

## Projeto 58

Caracterização de determinantes imunogenéticos associados ao desenvolvimento de diferentes formas clínicas de hanseníase no Extremo Sul da Bahia

Cód/Nome	58- Caracterização de determinantes imunogenéticos associados ao desenvolvimento de diferentes formas clínicas de hanseníase no Extremo Sul da Bahia
Orientador	Hayana Ramos Lima
Campus	CPF
Area	Atividades acadêmicas (ensino/pesquisa/extensão) - ÊNFASE NA EXTENSÃO
Vagas	2
Email	hayana.lima@ufsb.edu.br

### Resumo do Projeto.

A hanseníase (HN) é uma doença crônica negligenciada, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta uma população economicamente ativa. A região Nordeste tem alta prevalência da doença, sendo a Bahia um dos estados que possui diversas regiões hiperendêmicas, entre elas o Extremo Sul. Apesar da alta infectividade, *M. leprae* apresenta baixa patogenicidade, o que revela que o desenvolvimento da doença é determinado pela modulação da resposta imune (RI) e, portanto, as alterações na expressão gênica influenciam nas diferentes formas de manifestação da doença. Sabe-se que a forma multibacilar da hanseníase está associada a perfil anérgico e anti-inflamatório e à polarização da RI mediada por linfócitos Th2/Treg. A imunidade inata em pacientes multibacilares também apresenta alterações em mecanismos efetores e observa-se o envolvimento de receptores de reconhecimento padrão, como TLR2/4 e NLR (NOD2). O papel dos inflamassomas na hanseníase ainda não é completamente compreendido e recentemente foi descrita a associação de NLRP3 às reações hanseníase e ao perfil Th1/Th17 nas formas paucibacilares, uma vez que a sinalização via NLRP3 converte pró-IL-1 $\beta$  e IL-18 em suas formas ativas. Contudo, outros NLR, como NLRP6 e 12, apresentam papel dual e atuam na regulação da inflamação, ao inibirem NF- $\kappa$ B. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar a expressão de marcadores genéticos da resposta imune que influenciam na fisiopatologia da hanseníase. Para alcançar o objetivo proposto, nós verificaremos, em pacientes diagnosticados com hanseníase, a relação das diferentes formas clínicas da doença com a expressão dos genes NLRP3, 6 e 12, com o padrão de citocinas expresso no

soro desses indivíduos e com resposta sorológica a antígenos protéicos de *M. leprae*. O projeto aqui apresentado será desenvolvido na Universidade Federal do Sul da Bahia (UFSB), em Teixeira de Freitas, com a colaboração de pesquisadores do departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Teixeira de Freitas é referência na prestação de serviços de saúde e de educação no Extremo Sul da Bahia e concentra o atendimento e cuidados em hanseníase nesta área endêmica. A realização deste projeto contribuirá na implantação de uma linha de pesquisa em HN na UFSB, que em curto e médio prazos contribuirão para a melhoria dos serviços de atenção e vigilância em saúde, bem como na formação de recursos humanos qualificados para as demandas do SUS.

#### Atividades dos bolsistas

(1) Organização dos dados dos pacientes recrutados para a pesquisa - espera-se que o/a bolsista desenvolva habilidades de síntese e análise de dados de prontuários (2) Auxílio aos docentes e demais estudantes no planejamento de coleta de amostras - Espera-se que o/a bolsista desenvolva habilidades e competências na condução de experimentos e análise de amostras biológicas; (3) Participação em lab meetings e grupo de estudos em doenças infecciosas - espera-se que o/a bolsista possa desenvolver habilidades cognitivas e pensamento crítico sobre a importância da hanseníase em diferentes campos da saúde e repercussões socioeconômicas dessa doença; (4) participação na organização de evento sobre hanseníase em parceria com a SMS-Teixeira de Freitas - espera-se que o/a bolsista auxilie na organização de evento online com vistas à divulgação científica e treinamento de servidores da rede SUS envolvidos no diagnóstico e tratamento da hanseníase.

#### Atividades semanais

(1) Organização dos dados dos pacientes recrutados para a pesquisa; (2) Auxílio aos docentes e demais estudantes no planejamento de coleta de amostras; (3) Participação em lab meetings e grupo de estudos em doenças infecciosas; (4) participação na organização de evento sobre hanseníase em parceria com a SMS-Teixeira de Freitas.

## 1. Introdução/Apresentação:

A hanseníase (HN) é uma doença crônica negligenciada, causada pelo *Mycobacterium leprae*. A doença tem alta prevalência na região Nordeste e a maioria dos pacientes, ao diagnóstico, é multibacilar (MB) e tem algum grau de incapacidade física. A Bahia possui áreas hiperendêmicas de HN e 16% dos novos casos do estado, em 2019, estavam nos municípios do Extremo Sul (1). Apesar da alta infectividade, *M. leprae* apresenta baixa patogenicidade, o que revela o papel do componente genético para a resistência ou susceptibilidade do hospedeiro. Em pesquisas realizadas por nós (2,3), a resposta imunológica (RI) nas formas multibacilares evidenciou polarização de linfócitos com perfil de ativação Th2/Tregs, padrão anérgico e anti-inflamatório, o que foi confirmado por outros estudos (4). Os mecanismos inatos da RI em pacientes MB apresentam perfil anti-inflamatório e alguns dados apontam o envolvimento de receptores de reconhecimento padrão, como TLR2/4 e NOD2 (5). Recentemente, o inflamassoma NLRP3 tem sido associado às reações hanseníase e ao perfil Th1/Th17 nas formas paucibacilares, uma vez que a sinalização através dessas moléculas converte pró-IL-1b e IL-18 em suas formas ativas (6,7). Contudo, outros NLR, como NLRP6 e 12 apresentam papel dual e atuam na regulação da inflamação, ao inibirem NF-kB (8,9). Reportam-se que polimorfismos de base única em NLRP3 alteram os desfechos clínicos na tuberculose (10, 11) e que o bloqueio dessa molécula favoreceu a sobrevivência de *M. tuberculosis* (12). Em hanseníase, ainda não há dados do

envolvimento de NLRP6 e 12 no curso da doença. Há diversas lacunas na compreensão dos determinantes genéticos de susceptibilidade/progressão e no diagnóstico da HN. Nesse contexto, há a necessidade de condução de pesquisas translacionais que investiguem os aspectos genéticos e contribuam no entendimento da fisiopatologia da doença, com vistas à implementação de estratégias de diagnósticos mais acuradas e sensíveis, o que justifica a escolha de NLRP3/6/12 como alvos envolvidos na patogênese da HN. Uma grande variedade de moléculas é capaz de ativar os inflamassomas. Assim, outra vertente de análise dos desdobramentos da ativação desses receptores na HN inclui investigações sobre a influência da resposta a antígenos de *M. leprae*.

## 2. Justificativa:

O diagnóstico da HN ainda permanece com diversas lacunas e, geralmente, a identificação tardia da doença associa-se a incapacidades físicas nos pacientes, com impactos socioeconômico relacionados à persistência da doença. Dessa forma, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de diagnóstico são necessários, pois impactam nos serviços de vigilância e atenção à saúde. Quanto à contribuição para o aprimoramento e consolidação do SUS, este projeto será executado em Teixeira de Freitas, cidade que se encontra a mais de 800 km de Salvador. Embora seja referência nos serviços de saúde para o Extremo Sul, o município ainda carece de aperfeiçoamento dos serviços ofertados. Em Teixeira de Freitas está localizado o centro de referência para controle da hanseníase, que atende a outros 12 municípios do Extremo Sul da Bahia, o que pode levar a uma subnotificação da doença, reiterando a relevância e necessidade de estudos em hanseníase nesta região. As desigualdades na oferta e na qualidade da atenção em saúde prestada pelo SUS podem ser mitigadas pela atuação conjunta da UFSB com a rede de saúde.

## 3. Objetivo Geral:

Avaliar a expressão de marcadores genéticos da resposta imune que influenciam na fisiopatologia da hanseníase.

.

### 3.1 Objetivos Específicos:

1. Analisar a contribuição genética de NLRP3, 6 e 12 na susceptibilidade à infecção por *M. leprae* em pacientes com diferentes formas de hanseníase;
2. Analisar a expressão fenotípica de NLRP3, 6 e 12 no PBMC de pacientes com diferentes formas de hanseníase;
3. Avaliar o perfil de citocinas dos pacientes com diferentes formas de hanseníase;
4. Avaliar a reatividade de IgG, IgM e IgA dos pacientes utilizando antígenos específicos para *M. leprae* como ferramenta diagnóstica na hanseníase;
5. Identificar regiões polimórficas dos genes NLRP3, 6 e 12;
6. Correlacionar a expressão genotípica e fenotípica de NLRP3, 6 e 12 com a produção de anticorpos específicos frente aos antígenos selecionados, em pacientes diagnosticados com hanseníase e seus contatos domiciliares antes do tratamento com poliquimioterápicos (PQT).

## 4. Metodologia:

O projeto está sob avaliação ética no CEP/UFSB (CAAE 38271020.0.0000.8467). Serão recrutados pacientes diagnosticados com hanseníase (n=65) no centro de referência de HN em Teixeira de Freitas e serão incluídos pacientes com as formas clínicas classificadas em pauci ou multibacilar, mesmo em estados reacionais, segundo os critérios da OMS e do Ministério da Saúde, considerando índice baciloscópico e exame

histopatológico. Serão excluídos os pacientes em retratamento ou que apresentem comorbidades e doenças autoimunes. Serão também recrutados os comunicantes intradomiciliares dos indivíduos selecionados (n=35) e controles saudáveis (n=20). Serão coletadas amostras do sangue periférico e saliva, mantendo a cadeia de biossegurança e controle de risco (como o da COVID-19), a serem armazenadas em microtubos com os respectivos tampões para obtenção de RNA e soro, e mantidos a -80°C até a análise. Para alcançar o objetivo 1, será analisada a expressão genética em amostras de sangue total. As amostras RNA serão extraídas utilizando o kit "Total RNA isolation", conforme com as recomendações do fabricante. Posteriormente, será realizada a síntese de cDNA a partir de 1 µg de RNA total utilizando kit comercial, segundo recomendações do fabricante. Iniciadores específicos para amplificar a região codificadora de cada um dos três genes (NLRP3, NLPR6, NLRP12) foram desenhados utilizando o programa Primer-BLAST (13). A expressão do RNAm dos genes alvo será analisada pela PCR quantitativa. Os produtos da amplificação serão analisados com base no valor de CT (cycle threshold) normalizados em relação a um controle interno (2microglobulina). Para alcançar o objetivo 5, os produtos de PCR serão sequenciados pelo método de Sanger utilizando iniciadores internos. As reads obtidas serão mapeadas nas sequências referência usando o BWA-MEM (14), e analisadas pelo BCFTools (15) para a identificação dos sítios polimórficos (será conduzido na UFMG). Para alcançar os objetivos 2 e 3, o perfil fenotípico do PBMC dos pacientes (que será coletado após separação com gradiente de densidade e congelado com DMSO) será analisado por citometria de fluxo. As concentrações das diversas citocinas inflamatórias (IL-1b, IL-2, IL-4, TNF, IL-8, IL- 22, por exemplo) no soro dos participantes serão determinadas por CBA. Estes experimentos serão realizados na plataforma de citometria de fluxo do ICB-UFMG. Para o objetivo 4, a análise da produção de anticorpos (IgM, IgG e IgA), no soro e saliva, será realizada por ELISA indireto, em placas sensibilizadas com os antígenos específicos de *M. leprae*. Os dados quantitativos serão analisados no GraphPad Prism 7.0 e GENES, utilizando os testes adequados para verificação da normalidade de dados, comparação entre grupos e análise dos coeficientes de correlação, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados Esperados:

Os resultados deste projeto contribuirão no entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na imunidade frente à hanseníase, possibilitando maior precisão no diagnóstico e até mesmo implementação novas estratégias terapêuticas. Os resultados a serem alcançados também contribuirão para a validação de um teste diagnóstico sorológico em campo, com possível aplicação nos serviços de saúde.

## 6. Referências:

1. SESAB. GT - Hanseníase/DIVEP/SESAB. Boletim Epidemiológico de Hanseníase. Ano 2019, no 01. Em: [http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletimEpidemiologicoHanseníaseDez2019\\_no01.pdf](http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletimEpidemiologicoHanseníaseDez2019_no01.pdf)
2. Lima HR et al. Immune Checkpoints in Leprosy: Immunotherapy As a Feasible Approach to Control Disease Progression. *Front Immunol.* 2017;8:1724.
3. Oliveira ALG. Relações causais entre a expressão dos genes do receptor de vitamina D e do peptídeo antimicrobiano catelicidina sobre marcadores sorológicos de pessoas com hanseníase antes e após seis meses de tratamento poliquimioterápico. -- Belo Horizonte, 2020. Em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/32994/1/Tese%20FINAL%20VDR%20e%20AMP%20em%20Hansen%20C3%ADase%20-%202017.03.2020%20-%20ALGO.pdf>
4. Bobosha K et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) 8(4):e2773.10.1371.
5. Cardoso CC et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol.* 2011;6(5):533-549.
6. Mendes et al. Expression of NLRP3 inflammasome in leprosy indicates immune evasion of *Mycobacterium leprae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*

2020;115:e190324. 7. Silva LM et al. The inflammasome in leprosy skin lesions: an immunohistochemical evaluation. *Infect Drug Resist.* 2018 Nov 12;11:2231-2240. 8. Levy M et al. NLRP6: A Multifaceted Innate Immune Sensor. *Trends Immunol.* 2017;38(4):248-260. 9. Tuladhar S, Kanneganti TD. NLRP12 in innate immunity and inflammation. *Mol Aspects Med.* 2020;100887. 10. Zhang Q et al. NLRP3 rs35829419 polymorphism is associated with increased susceptibility to multiple diseases in humans. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):13968-13980. 11. SOUZA DE LIMA D. Caracterização genética e funcional do inflamassoma na resposta à micobactéria e no desenvolvimento de diferentes formas clínicas de tuberculose pulmonar. -- São Paulo, 2019. DOI <https://doi.org/10.11606/T.42.2019.tde-13122019-173816> 12. Subbarao S. et al. Genetic and pharmacological inhibition of inflammasomes reduces the survival of Mycobacterium tuberculosis strains in macrophages. *Sci Rep* 10, 3709 (2020). 13. Ye J et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012 Jun 18;13:134. 14. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010 Mar 1;26(5):589-95. 15. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009 Jul 15;25(14):1754-60. 16. Carvalho KI et al. Lower numbers of natural killer T cells in HIV-1 and Mycobacterium leprae co-infected patients. *Immunology.* 2012;136(1):96-102. 17. Contin LA et al. Uso do teste ML-Flow como auxiliar na classificação e tratamento da hanseníase. *An. Bras. Dermatol.* 2011;86(1): 91-95.