

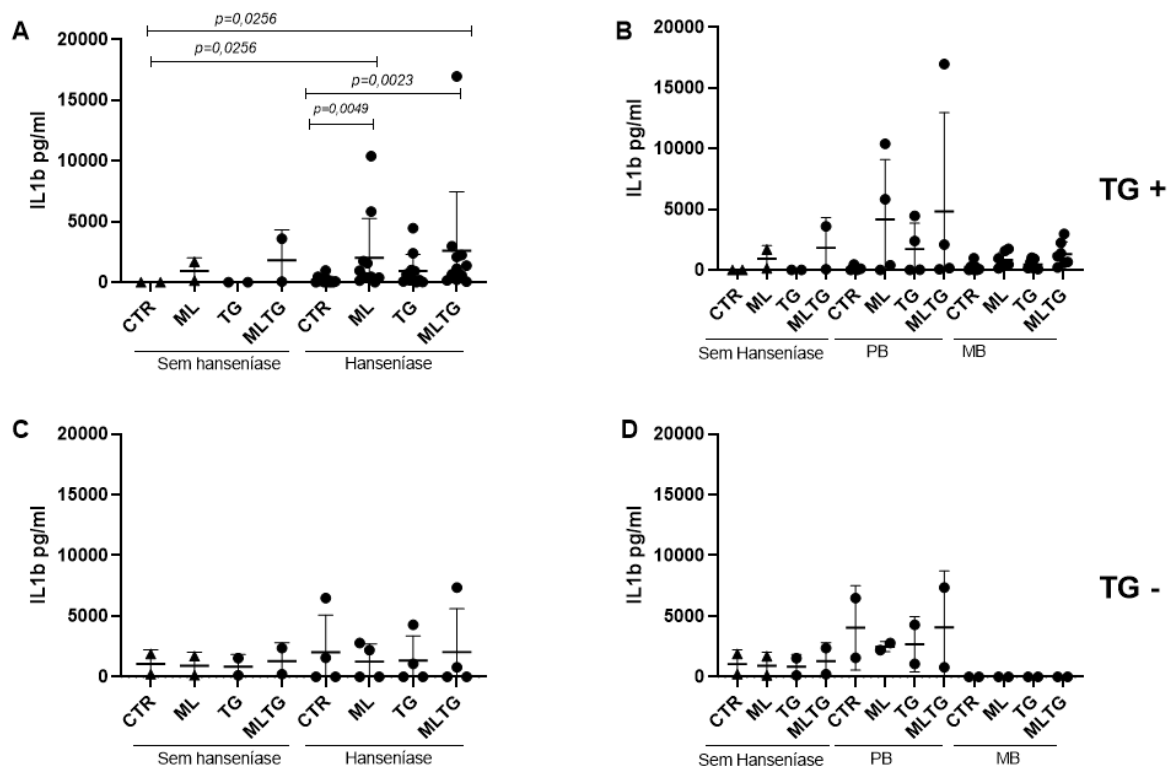


Figura 7: Dosagem de IL-1 β em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos infectados por *M.leprae* ou *T.gondii*, controles saudáveis e coinfectados estimuladas *in vitro* com antígenos de *T. gondii* e *M. leprae* ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle). **(A)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(B)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a e infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da hanseníase. **(C)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(D)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da hanseníase. CTR-

controle, ML -*M.leprae*, TG- *T.gondii* e MLTG- *M.leprae/T.gondii*, TG+-*T.gondii* positivo e TG- - *T.gondii* negativo.

6.5.4- Dosagem de IL-6

Para IL-6, foi possível observar um aumento significativo nas dosagens dessa citocina na cultura de PBMC dos indivíduos coinfectados estimulados antigenicamente para ambos os patógenos quando comparados ao sobrenadante da cultura sem estímulo antigênico dos indivíduos infectados por *T.gondii* ($p=0,0256$) como mostra a figura 8A. Até mesmo dentro do grupo de indivíduos coinfectados esse aumento permaneceu significativo entre as PBMCs não estimuladas antigenicamente e as estimuladas para ambos os antígenos ($p=0,0270$). Esse aumento está aparentemente relacionado ao *T.gondii*, pois quando as PBMCs dos indivíduos coinfectados foram reestimuladas pelo antígeno, a dosagem dessa citocina aumentou de maneira significativa comparado ao poço não estimulado antigenicamente ($p=0,0382$) e permaneceu na cultura para ambos os patógenos (**Figura 8A**).

A fim de verificarmos se havia relação entre o aumento da dosagem de IL-6 e a forma clínica operacional dos pacientes, estratificamos os indivíduos coinfectados em PB e MB comparados com o grupo infectado por *T.gondii* e foi possível observar que essa dosagem aumentada estava relacionada significativamente aos indivíduos coinfectados reestimulados antigenicamente por ambos os patógenos pertencente a formas clínicas MB ($p=0,0278$). Entre as formas clínicas foi possível observar que os indivíduos coinfectados PB apresentaram uma dosagem mais baixa para essa citocina nas culturas de PBMCs não estimuladas antigenicamente em comparação aos indivíduos coinfectados MB reestimulados antigenicamente para ambos os patógenos ($p=0,0061$). Nessa análise é possível observar que o aumento da dosagem dessa citocina está mesmo relacionado ao reestímulo por *T.gondii*, pois é significativo o aumento dessa citocina quando comparamos as culturas de PBMC não estimuladas antigenicamente pertencentes ao grupo PB e o sobrenadante da cultura dos indivíduos MB estimulados antigenicamente por *T.gondii* ($p=0,0091$).

Nas dosagens de IL-6 foi possível observar, mesmo não apresentando um resultado significativo, que na ausência da infecção por *T.gondii* os indivíduos infectados por *M.leprae* produziram um dosagem mais alta dessa citocina quando comparado aos controles saudáveis (**Figura 8C**), diferente das outras citocinas analisadas, onde esses indivíduos quase não produziram independente do estímulo antigênico. A fim de correlacionarmos a qual classificação operacional essa produção aumentada estava relacionada separamos esses

indivíduos em PB e MB, sendo possível observar que os indivíduos da forma clínica operacional paucibacilar estava produzindo essa citocina de maneira mais elevada em comparação aos outros grupos independentes do estímulo na cultura, enquanto os multibacilares mostraram baixa produção, apesar de não apresentar diferença estatística significativa (**Figura 8D**).

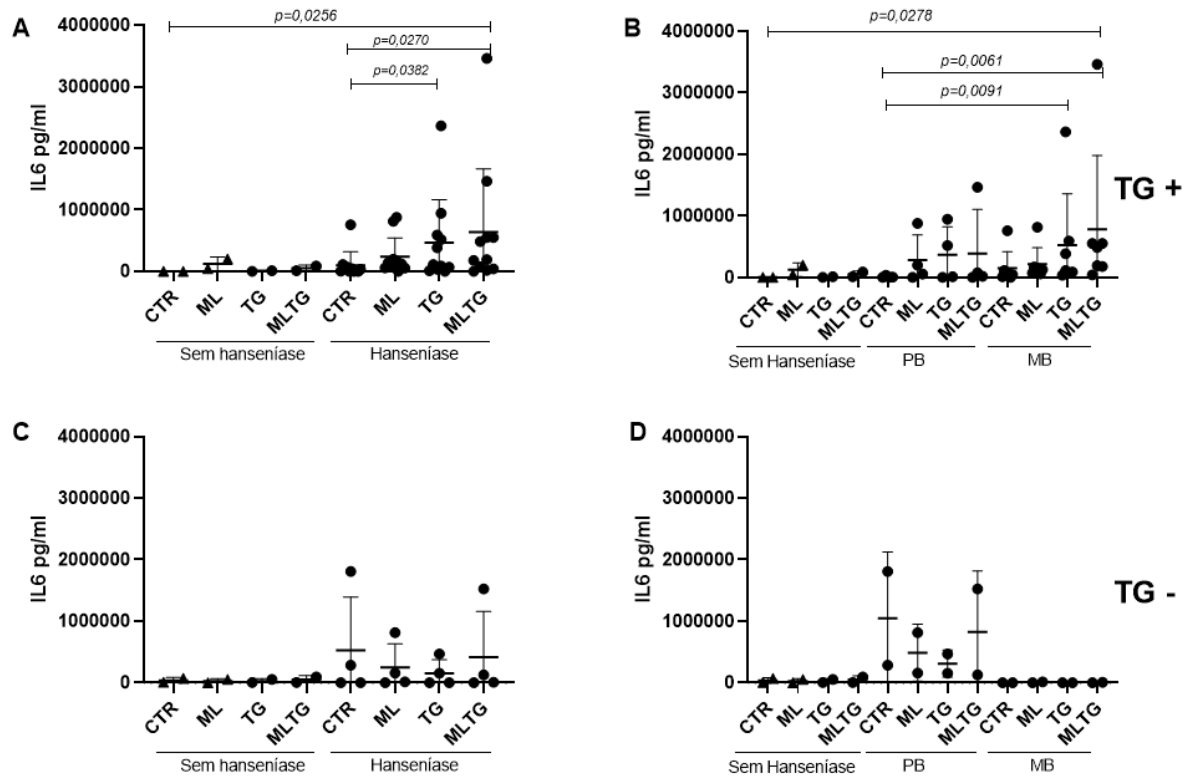


Figura 8: Dosagem de IL-6 em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos infectados pelo *M.leprae* ou *T.gondii*, controles saudáveis e coinfectados estimuladas *in vitro* com antígenos de *T. gondii* e *M. leprae* ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle). (A) Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. (B) Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a e infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da hanseníase. (C) Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. (D) Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da hanseníase. CTR- controle, ML -*M.leprae*, TG- *T.gondii* e MLTG- *M.leprae/T.gondii*, TG+-*T.gondii* positivo e TG- - *T.gondii* negativo. Teste de Kruskal-Wallis seguido por Dunn's .

6.5.5- Dosagem de IL-8

As dosagens de IL-8, ao contrário de todas as citocinas anteriores, tiveram maior produção nos indivíduos controles saudáveis e infectados por *M. leprae* (**Figura 9C**), apesar de não apresentar significância estatística. No que corresponde aos indivíduos infectados para *M. leprae*, a alta produção da citocina foi observada nas culturas de pacientes multibacilares não estimulada e sob os estímulos de *T. gondii* e *M. leprae* separadamente de forma contrária, quando a cultura foi estimulada por ambos os antígenos, a produção de IL8 foi diminuída, assim como observada nas culturas dos indivíduos paucibacilares (**Figura 9D**). Já no grupo de indivíduos infectados por *T. gondii* a dosagem de IL-8 foi maior entre os coinfectados, tendo uma produção aumentada quando não estimulada e uma tendência a diminuir quando estimuladas, seja por um ou ambos os estímulos. A cultura de PBMCs de pacientes estimulada com ambos os antígenos produziu muito menos em comparação a a cultura não estimulada do mesmo grupo (**Figura 9A**). Dentre os indivíduos coinfectados, quando estratificados em paucibacilares e multibacilares (**Figura 9B**), é possível observar maior produção entre os multibacilares, tendo a produção maior nas culturas sem estímulo e estimulada com *M. leprae*.

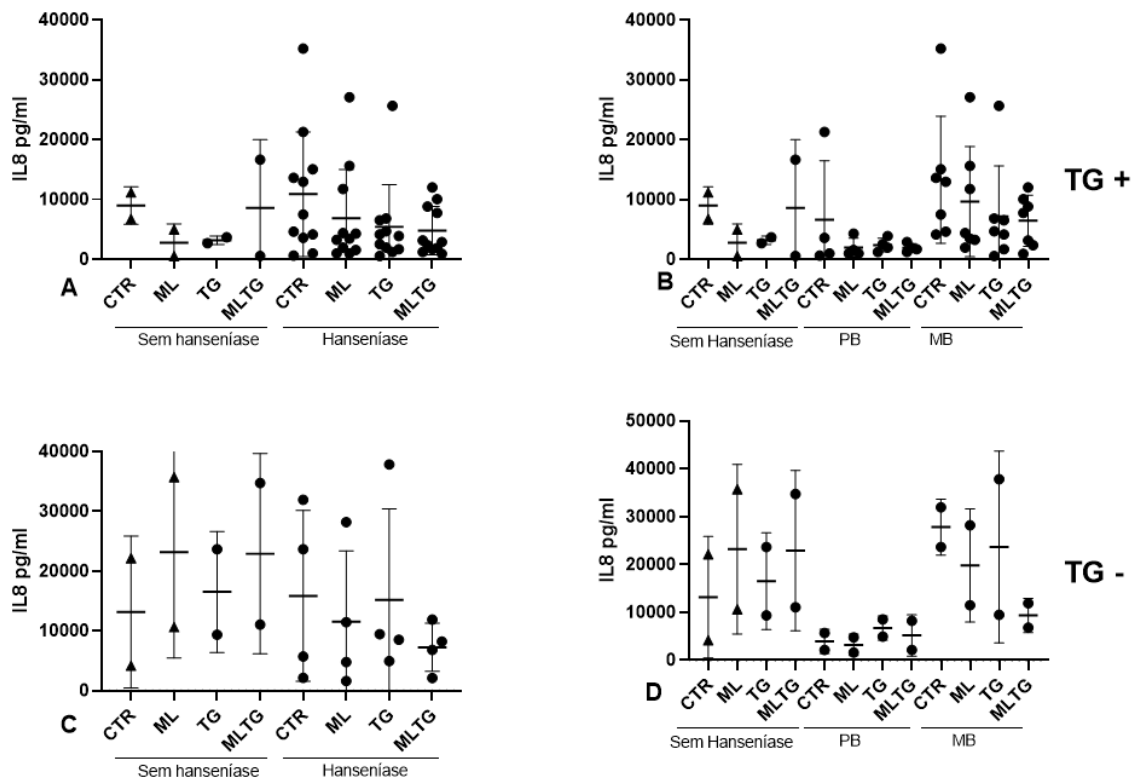


Figura 9: Dosagem de IL-8 em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de indivíduos infectados pelo *M.leprae* ou *T.gondii*, controles saudáveis e coinfetados estimuladas *in vitro* com antígenos de *T. gondii* e *M. leprae* ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle). **(A)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(B)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a e infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da Hanseníase. **(C)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(D)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da Hanseníase. CTR- controle, ML -*M.leprae*, TG- *T.gondii* e MLTG- *M.leprae/T.gondii*, TG+-*T.gondii* positivo e TG- - *T.gondii* negativo. Teste de Kruskal-Wallis seguido por Dunn's

6.5.6- Dosagem de IL-10

As maiores dosagens observadas para IL-10 foram nos indivíduos infectados por *T.gondii* (**Figura 10A**). Esse aumento estava relacionado de maneira específica aos indivíduos também infectados por *M.leprae* estimulados por ambos os antígenos comparado aos níveis dessa citocina nos controles não estimulados antigenicamente ($p=0,0043$). É possível observar

que esse aumento está relacionado significativamente a *M.leprae* ($p=0,0226$) (**Figura 10A**). Afim de observarmos a qual forma clinica esse aumento estava associado comparamos os indivíduos separando-os em PB e MB, apesar de não apresentar significância estatística fica visível que independente da forma clinica essa citocina apresenta dosagens mais altas nos indivíduos coinfectados reestimulados por ambos os antígenos e de maneira especial a *M.leprae* (**Figura 10B**). Já nos indivíduos não infectados por *T. gondii*, foi observada baixa produção da citocina, independentemente da infecção por *M. leprae* (**Figuras 10 C e D**).

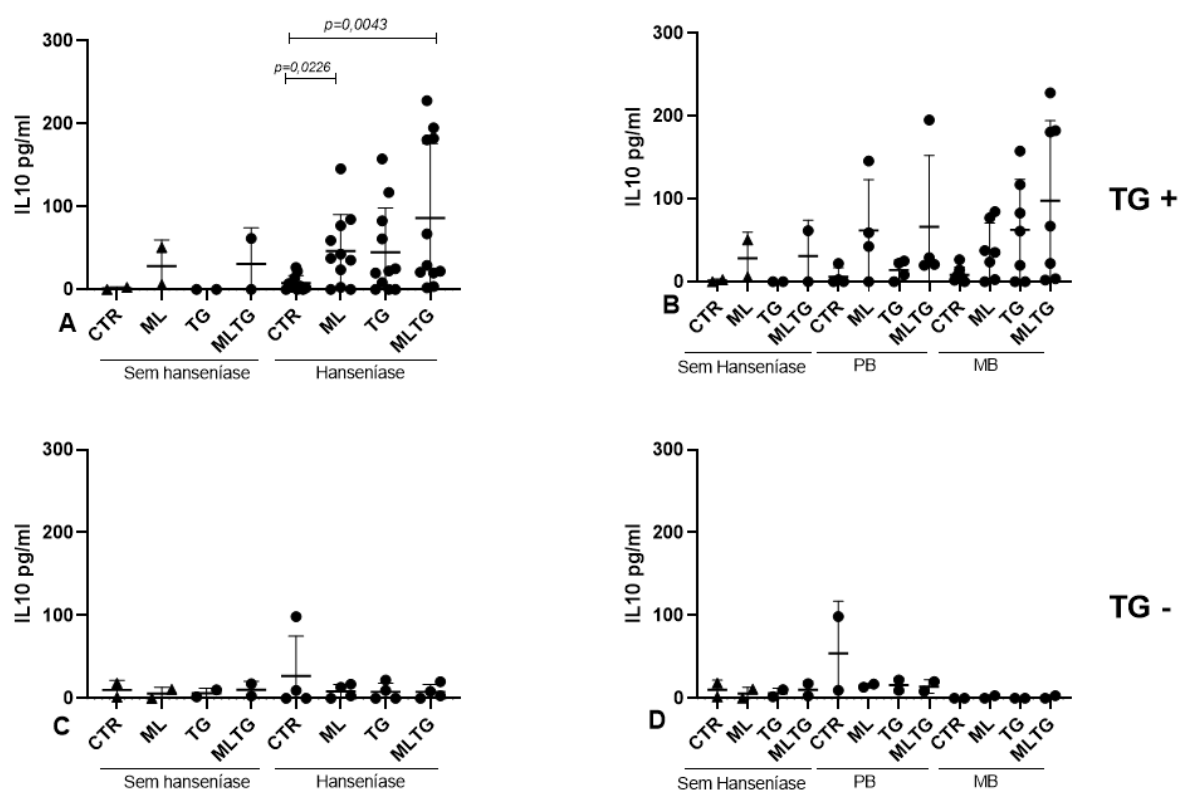


Figura 10: Dosagem de IL-10 em sobrenadantes de sexto dia de cultura de PBMC de de indivíduos infectados por *M.leprae* ou *T.gondii*, controles saudáveis e coinfectados estimuladas *in vitro* com antígenos de *T. gondii* e *M. leprae* ou cultivadas sem estímulo antigênico (Controle). **(A)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(B)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos positivos para a infecção por *T.gondii* comparando a e infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da hanseníase. **(C)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* nos diferentes estímulos *in vitro*. **(D)** Dosagem de sobrenadantes de indivíduos negativos para a infecção por *T.gondii* comparando a infecção ou não por *M.leprae* e as diferentes classificações operacionais da hanseníase. CTR- controle, ML -*M.leprae*, TG- *T.gondii* e MLTG- *M.leprae/T.gondii*, TG+-*T.gondii* positivo e TG- - *T.gondii* negativo. Teste de Kruskal-Wallis seguido por Dunn's

7. DISCUSSÃO

A resposta imune tem um papel essencial na defesa contra agentes infecciosos e se estabelece como a principal barreira para a ocorrência de infecções disseminadas, rotineiramente associadas com alto índice de mortalidade (Machado et al., 2004). Embora o nosso organismo seja constantemente apresentado a agentes infecciosos, a doença infecciosa é um tanto rara, pois para quase todas as doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é bem superior aos que manifestam a doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de destruir esses microrganismos e impedir a progressão da infecção (Carvalho et al., 1998). Entretanto, insuficiências imunológicas associadas à imunidade inata ou a imunidade adaptativa são fortemente associadas com o aumento da susceptibilidade a infecções (Machado et al., 2004). Diversos fatores podem afetar a resposta imune, tornando-a menos eficaz: idade, ambiente, fatores genéticos, anatômicos, fisiológicos, metabólicos e microbianos (Carvalho et al., 1998).

Estudos em animais mostraram que as respostas biológicas, histológicas e imunológicas suscitadas por um parasita foram alteradas na presença de outro parasita. Esses mesmos estudos indicam a existência de interações entre respostas imunes induzidas pela presença simultânea de ambos os parasitas (Lemaitre et al., 2014). A malária, por exemplo, contribui ativamente para o aumento da taxa de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), indicando que a imunidade desregulada devido a uma infecção crônica pelo hospedeiro pode ser responsável pelo aumento da incidência de outras doenças infecciosas (Abu-Raddad et al., 2006).

A hanseníase é uma doença muito antiga e negligenciada, ainda endêmica e com uma ampla distribuição mundial (Sasaki et al., 2001). Campos dos Goytacazes se apresenta como um município endêmico para a doença, mesmo que venha reduzindo os números de casos nos últimos anos (DATASUS, 2023). A infecção por *T. gondii* também se apresenta com alta prevalência nesta região, principalmente nos indivíduos em situações socioeconômicas mais baixas (Bahia – Oliveira., 2003). A falta de informações na literatura sobre coinfeção *M.leprae* – *T.gondii*, em áreas endêmicas para ambas as doenças infecciosas, como ocorre em Campos dos Goytacazes, gerou um interesse de mais pesquisas sobre o assunto e se há relação da infecção por *T.gondii* e a infecção por *M.leprae*, principalmente após nosso grupo encontrar uma relação de risco entre a infecção por *T.gondii* e o desenvolvimento da hanseníase, em especial na forma severa (Oliveira et al., 2019).

Nesse estudo de maneira especial foi possível observar uma predominância de indivíduos do sexo masculino (69,4%) em relação ao sexo feminino (**Tabela 2**). Esses dados são corroborados pela Organização Mundial da Saúde, que mostra que apesar da infecção por *M. leprae* afetar ambos os sexos, indivíduos do sexo masculino são mais frequentemente afetados que o sexo feminino. Esse predomínio é explicado pela maior exposição ao bacilo e pelo menor cuidado dos indivíduos do sexo masculino com a saúde, o que retarda o diagnóstico e aumenta o risco para o desenvolvimento de incapacidades físicas (Nobre et al., 2017).

Em relação a forma clínica foi possível observar que uma grande parcela dos indivíduos participantes apresentou a forma clínica multibacilar em comparação a forma clínica paucibacilar. Esses resultados corroboram com os dados publicados pelo Ministério da Saúde (2017) que demonstra que a forma clínica multibacilar é a forma mais transmissível e mais comum de ser encontrada entre os pacientes devido à alta carga bacilar. O Ministério da Saúde em 2020 também mostrou que no ano de 2019 78,2% dos casos diagnosticados e notificados com hanseníase foram classificados como multibacilares. Separando esses indivíduos segundo a classificação de Madri, a forma dimorfa apresentou as maiores taxas de prevalência entre os portadores da hanseníase, números relativamente maiores que a forma tuberculóide e virchowiana. Da mesma forma que nossos dados se apresentaram.

As análises sorológicas de IgG anti-STAg revelaram uma alta prevalência da infecção por *T. gondii* em pacientes portadores de hanseníase (82,6%) com maior soroprevalência em pacientes virchowianos (LL) (100%), seguidos por pacientes dimorfos (DL) (84,3%), tuberculóides (TT) (58,8%) e indeterminados (IDL) (50%) (**Tabela 3**). Esses dados corroboram com os dados encontrados por Oliveira e colaboradores (2019) onde 74,9 % dos indivíduos infectados por *M.leprae* apresentaram sorologia positiva para a infecção por *T.gondii* no município de Campos dos Goytacazes. Em especial a forma mais severa da doença, a virchowiana, que apresentou uma sorologia positiva para 88,6% dos indivíduos analisados (Oliveira et al.,2019).

A infecção por *T.gondii* é mais disseminada em regiões quentes, úmidas e de menor altitude, e a população de gatos, hospedeiros definitivos do parasita, é importante para o aumento das chances de infecção da população geral (Frenkel,1996). As mais importantes fontes de infecção para o ser humano são a ingestão de cistos contidos na carne crua ou mal-cozida, a ingestão de oocistos presentes na terra e/ou areia e/ou água contaminadas com fezes de gatos infectados e a via transplacentária, quando a mulher adquire a infecção durante a gestação. Aqui. no Brasil encontramos as condições ideais para que a toxoplasmose ocorra. A

infecção é associada a pobreza devido seus números elevados de prevalência a população de baixo poder aquisitivo (Carellos,2002). A questão socioeconômica estabelece que populações com baixo poder aquisitivo se encontrem em uma situação de alto risco de infecção pelo *T. gondii* por viverem em péssima condição sanitária o que favorece a contaminação ambiental (Jones & Dubey, 2010).

A infecção por *M.leprae* é reconhecida como uma das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) pela Organização Mundial da Saúde por atingir principalmente as comunidades mais carentes e indivíduos de baixa renda (OMS, 2010; OPAS; WHO, 2009). Ainda que seja uma doença tratável, acomete muitas pessoas em todo o mundo e pode causar incapacidades físicas que acaba aumentando o estigma social (Sun e Amon, 2018).

A baixa escolaridade, a falta de saneamento básico, o elevado número de pessoas por domicílio, e a baixa renda são alguns dos fatores correlacionados com a persistência da endemia em alguns territórios, sugerindo que esses fatores poderiam estar aumentando a incidência da doença (Chaptini et al.,2015; Kerr-Pontes et al., 2006; Nery et al., 2019; Simionato de Assis et al., 2018; Souza et al., 2021).

Dessa maneira nesse estudo avaliamos por meio de questionários socioeconômicos as condições vividas pelos indivíduos portadores da hanseníase no momento do diagnóstico clínico, independentemente de serem positivos ou não para *T.gondii*. Mas, como observado após a análise sorológica para *T. gondii*, a maioria dos indivíduos com hanseníase também eram infectados por *T. gondii* e ambas as infecções estão relacionadas a condições sanitárias mais precárias.

Dentre a população geral estudada não houve relação significativa entre a positividade para ambas as doenças e o grau de escolaridade, entretanto é possível observar que a maioria dos indivíduos acometidos por ambas as doenças têm apenas o ensino fundamental incompleto (**Tabela 4**). Esses dados vão de encontro ao estudo realizado por Nery e colaboradores (2019), que achou uma associação direta entre o percentual de incidência da hanseníase e as condições socioeconômicas e demográficas, sendo até duas vezes maiores em populações com menor renda e escolaridade.

Foi realizado uma comparação entre as raças dos indivíduos participantes do estudo e a renda familiar. Foi possível observar que a maioria dos indivíduos independente da raça apresentavam renda de até um salário-mínimo. Alguns estudos têm mostrado que as políticas públicas que visam aumentar a renda dessa população, como o programa social Bolsa Família, têm apresentado um impacto muito positivo na redução das taxas de detecção das infecções

(NERY et al., 2014). Isso pode ser explicado pelo fato de o aumento da renda familiar possibilitar acesso a recursos antes escassos para esses indivíduos, como melhorias no saneamento básico, alimentação adequada e melhores condições habitacionais (Feenstra et al., 2011; Kerr-Pontes et al., 2006; Rasella et al., 2013).

Uma análise relacionando a ingestão de água não filtrada e sorologia positiva para *T. gondii* foi realizada. Não foi possível encontrar significância estatística, entretanto foi possível perceber que a maioria dos indivíduos positivos para a infecção por *T. gondii* haviam ingerido água não filtrada em algum momento da sua vida e alguns dos indivíduos que responderam não e mesmo assim apresentaram sorologia positiva ingeriu água de rios e córregos próximo a sua casa (Dados não mostrados). Esses dados são sustentados pelo trabalho publicado por Bahia-Oliveira e colaboradores (2003) que demonstram que a ingestão de água de poço e de água não filtrada foi considerada um fator de risco para as populações de maior prevalência, sendo que 100% dos indivíduos que relataram ingerir água de rios, lagos e lagoas apresentaram-se como soropositivos para a toxoplasmose.

Com relação ao tipo de abastecimento de água e a infecção por *T. gondii* não obtivemos resultados significativos, mas é possível perceber que a maioria dos indivíduos que apresentam sorologia positiva utilizam água do poço artesiano. Ao analisarmos sobre a localidade desses indivíduos foi possível perceber que a maioria deles moram na zona rural que é caracterizada pela ausência de abastecimento público de água. Esses resultados se assemelham ao encontrado do Bahia-Oliveira e colaboradores (2003) nessa mesma região, uma maior prevalência para a infecção por *T. gondii* foi encontrada na zona suburbana e rural sugere que os fatores de risco de infecção devem ser maiores nestes locais. Esse aumento no número de casos nesse local se deve a maior exposição dos indivíduos da zona rural a *T. gondii*, devido às suas atividades relacionadas à terra, portanto com maior exposição aos oocistos.

Também foi comparado o sistema de esgotamento sanitário dos indivíduos participantes do estudo. Foi possível observar que a maioria deles utilizam a fossa. Foi relatado em um estudo realizado por Bueno (2023), que a indisponibilidade de água canalizada, coleta de lixo, e acesso à rede de esgoto estavam associadas ao risco epidemiológico da hanseníase por meio de autocorrelação espacial global bivariada. O mesmo cenário foi relatado por Vieira (2015), para a infecção por *T. gondii* que pode estar associada a ausência de abastecimento público de água, ausência de coleta de lixo e rede de esgoto.

Nossos dados, mesmo não apresentando uma significância estatística, sugerem que a soropositividade da infecção por *T. gondii* e por *M. leprae* pode estar diretamente relacionada as

condições de moradia, indicando a importância da infraestrutura básica e serviços públicos na prevenção e controle de ambas as infecções. Estudos relatam que a indisponibilidade de água canalizada e acesso à rede de esgoto podem estar associados a condições precárias de vida, saneamento inadequado, e falta de acesso a cuidados de saúde, o que contribui para um maior risco de transmissão e adoecimento por hanseníase (Neri e Soares, 2002, Alvarado-Esquível et al., 2008).

A primeira linha de defesa contra *M. leprae* é a resposta imune inata, sendo vista como um fator essencial para o desenvolvimento de uma resposta contra o bacilo, por possuir componentes efetores essenciais para combater o patógeno e é capaz de direcionar a imunidade adaptativa (Modlin, 2010).

A resposta imune contra o *T. gondii* é individual, complexa e compartimentalizada (Filisetti & Candolfi, 2004). Ocorre um delicado equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro, que tenta a todo custo eliminar o parasito, e as estratégias de evasão imune ou imunomodulação provocadas pelo parasito, que permitem a sobrevivência final de ambos.

Nos nossos dados mostramos que, os indivíduos coinfectados apresentaram uma marcada redução de linfócitos quando comparados aos controles saudáveis (**Figura 1**), o que sugere que a baixa nos números de linfócitos circulantes nesses indivíduos poderia estar direcionando uma resposta imunológica deficiente.

Células T com fenótipo CD4⁺, são reconhecidas como T-indutoras ou T-auxiliares, que ao serem ativadas por antígenos que são expressos na ocasião das moléculas do MHC de classe II, liberam citocinas do tipo IL-2 e IFN- γ , essenciais para proliferação de linfócitos e ativação de macrófagos respectivamente, estimulando uma resposta imune celular competente. Estas células estão presentes em grande quantidade em lesões tuberculóides diferentemente do que ocorre em lesões lepromatosas (Modlin et al., 1984).

No contexto da infecção por *T. gondii* as células T CD4⁺ são fundamentais na resistência ao patógeno, sendo seu principal papel na regulação da resposta imune. Israel e colaboradores (1988) mostram que o surgimento da toxoplasmose grave é simultâneo ao declínio do número de células T em pacientes infectados com HIV, e já foi demonstrado em modelos utilizando camundongos, que o aumento da susceptibilidade durante a fase crônica está associado com a deficiência de células T CD4⁺ (Johnson & Sayles, 2002).

Nossos dados mostram que no contexto *ex-vivo*, indivíduos que apresentam ambas as infecções (*T.gondii/M.leprae*) possui uma marcada redução do número dessas células comparados a indivíduos infectados para *M.leprae*, especialmente a forma MB (**Figura 4**). Esse

dado mostra que no contexto da coinfeção, *M.leprae* estaria conduzindo a resposta imunológica nesses indivíduos.

A infecção por *M. leprae* gera o desenvolvimento de uma resposta imune celular exacerbada, o que tem sido mostrado em estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ao longo dos últimos anos (Mendonça et al., 2008). As citocinas e moléculas relacionadas com a resposta imune parecem desempenhar um papel de grande importância em decidir o resultado das interações patógeno-hospedeiro nas diferentes formas clínicas da hanseníase. O balanço *Th1/Th2* parece ser fator determinante para a forma clínica a ser desenvolvida (Sasaki et al., 2001).

Na infecção por *T.gondii* a imunidade celular é o componente chave na resistência do hospedeiro e citocinas no perfil pró-inflamatório são necessárias para a proteção e controle da infecção (Sturge et al.,2014).

Nesse estudo foram analisadas as dosagens das citocinas IL-12, TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-10 e IL-8 em sobrenadantes de cultura de pacientes infectados ou não por *M.leprae/T.gondii* e reestimulados antígenicamente com *M.leprae/T.gondii*.

A IL-12 é o principal mediador da resposta imune natural inicial a patógenos intracelulares e é um indutor essencial da imunidade mediada por células. Possui grande importância na iniciação da sequência de respostas que envolvem macrófagos, células NK e linfócitos T, que resulta na erradicação de microrganismos intracelulares (Vignali et al., 2012). Em nossos dados foi possível observar que os sobrenadantes de cultura de indivíduos soronegativos para toxoplasmose não tiveram uma produção aumentada (**Figura 5C**), diferentemente do que ocorreu nos sobrenadantes de cultura dos indivíduos soropositivos para toxoplasmose e positivos também para a infecção por *M.leprae*, na reestimulação com antígenos de *T.gondii* e *M.leprae* (**Figura 5A**), nesse caso ocorreu um aumento na dosagem de IL-12 e de maneira específica nos indivíduos que apresentavam forma MB (**Figura 5B**) mesmo não apresentando significância estatística .

A ausência de IL-12 justifica um predomínio da resposta *Th2*, entretanto nos nossos dados observamos que indivíduos que possuem a forma MB estão produzindo IL-12 sob estímulo de *T.gondii* em concentrações superior ao esperado, visto que as formas multibacilares são conhecidas por apresentarem uma padrão de resposta imune *Th2*. Dessa forma, esses resultados sugerem que a infecção por *T.gondii* estaria modulando a dosagem dessa citocina em um momento de reestimulação. Coinfecções entre hanseníase e Leishmaniose apesar de pouco frequente já foi relatado na literatura, tendo encontrado características clínicas dos

coinfectados distintas aos casos não coinfectados indicando que este coparasitismo provoca uma resposta imune específica para conter ambas as doenças (Fróes et al., 2023). Um estudo de relato de caso, de uma paciente coinfectada com leishmaniose mucocutânea que tem o perfil Th1 e hanseníase virchowiana que possui uma resposta predominante do tipo Th2, ao analisar a proliferação celular e produção de citocinas foi visto que IL-10, TNF- α e IL5 produziram níveis comparáveis a ambos os estímulos, diferente de IFN- γ que apresentou níveis mais altos quando estimulados com leishmania e quase nulos com *M. leprae*, sugerindo que mecanismos diferentes influenciam o desfecho clínico de cada infecção (Matos et al., 2005). Neste trabalho, apesar de não termos dosado IFN- γ , a citocina IL-12 foi avaliada, componente chave para a diferenciação de perfil Th1, e observamos de maneira similar uma dosagem mais elevada nos indivíduos coinfectados da forma clínica MB estimulados por *T.gondii*.

TNF é outra citocina do perfil Th1. Ela é produzida principalmente por macrófagos, células T estimuladas por antígeno, células NK e mastócitos. É essencial para a formação e manutenção dos granulomas (Simon et al., 2011). Já foi relatado que na hanseníase, TNF- α aumenta a resposta inflamatória no local da lesão, atua no controle da replicação do bacilo e contribui para a ocorrência de formas clínicas mais brandas da doença e menor número de lesões (Sousa et al., 2017). Essa citocina atua em sinergismo com IFN- γ para potencializar a atividade microbicida das antígeno APCs (Denkers et al., 2004).

Neste estudo observamos uma dosagem elevada de TNF- α no sobrenadante de cultura dos indivíduos coinfectados (*M.leprae/T.gondii*) (**Figura 6A**) comparado a indivíduos infectados por *T.gondii*, infectados por *M.leprae* e controles saudáveis. Novamente esses dados sugerem que a presença previa da infecção por *T.gondii* nos indivíduos estaria modulando a produção de citocinas após a reestimulação, visto que concentrações mais altas de TNF- α são encontradas em indivíduos soropositivos para toxoplasmose. Entretanto não foi possível encontrar uma significância estatística

Já a citocina IL-1 atua em conjunto com o TNF- α na imunidade natural e na inflamação (Cruvine et al., 2010). Sua produção pelos fagócitos mononucleares é induzida por produtos bacterianos e citocinas. Seus efeitos são semelhantes aos do TNF- α e dependem da quantidade produzida. Em baixas concentrações possui o efeito de mediador local, aumentando a adesão de leucócitos ou endotélio. Em grandes quantidades tem efeito endócrino, induzindo febre e síntese de proteínas da fase aguda pelo fígado (Kauffman et al., 1986).

A análise de produção de IL-1 β em culturas de PBMC dos indivíduos participantes do estudo, demonstrou que em uma situação de reestimulação os indivíduos coinfectados apresentam uma dosagem significativamente maior dessa citocina comparado aos indivíduos infectados por *T.gondii* (**Figura 7A**). Dentro do mesmo grupo essa significância permaneceu entre os coinfectados não estimulados antígenicamente e estimulados para ambos os patógenos (**Figura 7A**). Foi possível observar ao separar esses indivíduos em formas clínicas que esse aumento estava relacionado aos indivíduos PB, mesmo não apresentando resultados significativos (**Figura 7B**). Entretanto mesmo não apresentando um resultado significativo os indivíduos monoestimulados por *M.leprae* também apresentaram uma dosagem mais alta dessa citocina (**Figura 7C**), mostrando que no contexto dessa citocina *T.gondii* não estaria modulando a produção dessa citocina.

Quando comparamos as formas clínicas da hanseníase nos indivíduos infectados para *M. leprae*, observamos uma produção aumentada em PB e diminuída em MB (**Figura 7D**). Esses dados sugerem uma modulação contrária na produção de IL-1 β por *T. gondii* e *M. leprae*, visto que pacientes multibacilares tem uma resposta predominantemente do tipo *Th2* e na ausência de infecção prévia por *T. gondii* foi visto um aumento da citocina pró inflamatória IL-6, sugerindo uma modulação negativa por *M. leprae*. Enquanto na infecção prévia por *T. gondii*, indivíduos multibacilares (**Figura 7 B**) tiveram um leve aumento da citocina, sugerindo uma modulação positiva por *T. gondii*.

A IL-6 é uma citocina que exerce propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Foi reconhecida pela primeira vez por sua propriedade de induzir a produção de anticorpos e, portanto, o elevado níveis dessa citocina pode ter alguma influência sobre o aumento dos anticorpos que caracteriza o pólo virchowiano da hanseníase (Ochoa et al., 1996; Mihara et al., 2012). Em toxoplasmose foi visto que camundongos deficientes em IL-6 foram mais susceptíveis a infecção por *T. gondii* e esses animais apresentaram ineficiente neutrofilia durante a infecção (Jebbari et al.,1998). Um outro estudo mostrou que IL-6 possui relação com o controle da proliferação exacerbada do parasita durante a fase aguda da infecção e no controle do desenvolvimento de encefalite toxoplasmica no modelo murino (Suzuki et al.,1997).

Observamos nesse estudo que os indivíduos coinfectados apresentaram uma dosagem significativamente maior de IL-6 nas culturas de PBMC reestimuladas antígenicamente por ambos os patógenos em comparação aos indivíduos infectados por *T.gondii* , *M.leprae* e controles saudáveis. Esse aumento foi significativamente maior nas culturas estimuladas apenas com *T.gondii* e ainda maior nas culturas estimuladas por ambos os patógenos (**Figura 8A**).

Mostrando que mais uma vez *T.gondii* estaria modulando a produção dessa citocina nesses indivíduos. Ao estratificarmos se esse aumento estava relacionado com alguma forma clínica, foi possível observar que esse aumento estava mais característico nos MB (**Figura 8B**) mas os pacientes PB também tiveram um aumento da dosagem dessa citocina em todos os poços estimulados antígenicamente.

A IL-8 é uma interleucina produzida por linfócitos Th2 e, assim como outras citocinas desse perfil, suprime a atividade macrofágica (Kirkaldy et al.,2003). Possui a habilidade de recrutar neutrófilos, monócitos e linfócitos T para o sítio de infecção microbacteriana (Foss.,1997). Em hanseníase foi visto uma maior expressão de IL-8 em monócitos de lesões de hanseníase virchowiana, comparadas com pele normal (Kirkaldy et al.,2003).

Em nossas análises não foi possível observar uma significância estatística, entretanto observamos uma diminuição das dosagens de IL-8 em culturas de PBMC de pacientes infectados por *T.gondii* reestimulados antígenicamente por *M.leprae* e *T.gondii* comparado aos controles não estimulados antígenicamente (**Figura 9A**). Aqui, é interessante frisar que nos controles saudáveis e indivíduos infectados por *M.leprae*, especificamente da forma MB (**Figura 9D**) a produção de IL-8 foi maior comparada aos outros grupos mesmo não apresentando significância estatística. Esses resultados daria um indicio que no contexto dessa citocina *M.leprae* estaria modulando a produção, principalmente por ser uma citocina que está associada a forma mais severa da hanseníase. Hasan e colaboradores (2004) demonstrou que os monócitos de indivíduos portadores da forma clínica virchowiana da hanseníase expressaram espontaneamente níveis elevados de IL-8 e TGF- β mas níveis desprezíveis de TNF- α comparado aos controles saudáveis. Eles sugeriram que na ausência de ativação de IFN- γ e TNF- α , a IL-8 pode assumir um papel fundamental no recrutamento celular em pacientes com hanseníase e infecções por micobactérias disseminadas. Corroborando com os nossos dados aqui apresentados.

A interleucina 10 (IL-10) é um inibidor de macrófagos e células dendríticas ativadas e é conhecida por inibir a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas (Aagaard et al, 2006). Essa citocina é capaz de inibir a produção de IFN- γ por células T e NK através da supressão da produção de citocinas, tais como, IL-1, TNF α e IL-12 por macrófagos.

Neste trabalho, essa citocina apresentava dosagens significativamente mais altas nos sobrenadantes de culturas de PBMC de indivíduos coinfectados reestimulados antígenicamente com ambos os patógenos comparados com os sobrenadantes não estimulados antígenicamente (**Figura 10A**). Ao estratificarmos os indivíduos segundo a classificação operacional da

hanseníase foi visto que esse aumento estava relacionado a ambas as classificações, mas uma dosagem mais alta nos indivíduos da forma MB (**Figura 10B**). Foi visto em estudo que na ausência de IL-10, os níveis séricos de IFN- γ e IL-12 encontraram-se aumentados e camundongos tornaram-se susceptíveis a infecção e morreram precocemente durante a fase aguda da infecção por resposta inflamatória intensa (Neyer et al., 1997 e Suzuki, 1999). Dessa maneira, essa citocina estaria sendo produzida em dosagens um pouco mais elevadas por estar regulando as outras citocinas importantes para a resposta *Th1*. Foi visto em um estudo de relato de caso de um paciente coinfestado com hanseníase da forma vichorwiana e Leishmaniose Mucosa, duas formas polares opostas dessas doenças, que em culturas de PBMC, durante a hanseníase ativa, os antígenos de *M. leprae* induziam a supressão das respostas de IFN- γ ao antígeno *Leishmania braziliensis*, e essa supressão foi eliminada por anticorpos anti-IL-10 neutralizantes. E esse efeito supressor foi perdido após a cura da hanseníase e o desaparecimento desse efeito foi acompanhado pelo agravamento das lesões da leishmaniose mucosa. Esses resultados indicam que a hanseníase induziu uma resposta regulatória mediada por IL-10 que poderia ter controlado a imunopatologia da leishmaniose mucosa, demonstrando que, no contexto desta coinfecção, a resposta imune a um patógeno pode influenciar a resposta imune do outro patógeno e ao curso clínico da infecção causada por ele (Azevedo- Colinho et al., 2012). No nosso trabalho nos vimos que a infecção previa por *T.gondii* estava modulando a dosagem de IL-10 nos pacientes coinfestados aumentando essa citocina nos sobrenadante de cultura estimuladas antigenicamente, principalmente nos indivíduos MB. Dessa forma seria interessante ressaltar que os indivíduos participantes do estudo deveriam ser acompanhados para verificar sua evolução clínica tanto com curso da hanseníase como no da toxoplasmose. Estudos paralelos no nosso grupo estão sendo realizados para avaliação de lesão ocular para ambas as doenças.

É importante ressaltar que esse foi o primeiro trabalho que investiga a modulação da resposta imune frente as co-infecções causadas por *T.gondii*/*M.leprae* no município de Campos dos Goytacazes. Em trabalhos anteriores foi visto que a infecção por *T.gondii* era um fator de risco para o desenvolvimento da hanseníase principalmente na sua forma mais severa (Oliveira, 2019). Dessa maneira, hipotetizamos que a associação da infecção por *T.gondii* com a gravidade da hanseníase provocaria uma imunomodulação do sistema imunológico no indivíduo portador de hanseníase. A partir dos nossos dados preliminares podemos constatar que de fato *T.gondii* provoca uma imunomodulação nos indivíduos hansenicos, retirando o paciente MB do estado de anergia com a elevação da produção de citocinas pró-inflamatórias

como IL-12, TNF- α e IL-1 β . Dessa forma com esse estudo, conseguimos trazer um melhor entendimento no contexto da coinfeção (*M.leprae/T.gondii*) mostrando que ocorre uma mudança no perfil inflamatório dos pacientes coinfectados quando estimulados por *T.gondii*.

Nesse estudo, apesar de preliminar, encontramos algumas limitações como a falta das citocinas IFN- γ e IL-4, inflamatória e anti-inflamatória, respectivamente. Citocinas essas que são marcantes no contexto de ambas as doenças na modulação do sistema imune. Além disso, o número de amostras selecionados para análises de citocinas foi reduzida devido a quantidade de testes do Kit CBA, sendo assim, o aumento da amostragem a ser analisada trará uma melhor compreensão da imunomodulação no contexto da coinfeção *T. gondii/M. leprae*.

Uma outra limitação desse estudo, foi que, não avaliamos a presença de outros parasitas intestinais nos indivíduos participantes do estudo, não podendo assim descartar o papel da resposta imune contra outros parasitas que poderiam desencadear componentes da resposta imune Th-1 ou Th-2. Visto que, coinfeções com *M.leprae* e helmintos são comuns em regiões onde as infecções por helmintos são endêmicas e transmitidas pelo solo (Fróes et al., 2023). Um estudo retrospectivo realizado no Brasil mostrou uma forte associação entre helmintos intestinais e hanseníase virchowiana (Diniz et al., 2010).

8- CONCLUSÃO

- Foi possível observar uma predominância na infecção por *M.leprae* em indivíduos do sexo masculino (69,4%) em relação ao sexo feminino;
- As análises sorológicas IgG anti-STAg revelaram uma alta prevalência da infecção por *T. gondii* em pacientes hansênicos (82,6%) com maior soroprevalência em pacientes virchowianos (LL) (100%) seguidos por pacientes dimorfos (DL) (84,3%) tuberculóides (TT)(58,8%) e indeterminados (IDL) (50%);
- Foi observado que mais de 50% dos indivíduos participantes não possuem sistema de esgotamento sanitário nas suas residências e baixa escolaridade;
- Dentre a população geral estudada não foi encontrada uma significância estatística entre as condições sanitárias vividas e o desenvolvimento de ambas as infecções.
- Foi visto que no contexto *ex-vivo*, indivíduos coinfectados possuem uma marcada redução do número de células TCD4⁺ comparados a indivíduos infectados por *M.leprae*, especialmente a forma MB;
- A infecção previa por *T.gondii* parece modular a produção de IL-12, IL-10 e IL-6 na cultura de PBMC de indivíduos coinfectados;
- Indivíduos previamente infectados por *T.gondii* apresentam uma aumento na produção de TNF- α quando comparados com pacientes infectados para *M.leprae* em cultura de PBMC e apresentam um aumento ainda maior quando coinfectados estimulados por *M.leprae*, sugerindo que a infecção previa por *T.gondii* modula a produção de TNF- α em pacientes com hanseníase.
- A modulação da produção de IL-1 β é contrária *M.leprae/T.gondii*, sugerindo a modulação negativa da produção de IL-1 β por *M.leprae* e a modulação positiva por *T.gondii*;

- Em IL-8 foi visto que a infecção previa por *M.leprae* modula positivamente a produção dessa citocina. Visto que, indivíduos infectados por *M.leprae* produzem um dosagem elevada dessa citocina no sobrenadante de cultura e indivíduos infectados por *T.gondii* e coinfectados reestimulados apresentam uma dosagem diminuída;

9- REFERÊNCIAS

Aagaard-Tillery, K. M.; Silver, R.; Dalton, J. Immunology of normal pregnancy. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, Amsterdam, v. 11, p. 279-295, 2006

Abulafia, J, R.A. Vignale Leprosy: pathogenesis updated *Int. J. Dermatol.*, 38; pp. 321-334; 1999.

Alvarado-Esquivel, C. et al. Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in waste pickers and waste workers in Durango, Mexico. *Zoonoses Public Health*, v. 55, n. 6, p. 306-12, Aug 2008.

Amaral, E.P. Análise Espacial da Hanseníase na Microregião de Almenara – Minas Gerais: Relações entre a situação epidemiológica e as condições socioeconômicas. 2008.89p. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

Amato Neto et al., *Toxoplasmose*. 4ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 154p.

Amorim, FM. Papel das células B e dos anticorpos na patogênese da hanseníase e das reações hansênicas. Tese de doutorado- Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. 2017.

Araújo, M. G.; Resumo, A. Hanseníase no Brasil *Leprosy in Brazil*. v. 36, n. 3, p. 373–382, 2005.

Azeredo-Coutinho RB, Matos Dc, Nery Ja, Valete-Rosalino Cm, Mendonca SC. Interleukin-10-dependent down-regulation of interferon-gamma response to *Leishmania* by *Mycobacterium leprae* antigens during the clinical course of a coinfection. *Braz J Med Biol Res* 2012; v 45, p. 632–636; 2012.

Bahia-Oliveira Lm, Silva Ja, Peixoto-Rangel Al, Boechat Ms, Oliveira Am, Massara CL, et al. Host immune response to *Toxoplasma gondii* and *Ascaris lumbricoides* in a highly endemic area: evidence of parasite co-immunomodulation properties influencing the outcome of both infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104, p.273–280, 2009

Bahia-Oliveira, L.M., Jones, J.L., Azevedo-Silva, J., Alves, C.C., Orefice, F., ADDISS, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* v.9, p. 55–62, 2003.

Barbosa, H.S., Muno, R.M., And Moura, M.A. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii; O Ciclo Evolutivo*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, p. 33 - 45.

BARBOSA, H.S., MUNO, R.M., And MOURA, M.A. *Toxoplasmose & Toxoplasma Gondii; O Ciclo Evolutivo*. Rio De Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, P. 33 – 45

Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 96 (Suppl 1), p.205 – 215, 2002.

Biedermann, T. Et Al. TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell Mediated Immune Responses of the Skin. *JID Symposium Proceedings*, v. 9, n. 1, p.5-14,

2004

Bliss Sk, Gavrilescu Lc, Alcaraz A, Denkers Ey. Neutrophil depletion during Toxoplasma gondii infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. Infect Immun. 2001 Aug;69(8):4898-905

Bonfioli AA, Orefice F. Toxoplasmosis. Semin Ophthalmol. v.20(3), p:129-41, 2005.

Brasil. LEI No 9.010, DE 29 DE MARÇO DE 1995. Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9010.htm>. Acesso em: dezembro de 2023.

Brasil. Ministério Da Saúde. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. - N° especial – 2021

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: DNDS/NUTES.1960

BRASIL. Ministério Da Saúde. Doenças Infecciosas E Parasitárias, Guia De Bolso. Secretaria De Vigilância Em Saúde. 8. Ed. Rev. – 2010

Brasil. Ministério Da Saúde. Saúde de A a Z. Hanseníase. Publicado em 20/11/2020 16h01 Atualizado em 15/09/2021 10h30. Acessado em: 20 de março de 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hanseniaze>>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos estratégicos em Saúde. Portaria SCTIE/ MS nº 67, de 7 de julho de 2022. Torna pública a decisão de aprovar, no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2007

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2002

Brasil. Ministério da Saúde.(2010). Doenças infecciosas e parasitárias : guia de bolso,Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8. ed. – Brasília

Bueno, I. C. Risco de adoecimento por hanseníase no estado de Minas Gerais. 2023. 150f. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.

Carvalho Btc, Nudelman V, Carneiro-Sampaio Mms. Mecanismos de defesa contra infecções. J Pediatr 1998, 74 (1): 3-11

Castro, F. C., Castro, M.J., Cabral, A. C., Filho, G. B., Vitor, R. W.A., Lana, A. M., Andrade, G. M. Comparação dos métodos para diagnóstico da Toxoplasmose congênita. Ver. Bras. Ginecol. Obstet. 23 jun. 2001

Chaptini, C.; Marshman, G.; Centre, F. M. Leprosy : a review on elimination , reducing the disease burden , and future research. *Leprosy Review*, v. 86, p. 307–315, 2015.

Contreras, M. D.; Sandoval, M. L.; Salinas, P.; Muñoz, P.; Vargas, S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y cronica. *Boletín Chileno de Parasitología*, v. 55, n. 1/2, p. 1-10, 2000.

Cruz Rcs, Cunha Mgs, Vásquez Fg. Prevalência de anticorpo anti PGL-1 em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase. *CadSaude Publica*. v. 17(1), p.261-71; 2008.

Datasus/SINAN(2023)

De Moura, L. et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*, v. 12, n. 2, p. 326-9, Feb 2006.

De Sousa Jr, Sotto Mn, Quaresma Jas. Leprosy as a complex infection: Breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. *Front Immunol*. 2017;8(NOV):18–21.

Desmonts, G.; Couvreur, J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med*, v. 290, n. 20, p. 1110-6, May 16 1974.

Diniz LM, Magalhães EF, Pereira FE, Dietze R, Ribeiro-Rodrigues R. A presença de helmintos intestinais diminui as respostas T helper tipo 1 em pacientes com hanseníase tuberculóide e pode aumentar o risco de hanseníase multibacilar. *Clin Exp Immunol*. 2010; 161(1):142–50. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04164.x

Dobrowolski, J. M.; Sibley, L. D. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell*, v. 84, n. 6, p. 933-9, Mar 22 1996.

Dos Reis, Anna Carolina Nunes Ferreira et al. Impacto da pandemia de COVID-19 no cuidado continuado da hanseníase: uma revisão integrativa. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 14, p. e339111436490-e339111436490, 2022.

Dubey Jp. *Toxoplasma gondii*. In S. Baron, R.C. Peake, D.A. James, M.Susman, C.A. Kennedy, M.J.D. Singleton, and S.Schuenke (ed.), *Medical Microbiology*, 5th ed. The University of Texas. [online] 1996; [acesso em 11 dez 2023]. Disponível em: URL: www.ncbi.nlm.nih.gov/books.

Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical of Microbiology Review*. p. 267-299

Eidt, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde Soc*. 13:76-88. 2004.

Feenstra, S. G.; Nahar, Q.; Pahan, D.; Oskam, L.; Richardus, J. H. Recent Food Shortage Is Associated with Leprosy Disease in Bangladesh: A Case-Control Study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 5, p. e1029, 2011.

Filiseti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;

40:71-80

Fonseca Et Al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infectious Diseases of Poverty*, v.6, n.5, 2017

Fontoura JI, Lrm, Borges Cr, Miné Jc. Soroprevalência da toxoplasmose em pacientes HIV reagentes atendidos pelo SAE/CTA. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. ISSN (online): 2448-3877. 2016.

Foss Nt. Immunological aspects of leprosy. *Medicina*, Ribeirão Preto, 30: 335-339, july/sept. 1997.

Frenkel Jk. Toxoplasmose. In: Veronesi R, Focaccia R, editors. *Veronesi: Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 1290-305.

Frenkel, J.K. - *Toxoplasma* in and around us. *Bioscience*, 23: 343-352, 1973.

Fróes LAR Jr, Toma TS, Jachiet M, Rousset L, Poderoso RE, Trindade MAB. Bacterial, fungal and parasitic co-infections in leprosy: A scoping review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2023;17(5):e0011334. Published 2023 May 22. doi:10.1371/journal.pntd.0011334

Gaylord H, Brennan P. J. Leprosy: Antigens and host-parasite interactions. In: Pearson TW (ed) *Parasite Antigens. Toward New Strategies for Vaccines*. Marcel Dekker Inc, New York, p.49- 89, 1986

Gazzinelli R. T., et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. v. 153, n.6, p: 2533–2543, 1994.

Gerbe F, Sidot E, Smyth Dj, Ohmoto M, Matsumoto I, Dardalhon V, et al. . Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* (2016).

Guimaraes, A. C. et al. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the Sao Paulo metropolitan region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 35, n. 6, p. 479-83, Nov-Dec 1993.

Hasan Z, Mahmood A, Zafar S, Khan AA, Hussain R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2004 Mar;72(1):35-44. doi: 10.1489/1544-581X(2004)072<0035:LPWLDH>2.0.CO;2. PMID: 15217317.

Hill D, Dubey Jp. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microb Infect*. 2002; 8: 634-640.

Hill, D., Dubey, J. P. *Toxoplasma gondii*: Transmission, Diagnosis and Prevention, Hugli, T.E.– Complement factors and inflammation: effects of α -thrombin on components C3 and C5. In: *Chemistry and Biology of Thrombin* (eds. Lundblad, R.L.; Fenton, J.W.; Mann, K.G), Ann. Arbor Science Publishers, Inc. Ann. Arbor, Michigan, 1977, p.345-360.

Inagaki, A.D.M.; Schimer, J. Toxoplasmose na gestação. *Revista Científica de enfermagem*, v. 7, n. 22, 2009.

- Innes, E.A., Bartley, P.M., Maley, S.W., Wright, S.E., Buxton, D. Comparative host-parasite relationships in ovine toxoplasmosis and bovine neosporosis and strategies for vaccination. *Vaccine* 25: 5495-5503, 2007.
- Israelski Dm, Remington Js. Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Infect Dis Clin North Am.* 1988; 2(2):429-45.
- Jackson, M.H.; Hutchison, W.M. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv.Parasit.* 1989; 28. 55-105.
- Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *Lancet* 353: 655-660, 1999.
- Janků, J. Pathogenesa a patologická anatomie tak nazvaného vrozeného kolombu žluté skvrany voku normálně velikem a microphthalmickém s nalezem parazitu v sítnici. *Časopis lékařů českých. Cas. Lék. Cesk,* v. 62, p. 1021–1027, 1052–1059, 1081–1085, 1111-111, 1138–1143, 1923
- Johnson Ll, Sayles Pc. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect Immun.* 2002.; 70:185-91
- Jones, J. And Dubey, J. (2010). Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Experimental parasitology*, 124, 10-25.
- Kasahara, T. et al. Interleukin 2-mediated imune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *Journal of Immunology*, v.130, n.4, p.1784-1789, 1983
- Kasper L, Boothroyd J. *Toxoplasma gondii* and toxoplasmosis. In: Warren K, editor. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. Boston, MA: Blackwell Scientific Publications; 1993. pp. 269–301
- Kauffman Ca, Jones Pg, Kuger Mj: Fever an malnutrition: endogenous pyrogen/interleukin-1 in malnourished patients. *Am J Clin Nutr.* 1986; 44:449-52
- Kerr-Pontes, L. R. S.; Barreto, M. L.; Evangelista, C. M. N.; Rodrigues, L. C.; Heukelbach, J.; Feldmeier, H. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: Results of a case-control study. *International Journal of Epidemiology*, v. 35, n. 4, p. 994–1000, 2006.
- Kirkaldy Aa, Musonda Ac, Khanolkhar-Young S, Suneetha S, Lockwood Dn. Expression of CC and CXC chemokines and chemokine receptors in human leprosy skin lesions. *Clin Exp Immunol.* 2003 Dec;134(3):447-53. doi: 10.1111/j.1365-2249.2003.02306.x. PMID: 14632750; PMCID: PMC1808882.
- Kniel, K. E. et al. Examination of attachment and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts on raspberries and blueberries. *J Parasitol*, v. 88, n. 4, p. 790-3, Aug 2002.
- Lago, Eleonor Gastal. Estratégias de controle da toxoplasmose congênita. Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança. Porto Alegre: PUCRS, 2006.
- Lang,C., Gross, U., Luder, C.G. Subversion of innate and adaptive imune responses by

Toxoplasma gondii. Parasitol.Res., 100(2): 191-203,2006,

Lannes-Vieira, J. Resposta Imune na Infecção por Toxoplasma gondii: desafios e oportunidades. In: SOUZA, W., and BELFORT JR., R., comp. Toxoplasmose & Toxoplasma gondii [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, pp. 83-98. ISBN: 978-85-7541-571-9.

Lastória, J. C. & Morgado de Abreu, M. A. M. Leprosy: review of the epidemiological, clínicl, and etiopathogenic aspects – Part 1. An. Bras.Dermatol. 89(2):205-218.2014

Lemaitre M, Watier L, Briand V, Garcia A, Le Hesran Jy, Cot M. Coinfection with Plasmodium falciparum and Schistosoma haematobium: additional evidence of the protective effect of Schistosomiasis on malaria in Senegalese children. Am J Trop Med Hyg. 2014 Feb.

Lemaitre M, Watier L, Briand V, Garcia A, Le Hesran Jy, Cot M. Coinfection with Plasmodium falciparum and Schistosoma haematobium: additional evidence of the protective effect of Schistosomiasis on malaria in Senegalese children. Am J Trop Med Hyg. 2014 Feb;90(2):329-34.

Leser, P.G.; Rocha, L.S.A.; Moura, M.E.G.; Ferreira, A.W.; Comparasion of semiautomatized assays for anti-T. gondii IgG detection in low-reactivity serum samples: importance of the results in patients counseling. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 39, n. 2, p. 107-110, 2003.

Luft Bj, Remington Js. Toxoplasmic encephalitis. Clin Infect Dis. 1992; 15: 211-222.

Lyon, S.; Grossi, M. A. F. Diagnóstico E Tratamento Da Hanseníase In: Alves, E. D.; Ferreira, T. L. F. I. N. Hanseníase avanços e desafios Brasília 1ª ed. Brasília : NESPROM, 2014. Cap. 8, p.141-150

Mabbott Na. The Influence Of Parasite Infections On Host Immunity To Co-Infection With Other Pathogens. Front Immunol. 2018 Nov.

Machado, P.Rl, Araújo, M.I As, Carvalho, L E Carvalho, E M .. (2004). Mecanismos De Resposta Imune Às Infecções. Anais Brasileiros De Dermatologia , 79 (6), 647-662.

Matos DS, Azeredo-Coutinho RB, Schubach A, Conceição-Silva F, Baptista C, Moreira JS, Mendonça SC. Differential interferon- gamma production characterizes the cytokine responses to Leishmania and Mycobacterium leprae antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. Clin Infect Dis. 2005 Jan 15;40(2):e5-12. doi: 10.1086/427069. Epub 2004 Dec 22. PMID: 15655736.

Mendonça, Isael Marcos Silva Et Al. Impacto Da Pandemia De Covid-19 No Atendimento Ao Paciente Com Hanseníase: Estudo Avaliativo Sob A Ótica Do Profissional De Saúde. Research, Society And Development, V. 11, N. 2, P. E4111225459-E4111225459, 2022.

Mendonça, V. A. Immunology Of Leprosy. An Bras Dermatol, V. 83, N. 4, P.343- 350, 2008

Mercadante, L. M. *Et Al.* Leprosy And American Cutaneous Leishmaniasis Coinfection. An. Bras. Dermatol. Vol.93 N.1, P.123-5, 2018.

- Ministerio Da Saúde. Boletim Epidemiológico. Secretaria De Vigilância Em Saúde– 2023
- Ministério Da Saúde. Doenças Infecciosas E Parasitárias: Guia De Bolso, Secretaria De Vigilância Em Saúde, Departamento De Vigilância Epidemiológica. – 8. Ed. - Brasília.2010.
- Ministérioda Saúde. Boletim Epidemiológico. Secretaria De Vigilância Em Saúde. - Volume 49 - N° 4 – 2018
- Ministérioda Saúde. Guia De Vigilância Epidemiológica. Secretaria De Vigilância Em Saúde. –6. Ed. – Brasília.2005
- Misch, E. *Et Al.* Leprosy And The Human Genome. Microbiology And Molecular Biology Reviews: Mmbr, V.74, N.4, P.589-620, 2010.
- Modlin, R. L. Th1- Th2 Paradigm: Insights From Leprosy. Journal Investigative Dermatology, V.102, P.828-832, 1994.
- Modlin, R.L., Hofman, F.M., Horwitz, D.A., Husmann, L.A., Gillis, S., Taylor, C.R., Rea, T.H. In Situ Identification Of Cells In Human Leprosy Granulomas With Monoclonal Antibodies To Interleukin 2 And Its Receptor. J. Immunol., V.132, N.6, P.3085-3090, 1984
- Modlin, Rl. The Innate Immune Response In Leprosy. Curr Opin Immunol. [S. L.], V. 22, N. 1, P. 48-54, 2010, Doi: 10.1016/J.Coi.2009.12.001.
- Montoya Jg, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. V.363, N. 9425, P.1965-1976, 2004.
- Montoya, J. G., Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *Lancet* Vol. 363, No. 9425, 1965-Müller-Eberhard, H.J. – Molecular Organization And Function Of The Complement System. Ann. Ver. Biochem., V.57, P.321-347, 1988.
- Nath, I. Et Al. Immunology Of Leprosy And Diagnostic Challenges. Clinics In Dermatology, V. 33, P. 90–98, 2015
- Nathan C F. Et Al. Local And Systemic Effects Of Intradermal Recombinat Interferon-Gamma In Patients With Lepromatous Leprosy. The New England Journal Of Medicine, V.315, P.6-15, 1986.
- Neri, M.; Soares, W. Desigualdade Social E Saúde No Brasil. Cadernos De Saúde Pública, V. 18, N. Suppl, P. S77–S87, 2002.
- Nery, J. S.; Ramond, A.; Pescarini, J. M.; Alves, A.; Strina, A.; Ichihara, M. Y.; Fernandes Penna, M. L.; Smeeth, L.; Rodrigues, L. C.; Barreto, M. L.; Brickley, E. B.; Penna, G. O. Socioeconomic Determinants Of Leprosy New Case Detection In The 100 Million Brazilian Cohort: A Population-Based Linkage Study. The Lancet Global Health, V. 7, N. 9, P. E1226–E1236, 2019.
- Nicolle C, Manceaux L 1908. Sur Une Infection A Corps De Leishman (Ou Organismes Voisons) Du Gondi. *C R Acad Sci* 147: 736.
- Oliveira, L.R.P., Martins, L.M., Souza, R.D. *Et Al.* Serological Evidence Of *Toxoplasma Gondii* Infection As Potential Risk For The Development Of Lepromatous Leprosy In An

Endemic Area For Both Neglected Tropical Diseases In Brazil. *Infect Dis Poverty* **9**, 19 (2020)

Oms (Organização Mundial Da Saúde). Estratégia Global Para A Hanseníase 2021-2030: Rumo A Zero Hanseníase. Nova Deli: Oms, 2021.

Oms (Organização Mundial Da Saúde). Global Leprosy (Hansen Disease) Update, 2021: Moving Towards Interruption Of Transmission. *Weekly Epidemiological Record*, N. 36, P. 429-450, 9 Set. 2022. Disponível Em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9736-429-450>. Acesso Em: 11 Nov. 2023

Oms. Organizaciónpanamericana De La Salud/Organizacion Mundial De La Salud. Lepra Al Dia: Situacion De La Eliminación De La Lepra Em Algunos Países De La America Latina. Boletíneliminación De La Lepra De Lasameritas, 2021.

Oms. Trabalhando Para Superar O Impacto Global De Doenças Tropicais Negligenciadas: Primeiro Relatório Da Oms Sobre Doenças Tropicais Negligenciadas. Brasília. Organização Mundial Da Saúde, 2010.

Opas; Who. 49th Directing Council: 61st Session Of The Regional Committee. Washington, D.C., Usa. Pan American Health Organization. World Health Organization., 2009.

Pfefferkorn Er. Interferon Gamma Blocks The Growth Of *Toxoplasma Gondii* In Human Fibroblasts By Inducing The Host Cells To Degrade Tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Feb;81(3):908-12.

Pinto, P.G.H.R. O Estigma Do Pecado: A Lepra Durante A Idade Média. *Physis – Revista De Saúde Coletiva*, Rio De Janeiro, V. 5, N. 1, P. 131-144, 1995.

Rasella, D.; Aquino, R.; Santos, C. A. T.; Paes-Sousa, R.; Barreto, M. L. Effect Of A Conditional Cash Transfer Programme On Childhood Mortality: A Nationwide Analysis Of Brazilian Municipalities. *The Lancet*, V. 382, N. 9886, P. 57–64, 2013.

Rey, L. *Parasitologia*. 4º Ed. Rio De Janeiro. Guanabara Koogan, 2008

Ridley, D.S. & Jopling, W.H. Classification Of Leprosy According To Immunity. A Five-Group System. *Int. J. Lep. Other Mycobact*. V. 34, N. 3, P. 255-273. 1966.

Robert-Gangneux, F., Darde, M. L. Epidemiology Of And Diagnostic Strategies For Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, P.264–296, 2012.

Saadatnia G., Golkar M. A Review On Human Toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis*. V.44, P: 805-14, 2012.

Sabin, A. B.; Feldman, H. A. Dyes As Microchemical Indicators Of A New Immunity Phenomenon Affecting A Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science*, V. 108, N. 2815, P. 660-3, Dec 10 1948.

Sales, M. P. Et Al. Genetic Diversity Among *Mycobacterium Bovis* Isolates: A Preliminary Study Of Strains From Animal And Human Sources. *Journal Of Clinical Microbiology*, V.39, N.12, P.4558- 4562, 2001.

Santos, F A; Grzyb, K; Santos, Mba ; Gaio, To; Sanches, Lc. A Historia Da Hanseníase: O Impacto Biológica E Social. Encontro De Bioética Do Paraná – Vulnerabilidades: Pelo Cuidado E Defesa Da Vida Em Situações De Maior Vulnerabilidade. 2, 2011, Curitiba. Anais Eletrônicos Curitiba: Champagnat, 2011, P. 31-41. Disponível Em: [Http://Www.Bioeticapr.Org.Br/](http://www.bioeticapr.org.br/)

Santos, M.B. Et Al. Distinct Roles Of Th17 And Th1 Cells In Inflammatory Responses Associated With The Presentation Of Paucibacillary Leprosy And Leprosy Reactions. *Scandinavian Journal Of Immunology*, V.86, N.1, P.40-49, 2017.

Schnell, Michele - Toxoplasmose Felina - Revisão De Literatura E Soroprevalência De *Toxoplasma Gondii* Em Felinos Domésticos Atendidos No Hospital De Clínicas Veterinárias Da Ufrgs. Originalmente Apresentado Como Trabalho De Conclusão De Curso, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul 2011

Sepulveda-Arias, J. C. Et Al. Toxoplasmosis As A Travel Risk. *Travel Med Infect Dis*, Jun 7 2014.

Simionato De Assis, I.; Arcoverde, M. A. M.; Ramos, A. C. V.; Alves, L. S.; Berra, T. Z.; Arroyo, L. H.; Queiroz, A. A. R. De; Santos, D. T. Dos; Belchior, A. De S.; Alves, J. D.; Pieri, F. M.; Silva-Sobrinho, R. A.; Pinto, I. C.; Tavares, C. M.; Yamamura, M.; Frade, M. A. C.; Palha, P. F.; Chiaravalloti-Neto, F.; Arcêncio, R. A. Social Determinants, Their Relationship With Leprosy Risk And Temporal Trends In A Tri-Border Region In Latin America. *Plos Neglected Tropical Diseases*, V. 12, N. 4, P. E0006407, 2018.

Simon M, Scherlock J, Duthie Ms, Ribeiro De Jesus A. Clinical, Immunological, And Genetic Aspects In Leprosy. *Drug Dev Res*. 2011;72(6):509–27.

Souza, C. D. F. De; Santos, V. S.; Nery, J. S.; Fernandes, T. R. M. De O.; Magalhães, M. De A. F. M. Can The Municipal Social Deprivation Index Influence The Time Trend Of The Leprosy Detection Rate? *Journal Of The Brazilian Society Of Tropical Medicine*, V. 54, P. E20200228, 2021.

Souza, Cs. Hanseníase: Formas Clínicas E Diagnóstico Diferencial. *Medicina, Ribeirão Preto*, 30: 325-334, Jul./Set. 1997.

Sun, N.; Amon, J. J. Addressing Inequity: Neglected Tropical Diseases And Human Rights. *Health And Human Rights*, V. 20, N. 1, P. 11–25, 2018.

Tarique, Mohd & Saini, Chaman & Naz, Huma & Ali, Raza & Khan, Faez & Sharma, Alpana. Fate Of T Cells And Their Secretory Proteins During The Progression Of Leprosy. *Current Protein And Peptide Science*. 18. 10.2174/1389203718666170829120729. 2017.

Torres, C. M. Morphologie D'un Nouveau Parasite De L'homme, *Encephalitozoon Chagasi*, N. Sp., Observe Dans Un Cas De Meningo-Encephalo-Myelite Congenitale Avec Myosite Et Myocardite. *C R Soc Biol*, V. 97, P. 1787–1790, 1927.

Vignali Da, Kuchroo Vk. Il-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nat Immunol*. 2012;13(8):722-728. Published 2012 Jul 19. Doi:10.1038/Ni.2366

Weinman, D.; Chandler, A. H. Toxoplasmosis In Swine And Rodents; Reciprocal Oral Infection And Potential Human Hazard. Proc Soc Exp Biol Med, V. 87, N. 1, P. 211-6, Oct 1954.

Weiss, L. M.; Dubey, J. P. Toxoplasmosis: A History Of Clinical Observations. Int J Parasitol, V. 39, N. 8, P. 895-901, Jul 1 2009.

Who. Ending The Neglect To Attain The Sustainable Development Goals: A Road Map For Neglected Tropical Diseases 2021–2030. Geneva. World Health Organization, 2020.

Wilder-Smith E Van Brakel, Nerve Damage In Leprosy Its Management. Nature Clinical Practice- Neurology 4,N 12- December 2008.

Zhang Yw, Halonen Sk, Et Al. Initial Characterization Of Cst1, A Toxoplasma Gondii Cyst Wall Glycoprotein. Infection And Immunity. V.69, N.1, P: 501–507, 2001.



ANEXO I
Estado Do Rio de Janeiro
Prefeitura Municipal de Campos dos Goytacazes.
Secretaria Municipal de Saúde- SUS
Programa Municipal de Controle de Hanseníase.



QUESTIONÁRIO PERFIL SOCIOECONÔMICO

DATA:- -----/-----/-----

NOME:- -----

APELIDO: -----

DATA DE NASCIMENTO:- -----/-----/----- **IDADE:-** -----

NATURALIDADE:- -----

FILIAÇÃO: PAI-----

MÃE:- -----

ENDEREÇO:- -----

BAIRRO:- -----

CIDADE:- ----- **ESTADO:-** -----

TELEFONE:

HISTÓRICO DA DOENÇA

FORMA CLÍNICA: _____

CASO REACIONAL: A) SIM B) NÃO

SE SIM DIZER SE TIPO 1 OU 2: _____

CASO NOVO **SIM** **NÃO**

TRATAMENTO **SIM** **NÃO**

PACIENTE É FONTE? **SIM** **NÃO**

CONSANGUÍNEO? **NÃO** **SIM.**

DE QUEM? _____

GRAU DE PARENTESCO: _____

RESULTADO DA BACILOSCOPIA: _____

ESTADO CIVIL: **SOLTEIRO** **CASADO** **VIÚVO** **DIVORCIADO**

UNIÃO ESTÁVEL () OUTRO ()

DEPEDENTE: SIM () NÃO () QUANTOS?-----

COR/ETNIA: NEGRO () BRANO () PARDO () INDÍGENA() AMARELO () OUTRO ()

GRAU DE INSTRUÇÃO:

a)() SEM INSTRUÇÃO E MENOS DE UM ANO

b)() ENSINO FUDAMENTAL INCOMPLETO

c)() ENSINO FUNDAMENTAL COMPLETO

d)() ENSINO MÉDIO INCOMPLETO

e)() ENSINO MÉDIO COMPLETO

f)() SUPERIOR INCOMPLETO

g)() SUPERIOR COMPLETO

SITUAÇÃO SÓCIO ECONÔMICA:

O SENHOR/ SENHORA TRABALHA ATUALMENTE?

SIM () NÃO ()

PROFISSÃO:-----

TRABALHO/OCUPAÇÃO:-----

RENDA FAMÍLIA MÉDIA

() MENOS DE 1 SALÁRIO MÍNIMO

() 1 SALÁRIO MÍNIMO

() 2 SALÁRIOS MÍNIMOS

() MAIS DE 2 SALÁRIOS MÍNIMOS

A FAMÍLIA RECEBE ALGÚM BENEFÍCIO SOCIAL? SIM () NÃO ()

QUAL?-----

SEGURO SOCIAL:

SIM () NÃO ()

QUAL?-----

SITUAÇÃO HABITACIONAL:

TIPO DE HABITAÇÃO: ALVENARIA () MADEIRA () OUTROS ()

**CASA PRÓPRIA () ALUGADA () APARTAMENTO () BARRACÃO () CÔMODO ()
OUTRO ()**

QUANTOS CÔMODOS?-----

QUEM MORA COM VOCÊ?

() SOZINHO () PAI () MÃE () ESPOSA/MARIDO/COMPONHEIRO(a)

() FILHOS () IRMAOS () ESPOSA E FILHOS OUTROS ()

QUANTAS PESSOAS MORAM EM SUA CASA INCLUÍDO VOCÊ? ()

**QUAL O PRINCIPAL MEIO DE TRANSPORTE QUE UTILIZA PARA
CHEGAR AO PROGRAMA?**

A PÉ/ CARONA/ BICICLETA () TRANSPORTE COLETIVO () CARRO PRÓPRIO ()
OUTROS

POSSUI BANHEIRO () SIM () NÃO

O BANHEIRO É DENTRO DE CASA () SIM () NÃO

LUZ ELÉTRICA () SIM () NÃO

QUAL TIPO DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA DE SUA RESIDÊNCIA?

() REDE GERAL DE ABASTECIMENTO/DISTRIBUIÇÃO

() POÇO ARTESIANO

() NASCENTE

() OUTROS

QUAL O SERVIÇO DE ESGOTAMENTO SANITÁRIO DA SUA RESIDÊNCIA?

() SERVIÇO DE REDE COLETA PÚBLICA () MATO () QUEIMADO

() ENTERRADO FOSSA () OUTROS DESTINOS

COMO É A COLETA DE LIXO DA RESIDÊNCIA?

A) () COLETA PÚBLICA - SERVIÇO DE LIMPEZA

B) () JOGADO EM RIO, CÓRREGO OU LAGO

C) () QUEIMADO E) () CAÇAMBA

D) () ENTERRADO F) () OUTRO DESTINO.

QUAL? _____

EXPOSIÇÃO À BEBIDAS (EXCLUINDO LEITE)

NOS ÚLTIMOS 12 MESES QUAL FOI O TIPO DE ÁGUA UTILIZADA NA SUA

CASA? _____

VOCÊ AGORA IRÁ ME RESPONDER SOBRE O QUE VOCÊ TEM BEBIDO E QUAL A QUANTIDADE (NOS ULTIMOS 12 MESES) OK.?

TIPOS DE BEBIDAS	BEBE		QUANTIDADE					NÃO SOUBE RESPONDER
	SIM	NÃO	+ DE 10 COPOS/ DIA	7 A 9 COPOS/ DIA	4 A 6 COPOS/DIA	1 A 3 COPOS/ DIA	MENOS DE 1 COPO/ DIA	
18- ÁGUA FILTRADA (FILTRO DE BARRO OU DE PAREDE)	()	()	()	()	()	()	()	()
19- ÁGUA NÃO FILTRADA	()	()	()	()	()	()	()	()
20- ALGUMA BEBIDA FEITA COM ÁGUA NÃO FILTRADA	()	()	()	()	()	()	()	()
21- ÁGUA DE POÇO	()	()	()	()	()	()	()	()
22- ALGUMA BEBIDA FEITA COM ÁGUA DE POÇO	()	()	()	()	()	()	()	()

NOS ÚLTIMOS 12 MESES VOCÊ BEBEU ÁGUA DIRETAMENTE DE LAGO, RIO OU CÓRREGO?

SIM () NÃO () NÃO SABE ()

AONDE? _____

**NOS ÚLTIMOS 12 MESES VOCÊ BEBEU ÁGUA DIRETAMENTE DA TORNEIRA
("BICA")?**

SIM () NÃO () NÃO SABE ()

AONDE? _____