



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**PERSISTÊNCIA DE ANTICORPOS ANTIFOSFOLIPÍDEOS NA
HANSENÍASE: FATORES EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS.**

SANDRA LÚCIA EUZÉBIO RIBEIRO

**MANAUS-AM
2014**

SANDRA LÚCIA EUZÉBIO RIBEIRO

**PERSISTÊNCIA DE ANTICORPOS ANTIFOSFOLIPÍDEOS NA
HANSENÍASE: FATORES EPIDEMIOLÓGICOS, CLÍNICOS E
IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS.**

**Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de
Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade
Federal do Amazonas-UFAM, como requisito
necessário para obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia.**

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina dos Santos

Coorientador: Professor Doutor Luiz Fernando de Souza Passos

**MANAUS-AM
2014**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R484p Ribeiro, Sandra Lúcia Euzébio
Persistência de anticorpos antifosfolipídeos na hanseníase:
fatores epidemiológicos, clínicos e imunológicos associados /
Sandra Lúcia Euzébio Ribeiro. 2014
91 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Maria Cristina dos Santos
Coorientador: Luiz Fernando de Souza Passos
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Mycobacterium leprae. 2. Hanseníase. 3. Anticardiolipina . 4.
Anticorpos Antifosfolipídeos. I. Santos, Maria Cristina dos II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

SANDRA LÚCIA EUZÉBIO RIBEIRO

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, como requisito necessário para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia julgada pela Comissão composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA:

Presidente da Banca
Professora Doutora Maria Cristina dos Santos

Membro da Banca
Professora Doutora Maria de Fátima Lobato da Cunha Sauma

Membro da Banca
Professora Doutora Maria das Graças Souza Cunha

Membro da Banca
Professora Doutora Carolina Chrusciak Talhari Cortez

Membro da Banca
Professor Doutor Domingos Sávio Nunes de Lima

A comissão julgadora considerou:

Aprovada em 02 de setembro de 2014

LOCAL DA DEFESA: Auditório da Biotecnologia, Bloco M, Mini *campus*, UFAM.

MANAUS-AM
2014

DEDICO:

- *Ao meu esposo Ernani, amor de minha vida, companheiro e amigo que com seu carinho, compreensão, tolerância e equilíbrio sempre me estimulando a perseverar nas conquistas de todos os meus objetivos.*

- *Aos meus filhos, Irena, Luísa e Henrique, minhas pedras preciosas, presente divino, sendo minha razão de crescer e viver.*

- *À minha mãe, grande amiga, mulher determinada que com seu grande amor, sempre me ajudou a vencer os desafios da vida que nos fortaleceu e nos fez mais unidas.*

- *Ao meu pai, homem bom, com o coração puro e feliz que sempre me ajudou em todos os momentos da vida - Minha imensa gratidão.*

- *Minha sogra pelo valioso carinho, por sua constante presença e apoio familiar, compreendendo e acreditando sempre na minha capacidade de crescimento.*

- *Meu sogro In memória por todo apoio.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

*À Deus, que me orienta e ilumina
em todos os momentos de minha vida.*

*Aos pacientes por terem participado
deste estudo com dedicação e presteza*

AGRADEÇO AOS:

À Professora Doutora Maria Cristina dos Santos, pela confiança, respeito, incentivo, contribuições e extrema delicadeza na orientação desta tese para que eu pudesse realizar este trabalho, fortalecendo-me com seu apoio incondicional.

Professor Doutor Luiz Fernando de Souza Passos - Coorientador, pelo estímulo e condução no despertar em tomar a atitude de executar esse grande projeto na minha carreira profissional e valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Professoras doutoras Emília Inoue Sato e Neusa Pereira da Silva pelas diversas contribuições para a execução deste trabalho.

À Helena Lúcia Alves Pereira, pela amizade e na grande ajuda com a coleta dos dados para a construção e realização deste trabalho.

À Direção do Instituto de Dermatologia Tropical e Venereologia Fundação "Alfredo da Matta" através da diretora geral Doutora Maria da Graça Souza Cunha pela oportunidade da pesquisa e orientação diante das dificuldades enfrentadas e disposição para colaborar, que permitiu a execução e realização deste estudo, a minha gratidão.

Aos colegas do Serviço de Reumatologia do HUGV-UFAM, Anne Christine Guedes das Neves, Domingos Sávio Nunes de Lima e Rosana Barros de Souza pela compreensão e apoio na condução deste estudo fosse realizado.

Ao colega de Reumatologia Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes pela contribuição neste trabalho.

Aos funcionários da Fundação "Alfredo da Matta" SAME/FUAM, especialmente do setor de Hansenologia, prontuário e laboratório de análises clínicas pelo carinho e pela colaboração na coleta de dados do estudo, o meu reconhecimento e gratidão.

Aos colegas dermatologistas da FUAM, Maria de Fátima Maroja, Célia Maria Correia, Silmara Navarro Pennini, Paula Frassinette Rebello e Rossilene Cruz pelo apoio de seus conhecimentos na colaboração do entendimento da hanseníase e pelo auxílio na coleta de dados deste estudo.

Aos funcionários do Laboratório do HUGV, pela colaboração.

Aos funcionários do Laboratório de Disciplina de Reumatologia, Rogério Quintiliano do Amaral, pela ajuda calorosa na realização dos exames.

À UFAM, pela oportunidade de acrescentar conhecimento.

SERVE E PROSSEGUE

*Nada te desanime - Nunca sem esperança.
Terás visto em caminho, tempestade de dor.
Perdeste bens do mundo, que supunhas sem termo.
Julgas-te em abandono inútil, triste e só.
Entretanto, não pares, Serve, Luta e Prossegue...
Na frente, encontrarás novas bênçãos de Deus.*

Emmanuel

RESUMO

RIBEIRO, Sandra Lúcia Euzébio. **Persistência de anticorpos antifosfolipídeos na hanseníase: elementos epidemiológicos, clínicos e imunológicos associados.** Orientador: Dra. Maria Cristina dos Santos. Manaus: UFAM, 2014. Tese (Doutorado em Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia).

Anticorpos antifosfolipídeos (aFL) podem ser detectados no curso de diversas infecções, mas costumam ser transitórios. Entretanto, na hanseníase tem-se observado que esses autoanticorpos persistem por mais tempo. Os objetivos do presente estudo foram verificar a persistência de anticorpos anticardiolipina (aCL) e anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI) em pacientes com hanseníase, e avaliar as características epidemiológicas, clínicas e imunológicas associadas. Trinta e oito pacientes com diagnóstico de hanseníase e positivos para anticorpos aFL completaram o tratamento de poliquimioterapia (PQT) e foram acompanhados por um tempo médio de 66,9 meses, quando coletou-se outra amostra para nova pesquisa da anticorpos aFL. A detecção de anticorpos aCL e anti- β_2 GPI foi feita pela a técnica de ELISA. A análise dos dados epidemiológicos e clínicos foi feita por regressão logística binária multivariada. Persistência de anticorpos aFL foi demonstrada em 32 (84%) dos 38 pacientes com hanseníase, tratados com PQT e em alta do tratamento PQT, seguidos por um tempo médio de 66,9 meses. Todos os soros positivos eram do isotipo IgM, sendo que 16 desses pacientes (50%) apresentavam a forma virchowiana (VV). Episódios reacionais estavam presentes em três pacientes (9,4%). Dezesete (53,1%) continuavam usando medicação (prednisona e/ou talidomida). Os valores médios de IgM foram altos, 64U/mL para aCL e 62U/mL para anti- β_2 GPI. Em relação às variáveis trombose vascular, morbidade gestacional, diabetes, tabagismo e etilismo não foram observadas diferenças significativas entre os pacientes positivos e negativos para aFL. Na regressão logística demonstrou-se significância estatística para as variáveis idade: ($p=0,045$, OR=0,91 e IC 95% 0,82-1,00), forma clínica VV ($p=0,034$; OR=0,02 e IC 95% = 0,0-0,76) e índice baciloscópico ($p=0,044$; OR=2,74 e IC 95% = 1,03 - 7,33). Portanto, anticorpos aFL na hanseníase, diferentemente de outras infecções, persistem anos após o tratamento em pacientes considerados “curados”. Essa persistência foi influenciada pela idade, forma clínica VV e índice baciloscópico. Não houve associação com fenômenos trombóticos.

Palavras-Chave: 1. *Mycobacterium leprae* - 2. Hanseníase - 3. Persistência
4. Anticardiolipina - 5. Anti- β_2 glicoproteína I 6. Anticorpos Antifosfolipídeos

ABSTRACT

RIBEIRO, Sandra Lúcia Euzébio. **Antiphospholipid antibodies in Leprosy: associated epidemiologic, clinic and immunologic factors.** Orientador: Dra. Maria Cristina dos Santos. Manaus: UFAM, 2014. Tese (Doutorado em Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia).

Antiphospholipid (aPL) antibodies may be detected during the course of many infections, but are usually transient. In leprosy, however, these antibodies are found to linger for longer periods. The aim of this study was to evaluate the persistence of anticardiolipin (aCL) and anti- β_2 glycoprotein I (anti- β_2 GPI) antibodies in leprosy patients, and disclose epidemiologic, immunologic and clinical features associated with it. Thirty-eight APL antibody positive leprosy patients completed polychemotherapy and were followed for an average of 66,9 months, when a second sample was drawn for a new aPL testing. Enzima -linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure aCL and anti- β_2 GPI antibodies. Epidemiologic and clinical data were analyzed with logistic regression. Persistence of aPL antibodies was demonstrated in 32 out of 38 leprosy patients thoroughly treated and considered cured, studied after an average of 66,9 months of follow up. All of these sera were IgM isotype. Sixteen of these patients (50%) presented lepromatous clinical form. Reactional state was present in three patients (9,4%). Seventeen (53,1%) were in use of prednisone and/or thalidomide. Observed median values of aPL antibodies were rather high (64U/mL for aCL and 62U/mL for a β_2 GPI). Occurrence of vascular thrombosis, gestational morbidity, diabetes, tobacco use and alcoholism were not different in positive and negative aPL patients. Logistic regression showed significant association of aPL antibodies persistence and age ($p=0,045$, OR=0,91 e IC 95% 0,82 - 1,00), lepromatous clinical form ($p=0,034$; OR=0,02 e IC 95% = 0,0 - 0,76) and bacillary index ($p=0,044$; OR=2,74 e IC 95% = 1,03 - 7,33). aPL antibodies in leprosy patients do persist many years after treatment. Patients' age, lepromatous clinical form and bacillary index were factors that influence persistence. No thromboembolic events were registred.

Keyword: 1. *Mycobacterium leprae* - 2. Leprosy - 3. Persistence - 4. Anticardiolipin
5. Anti- β_2 glycoprotein I - 6. Antiphospholipid antibodies

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Forma indeterminada - Lesão de pele única bem definida	22
Figura 2-	Forma Tuberculoide - lesão de pele, anestésicas, bem delimitada e assimétrica	23
Figura 3 -	Forma VV - lesões de pele amplamente distribuídas, pouco delimitadas, infiltrado no pavilhão auricular e madarose	24
Figura 4 -	Células de Virchow - composto de histiócitos e macrófagos contendo numerosos bacilos, com grande quantidade de lipídios em sua parede, o aspecto de células espumosas	24
Figura 5 -	Nas formas (BT, BB e BV) lesões papulosas, eritematosas, edematosas de limites internos bem definidos e externos imprecisos, centro hipocrômico e anestesia local, pouco delimitada	25
Figura 6 -	Etapas de seleção dos pacientes para o estudo	
Figura 7 -	Distribuição dos pacientes com hanseníase, segundo a classificação da forma clínica dos soros coletados em 2004, 2010 e 2011	40
Figura 8 -	Positividade de anticorpos aCL e anti- β_2 GPI em diferentes período de coleta de soro nos 38 pacientes com hanseníase	46
Figura 9 -	Positividade de anticorpos aCL e anti- β_2 GPI de acordo com a forma clínica nos pacientes com hanseníase no reteste em 2012 e na nova coleta 2010/2012	47
Figura 10 -	Positividade de anticorpos aCL do isotipo IgM em diferentes período de coleta de soro	48
Figura 11 -	Positividade de anticorpos anti- β_2 GPI do isotipo IgM em diferentes período de coleta	50
Figura 12 -	Distribuição das formas clínicas nos pacientes com hanseníase com títulos 40U/mL os para os anticorpos aCL e anti- β_2 GPI em relação ao reteste e a nova coleta	50
Figura 13 -	Positividade de anticorpos aCL, anti- β_2 GP e aFL nos 32 pacientes com hanseníase	52
Figura 14 -	Índice baciloscópico inicial (Soro 2004) e atual (Soro 2010/2011) de acordo com os anticorpos aFL em 38 pacientes com hanseníase	58
Figura 15 -	Curva de Kaplan-Meier para comparar a persistência dos anticorpos aFL em relação a forma virchowiana e as outras formas clínicas da hanseníase	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas, episódios reacionais e uso de medicação em pacientes portadores de hanseníase.....	45
Tabela 2 -	Positividade de anticorpos aCL e anti- β_2 GPI dos isotipos IgG e IgM nos pacientes com hanseníase em diferentes período de coleta de soro ..	49
Tabela 3 -	Valores dos anticorpos aCL e anti- β_2 GPI por isotipos IgG e IgM nos pacientes com hanseníase no reteste 2012 e nova coleta 2010/2011	49
Tabela 4 -	Análise dos pacientes com hanseníase positivos para aFL com títulos > 40 U/mL no reteste e na nova coleta	51
Tabela 5 -	Análise das características demográficas e clínicas dos 38 pacientes com hanseníase segundo o anticorpo aFL na nova coleta 2010/2011	53
Tabela 6 -	Análise das variáveis clínicas dos 32 pacientes com hanseníase segundo o anticorpo aFL na nova coleta 2010/2011	54
Tabela 7 -	Análise das características demográficas e clínicas dos 32 pacientes com hanseníase segundo título do anticorpo aFL na nova coleta 2010/2011	55
Tabela 8 -	Análise das variáveis clínicas dos 32 pacientes com hanseníase segundo título do anticorpo aFL na nova coleta 2010/2011	56
Tabela 9 -	Modelos de regressão logística binária multivariada avaliando fatores prováveis para a “negativação” do aFL em pacientes com hanseníase ..	57
Tabela 10 -	Regressão logística binária avaliando influência do índice baciloscópico inicial sobre os anticorpos aFL em 38 pacientes com hanseníase	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
AANs	Anticorpos Antinucleares
aCL	Anticorpos Anticardiolipina
aFL	Anticorpos Antifosfolípídeos
ANCA	Anticorpos Anticitoplasma de Neutrófilos
Anti-CCP	Anticorpos Antipeptídeos Citrulinados Cíclicos
Anti- β_2 GPI	Anticorpos Anti β_2 glicoproteína I
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
β_2 GPI	β_2 glicoproteína I
BB	<i>Borderline Borderline</i>
BT	<i>Borderline</i> Tuberculoide
BV	<i>Borderline</i> Virchowiana
CD4	Marcador de Superfície de Células T
CD8	Marcador de Superfície de Células T
CXCL-8	Quimiocina (anteriormente IL-8)
DC	Células Dendríticas
DC _p	Células Dendríticas Plasmocitoides
DP	Desvio Padrão
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
FR	Fator Reumatoide
FoxP3	Fator de Transcrição Box P3
FUAM	Fundação “Alfredo da Matta”
HI	Hanseníase Indeterminada
HLA-DQ	Antígenos Leucocitários Histocompatibilidade da classe II, locus DQ
HLA-DR	Antígenos Leucocitários Histocompatibilidade da classe II, locus DR
HUGV	Hospital Universitário Getúlio Vargas
ICC	Imunocomplexos Circulante
IDO	Enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFP	Interfalangeanas Proximais
IFN γ	Interferon Gama

IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6.....	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23
IL-35	Interleucina 35
LAC.....	Anticoagulante Lúpico
LAM	Lipoarabinomanana
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LEU	Leucina
MCF	Metacarpofalangeanas
MHC	Complexo maior de Histocompatibilidade
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PGL-1	Glicolípido Fenólico 1
PQT	Poliquimioterapia
RR	Reação Reversa
ROI	Reativos Intermediários do Oxigênio
RNI	Reativos Intermediários do Nitrogênio
SAF	Síndrome Antifosfolípideo
TCD4 ⁺	Linfócito T
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador
TH	Células T auxiliares
T _H 1	Células T auxiliares tipo 1
T _H 2	Células T auxiliares tipo 2
T _H 17	Células T auxiliares tipo 17
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

TNF γ	Fator de Necrose Tumoral Gama
T _{reg}	T reguladores
TT	Forma Tuberculoide
T γ : δ	Linfócitos T gama/delta
U	Unidades
UNIFESP.....	Universidade Federal de São Paulo
UFAM.....	Universidade Federal do Amazonas
VV.....	Virchowiana
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	HANSENÍASE.....	19
2.2	Formas clínicas da hanseníase.....	22
2.2.1	Forma Indeterminada (I).....	22
2.2.2	Forma Tuberculoide (TT).....	22
2.2.3	Forma Virchowiana (VV)	23
2.2.4	Formas Intermediárias (BT, BB, BV)	25
2.3	ESTADOS REACIONAIS DA HANSENÍASE	26
2.4	RESPOSTA IMUNE-ESPECÍFICA AO <i>Mycobacterium Leprae</i>	27
2.5	PADRÃO T _H 1-T _H 2 e T _{reg} NA HANSENÍASE	29
2.6	MANIFESTAÇÕES ARTICULARES	30
2.7	AUTOANTICORPOS NA HANSENÍASE	32
2.8	ANTICORPOS ANTIFOSFOLIPÍDEOS (aFL)	33
2.8.1	Anticorpos Anticardiolipina (aCL) e Anti- β_2 Glicoproteína I (anti- β_2 GPI)	33
2.8.2	Anticorpos Antifosfolipídeos em Doenças Infeciosas	35
2.8.3	Anticorpos Antifosfolipídeos em Hanseníase.....	36
2.8.3.1	Anticorpos Anticardiolipina.....	36
2.8.3.2	Anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI)	36
2.8.4	Persistência de Anticorpos Antifosfolipídeos.....	37
3	OBJETIVOS	38
3.1	GERAL	38
3.2	ESPECÍFICOS	38

4	METODOLOGIA	39
4.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO	39
4.2	AMOSTRA	41
4.2.1	Critérios da Inclusão	41
4.2.2	Critérios da Exclusão.....	41
4.3	DESENHO DO ESTUDO.....	41
4.4	EXAMES LABORATORIAIS.....	42
4.4.1	Detecção de Autoanticorpos.....	42
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Dados demográficos e características da hanseníase.....	45
5.2	Exames Laboratoriais.....	47
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES	66
8	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE A - Formulário para a Pesquisa	81
	APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre Esclarecido	83
	APÊNDICE C - Características Demográficas e Clínicas dos Pacientes com Hanseníase e Resultados de Anticardiolipina e Anti- β_2 glicoproteína I.	84
	ANEXO A - Carta N. 010/10 (Comitê de Ética em Pesquisa) CEP/FUAM	86
	ANEXO B - Artigo aceito para publicação na Revista Lupus (2014) 0, 1-3	87
	ANEXO C - Artigo de Revisão - aceito para publicação na Revista Eletrônica <i>Scientia Amazonia</i> .	88

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase apresenta uma particularidade importante para os clínicos e imunologistas, pois a diversidade de resposta do hospedeiro ao agente etiológico impõe um desafio diagnóstico e um modelo exemplar para o entendimento da resposta imune no ser humano (MODLIN, 2010).

Classicamente a hanseníase apresenta envolvimento cutâneo e neurológico, porém o acometimento pelo bacilo *Mycobacterium leprae* pode ocorrer em outros órgãos e sistemas, além da pele e nervos, como olhos, rins, fígado, baço e testículos. As manifestações clínicas da hanseníase são muito variáveis e estão relacionadas com o grau de imunidade do paciente frente ao *Mycobacterium leprae* (TALHARI, 2006).

As manifestações reumáticas são relativamente comuns durante o curso da doença, e, em algumas ocasiões, podem ser a manifestação inicial. O acometimento articular na hanseníase é considerado a terceira manifestação mais frequente, após as dermatológicas e neurológicas e ocorre principalmente no curso das reações hansênicas em pacientes com hanseníase virchowiana e nas formas instáveis. Entretanto, também foram descritas manifestações inflamatórias articulares fora do contexto reacional, abrangendo todas as formas clínicas da doença. (ALCOCER et al., 1979; ATKIN et al., 1987; COSSERMELLI-MESSINA et al., 1998; PEREIRA et al., 2009).

Quando o reumatologista investiga as doenças que comprometem os músculos, ossos e articulações pode haver agregação de outros diagnósticos, mesmo nos casos em que há doença de base já estabelecida. Essas peculiaridades na análise clínica podem dificultar a definição diagnóstica e a conduta terapêutica. O importante ao se definir a etiologia das queixas de forma acurada, é evitar tratamentos incorretos ou retardar o manejo adequado. A hanseníase faz parte da lista de diagnósticos diferenciais de doenças reumáticas, uma vez que autoanticorpos e manifestações articulares e sistêmicas podem estar presentes em ambas as situações (DE LARRAÑAGA et al., 2000; RIBEIRO et al., 2009).

Estudos têm descrito manifestações autoimunes tais como artrite, vasculite, eritema nodoso e positividade de autoanticorpos em pacientes com hanseníase. Autoanticorpos têm sido relatados predominantemente na hanseníase virchowiana, forma multibacilar, que apresenta marcada resposta imune humoral. Na forma tuberculoide, paucibacilar, a resposta imune celular é eficiente e a presença de autoanticorpos é menos frequente (GARCIA-DE LA TORRE, 1993; NAAFS, 1994; OTTENHOFF, 1994; RIBEIRO et al., 2009).

Anticorpos antifosfolípídeos (aFL) constituem um grupo heterogêneo de autoanticorpos que se ligam a fosfolípídeos aniônicos na presença ou na ausência de cofatores de proteínas (GALLI et al., 1990). Os anticorpos aFL representam uma família de imunoglobulinas das classes G e M que reagem com proteínas de plasma ligadas a fosfolípídeos de membrana ou contra fosfolípídeos carregados negativamente (HARRIS et al., 1987).

Os anticorpos aFL mais frequentemente detectados são anticoagulante lúpico (LAC), anticardiolipina (aCL) e anti β_2 -glicoproteína I (anti- β_2 GPI) (ROUBEY, 1996). Alguns destes anticorpos podem ser detectados sob uma forma não patogênica em indivíduos saudáveis (MANOUSSAKIS, et al., 1987; PETRI, 2000; SHI, et al., 1990). Em várias doenças infecciosas bacterianas e virais também têm sido descritos (LOIZOU, et al., 1997; LEROY et al., 1998; DE LARRAÑAGA et al., 2000; SANTIAGO, et al., 2001; LOIZOU et al., VON LANDENBERG et al., 2003; RIBEIRO et al., 2011). Nestas condições, usualmente, os aFL não estão associados às complicações clínicas atribuídas à síndrome do anticorpo antifosfolípídeo (SAF) Roubey (1996), sendo frequentemente transitórios e podendo desaparecer com o tratamento da infecção (DE LARRAÑAGA et al., 1999; CARRERAS et al., 2000). Os anticorpos aFL patogênicos são descritos em diversas doenças autoimunes, particularmente na SAF primária e no lúpus eritematoso sistêmico (LES), estando frequentemente associados a fenômenos trombóticos e morbidade gestacional (ASHERSON; CERVERA, 2003).

Vários autores sugerem que anticorpos anti- β_2 GPI seriam marcadores mais específicos de SAF, apresentando maior associação com as complicações típicas da SAF e menor frequência em doenças infecciosas (CABIEDES et al., MARTINUZZO et al., MCNALLY et al., 1995; FORASTEIRO et al., 1997; GUERIN et al., 1999). Entretanto, na hanseníase, a literatura apresenta uma ampla variação quanto à prevalência dos anticorpos anti- β_2 GPI, que vai de 2,9% (ELBEIALY et al., 2000) a 89% (LOIZOU et al., 2003).

Estudo realizado na Fundação Alfredo da Matta (Manaus-AM), com 1.257 pacientes com diagnóstico de hanseníase foi pesquisada a frequência de envolvimento articular, destes, 79(6,3%) apresentaram artrite e/ou artralgia associado à hanseníase, sendo que artrite foi encontrada em 55 (4,1%) pacientes (PEREIRA et al., 2009).

Ribeiro e colaboradores (2009) pesquisaram a frequência de vários autoanticorpos em 158 pacientes com diagnóstico de hanseníase com e sem comprometimento articular. Neste estudo foi detectada baixa prevalência de fator reumatoide (FR) anticorpo antinucleares

(AAN), anticorpo anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) e anticorpo anti-peptídeos citrulinados cíclico (anti-CCP). Observou-se, alta positividade de anticorpos aCL e para o seu cofator, a anti- β_2 GPI. Adicionalmente, observou-se que a positividade para anticorpos aCL não diminuiu com o tempo de alta da poliquimioterapia (PQT) e, que, entre os pacientes em alta, aqueles positivos para anticorpo aCL apresentavam média de tempo de alta maior do que os negativos. Este achado, não corrobora com o conceito de que a positividade dos antifosfolídeos seja um fenômeno transitório nas doenças infecciosas, incluindo a hanseníase e levanta a hipótese de que a persistência dos anticorpos mesmo após a cura bacteriológica da doença possa estar associada à patogenicidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HANSENÍASE

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), no início de 2012, foram detectados 232.857 mil novos casos de hanseníase e, para este mesmo ano, a prevalência registrada foi de 189.018 mil casos no primeiro trimestre de 2013 (WHO, 2012).

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica e endêmica no Brasil, que constitui grave problema de saúde pública por causar incapacidade física permanente. O país ocupa o segundo lugar em número de casos no mundo, perdendo apenas para a Índia. De acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil (MS) a incidência da doença tem diminuído, mas ainda assim foram diagnosticados, em 2012, 33.303 mil novos casos no Brasil, com coeficiente de detecção de 17,17/100.000 habitantes e em menores de 15 anos 4,81/100.000. A hanseníase, no Brasil, apresenta altos níveis endêmicos, com distribuição variada nas diferentes regiões do país, sendo encontrada em 3.237 municípios dos 5.565 existentes no país e com alta prevalência na Região Amazônica (Brasil /DATASUS/MS, 2012).

O Estado do Amazonas apresenta níveis de endemicidade alto, com 1.033 casos em registro ativo e taxa de prevalência de 2,88/10.000 habitantes do Estado. No mesmo período foram detectados 663 casos novos, representando uma taxa de detecção de 18,46 casos por 100.000 habitantes. Na cidade de Manaus, em 2012, foram registrados 230 casos novos e em tratamento 394 casos, sendo a taxa de prevalência de 2,12/10.000 habitantes (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2012).

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, de evolução lenta e seu agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório, descrito pelo médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, em 1873, com afinidade por células cutâneas e nervos periféricos. É transmitida de pessoa a pessoa, por meio do convívio de susceptíveis com doentes contagiantes. O bacilo não é cultivável em meios artificiais, porém, multiplica-se em alguns animais como tatus e camundongos timentomizados e irradiados. O homem é considerado o único reservatório natural do bacilo, apesar de alguns relatos de animais selvagens (tatus selvagens, chimpanzés e macacos) naturalmente infectados com bactéria similar ao *M. leprae* (TALHARI, 1984; VALVERDE et al., 1998).

A maioria das pessoas não é susceptível e não desenvolve a doença. Aquelas que a desenvolvem, após um período médio de incubação de dois a cinco anos, apresentam inicialmente lesão cutânea única, que pode evoluir para a cura espontânea ou para as outras formas da doença (NOUSSITOU et al., 1976; FINE, 1982).

A identificação diagnóstica do *Mycobacterium leprae* dá-se por meio da baciloscopia. Esta técnica é executada de forma simples, pela coleta de raspado dérmico dos lóbulos das orelhas, cotovelos e da lesão de pele em análise, coloração do raspado com a metodologia de Ziehl-Neelsen e verificação do índice baciloscópico em microscópio. Este índice varia em resultado de zero a seis cruces e determina se a baciloscopia é positiva ou negativa. Devido à lenta replicação, a identificação desse patógeno é muitas vezes dificultada (OPROMOLLA, 2000).

Desde a época de Hansen já se tinha noção de que o aparecimento da hanseníase se deve a fatores genéticos (aparecimento da infecção entre familiares) e ambientais (condições socioeconômicas desfavoráveis).

Estudos em genética têm demonstrado que fatores do hospedeiro estão relacionados tanto com susceptibilidade quanto com resistência a doença (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Ao “fator de resistência natural N” (ou fator N), descrito por Rotberg (1937), pode-se atribuir a um conjunto de genes interatuantes nas respostas individuais à exposição ao bacilo (BREIGUELMAN, 2002). Rotberg (1937) especulava a presença de um “Fator N” ou fator natural, que seria responsável pela resistência contra o bacilo, presente em 90 a 95% dos indivíduos adultos. As pessoas não portadoras do “Fator N” seriam anérgicas e desenvolveriam a forma virchowiana após infecção (TALHARI, 2006).

Posteriormente, com o desenvolvimento das técnicas imunológicas ficou claro que a

imunidade do indivíduo também tinha um papel importante na caracterização das formas clínicas dos pacientes com hanseníase (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A defesa do hospedeiro é efetuada pela resposta imune “celular”, capaz de fagocitar e destruir os bacilos, mediada pelas citocinas, pelos mediadores da oxidação como os reativos intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI) fundamentais na destruição bacilar no interior dos macrófagos (FOSS, 1999).

A maioria dos indivíduos expostos ao bacilo não desenvolve a doença. Admite-se que uma resposta imune inata eficiente em mucosas elimine a carga infectante. Células inatas com papel de sentinelas, produtoras de interleucina 17 (IL-17) teriam importância nesse cenário (CUA; TATO, 2010). Da Motta-Passos e colaboradores (2012) observaram escassa expressão do RNA da (IL-17) em pacientes com hanseníase quando comparados a indivíduos controle.

Na hanseníase as características clínicas do paciente estão diretamente relacionadas com a resposta imune desencadeada contra o bacilo. A doença apresenta quadro clínico caracterizado por duas formas polares estáveis, com aspectos imunopatológicos e clínicos diversos (MADRID, 1953; RIDLEY; JOPLING, 1966). No pólo tuberculoide o hospedeiro apresenta eficiente resposta imune mediada por células frente ao *Mycobacterium leprae*, com destruição dos bacilos e manutenção das lesões restritas a áreas limitadas da pele e feixes nervosos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). No outro pólo a forma virchowiana (VV) caracteriza-se por ineficiente resposta imune mediada por células, com grande multiplicação bacilar e disseminação da doença. Entre estas formas polares, situa-se a forma *borderline*, que é instável e classificada em subgrupos intermediários, denominados *borderline* virchowiana (BV), *borderline borderline* (BB) e *borderline* tuberculoide (BT), conforme suas características clínico-laboratoriais se aproximem mais do pólo virchowiano ou do tuberculoide. Os subgrupos são caracterizados pelo número de lesões, aspectos histológicos, grau de diferenciação da célula macrofágica, número de linfócitos, número de bacilos nos granulomas e ramos nervosos (FLEURY, 1989).

O espectro polar da hanseníase poderia ser atribuído à variação genética do patógeno. Entretanto, sequenciamento do genoma do *Mycobacterium leprae* mostrou 99,99% de homologia entre as cepas oriundas de diversos continentes, de origem contemporânea e arqueológica, indicando que a diversidade clínica deve-se exclusivamente ao comportamento do sistema imune do hospedeiro (MAIDEN, 2009).

2.2 FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE

2.2.1 Forma Indeterminada (I)

Na forma indeterminada comumente, a lesão inicial se expressa como uma área de hipoestesia definida ou não por uma lesão visível, nas quais os bacilos são escassos (figura 1). São formas benignas que podem evoluir, para um dos pólos do espectro, permanecer indefinitivamente como I, ou, evoluir para a cura espontânea.



Figura 1- Forma indeterminada - Lesão de pele única pouco definida

Fonte: FUAM (Fundação Alfredo da Matta).

2.2.2 Forma Tuberculoide (TT)

Na forma tuberculoide geralmente há poucas lesões de pele, anestésicas, bem delimitadas, com distribuição assimétrica e com tendência à cura espontânea (figura 2). O granuloma tuberculoide é constituído por agregado de células fagocitárias mononucleares com diferenciação epitelióide bem evidente, participação de células gigantes multinucleadas tipo Langerhans e linfócitos que formam um halo denso contornando este granuloma (FLEURY, 1989). Raramente são encontrados bacilos nestas lesões. A resposta humoral aos

antígenos de *Mycobacterium leprae* é geralmente ausente ou fraca (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Uma forte reação imune celular pode ser evidenciada pela resposta proliferativa de células T frente a antígenos de *Mycobacterium leprae in vitro*, bem como a reatividade na reação de Mitsuda (MODLIN; REA, 1987).



Figura 2 - Forma Tuberculoide - lesão de pele, anestésicas, bem delimitada e assimétrica.

Fonte: FUAM (Fundação Alfredo da Matta)

2.2.3 Forma Virchowiana (VV)

Na forma virchowiana os pacientes apresentam lesões de pele amplamente distribuídas, pouco delimitadas, algumas vezes envolvendo toda a superfície corporal e acompanhadas por anestesia acrodistal simétrica, mostrado na figura 3 (RIDLEY; JOPLING, 1966). A lesão histológica mostra um extenso infiltrado celular, composto de histiócitos e macrófagos contendo numerosos bacilos, com grande quantidade de lipídios em sua parede, conferindo-lhe o aspecto de células espumosas (células de Virchow) e às vezes multivacuoladas figura 4. Nestas lesões não se encontram linfócitos T ou granulomas organizados (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).



Figura 3 - Forma VV - lesões de pele amplamente distribuídas, pouco delimitadas, infiltrado no pavilhão auricular e madarose.

Fonte: FUAM (Fundação Alfredo da Matta).



Figura 4 - Células de Virchow - macrófagos contendo numerosos bacilos, com grande quantidade de lipídios em sua parede, o aspecto de células espumosas.

Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/Dscn4867>

A forma VV é caracterizada pela ineficácia da resposta imune celular, demonstrada *in vivo* pela negatividade do teste intradérmico de Mitsuda, e *in vitro*, pela ausência de blastogênese de células T em resposta aos antígenos de *Mycobacterium leprae* (MODLIN; REA, 1987). Nessa forma apesar da exacerbação e especificidade da resposta humoral, esta é ineficaz para eliminação dos bacilos, e ocorre extensa multiplicação bacilar e disseminação da infecção para vísceras e tecido nervoso (TALHARI, 1984).

2.2.4 Formas Intermediárias (BT, BB e BV).

Nas formas intermediárias da hanseníase, as manifestações clínicas são semelhantes, principalmente nas formas BB e BV apresentando em geral, lesões papulosas, eritematosas, edematosas de limites internos bem definidos e externos imprecisos, centro hipocrômico e anestesia local (figura 5). Quando se aproxima ao pólo tuberculoide observam-se lesões mais delimitadas, anestésicas e de superfície seca, cuja pesquisa de bacilos mostra raridade ou ausência de bacilos. Por outro lado, à proximidade do pólo virchowiano observa-se lesões cutâneas numerosas, brilhantes, com menor delimitação, com menor comprometimento da sensibilidade e cuja pesquisa mostra maior presença de bacilos. Podemos observar desde reação intradérmica de Mitsuda positiva, com bacilos raros ou ausentes, na forma BT, até ausência de resposta à reação de Mitsuda, com presença de numerosos bacilos, na pesquisa usual de esfregaço de linfa e cortes histológicos de tecido na forma BV (FOSS, 1999).



Figura 5 - Nas formas (BT, BB e BV) lesões papulosas, eritematosas, edematosas de limites internos bem definidos e externos imprecisos, centro hipocrômico e anestesia local, pouco delimitada.

Fonte: FUAM (Fundação Alfredo da Matta)

2.3 ESTADOS REACIONAIS DA HANSENÍASE

O curso crônico da hanseníase pode ser afetado em qualquer momento da infecção, seja antes, durante ou após tratamento adequado da doença, por episódios agudos de inflamação, denominados estados reacionais ou reações hansênicas, localizados ou sistêmicos, que afetam principalmente pele e nervos. As reações hansênicas são complicações frequentes, imunomediadas, que ocorrem em 30 a 50% dos pacientes com hanseníase (SAMPAIO; SARNO, 1998; BRITTON; LOCKWOOD, 2004). A morbidade dos estados reacionais é consequência, principalmente, do comprometimento agudo e agressivo dos nervos periféricos. A reação inflamatória neurológica pode desencadear alterações permanentes das funções, dos nervos acometidos, denominada seqüela neurológica da hanseníase. Clinicamente as seqüelas se apresentam de formas variadas, com dor neuropática crônica, parestias ou deformidades físicas incapacitantes. No entanto, os fatores precipitantes e mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desencadeamento de ambos os tipos de reação permanecem ainda mal definidos (LOCKWOOD, 1996; SAMPAIO et al., 2000; SCOLLARD et al., 2006). Contudo, uma série de variáveis clínicas foi associada, em maior ou menor grau, com a ocorrência, persistindo algumas controvérsias. Fatores como infecções intercorrentes, vacinação, gravidez, puerpério, medicação específica (PQT), medicamentos iodados e/ou estresse físico e emocional (RIDLEY; JOPLING, 1966; WALKER; LOCKWOOD, 2007).

Os quadros reacionais são classificados em: reação tipo 1 e tipo 2, cada um apresentando particularidades inerentes à fisiopatologia, ao quadro clínico e à terapêutica (RIDLEY; JOPLING, 1966). A reação do tipo 1 ou a reação reversa (RR) ocorre frequentemente na forma *borderline* e está associada ao aumento da resposta imune mediada por células contra os antígenos do *Mycobacterium leprae* (YAMAMURA et al., 1992). Os episódios recorrentes de inflamação aguda nas lesões de pele e nervos infectados pelos bacilos são considerados uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio aos antígenos bacilares. Essas reações resultam na eliminação de bacilos e representam um avanço em direção ao pólo tuberculoide. Embora a eliminação de bacilos seja desejável, a neurite resultante do processo inflamatório é frequentemente rápida e grave, podendo levar à incapacidade física por dano permanente do nervo (LIENHARDT; FINE, 1994).

A reação do tipo 2, ou eritema nodoso hansênico (ENH), ocorre predominante em pacientes da forma clínica VV, e algumas vezes em pacientes da forma BV. Caracteriza-se por uma reação inflamatória sistêmica em resposta à deposição extravascular de imunocomplexos com infiltração de neutrófilos e ativação do Sistema Complemento,

classificada como reação tipo III de Coombs-Gell ou Hipersensibilidade do tipo III (RIDLEY; RIDLEY, 1983; JOPLING; MACDOUGALL, 1991; NAAFS, 1994; BRITTON; LOCKWOOD, 2004). A participação de imunocomplexos é evidenciada pela presença simultânea de fragmentos antigênicos do bacilo, imunoglobulinas dos isotipos G ou M, e componentes do Complemento no espaço extravascular, na vizinhança de macrófagos e mesmo dentro de polimorfonucleares (neutrófilos) que são característicos do estágio agudo da reação tipo ENH (RIDLEY; RIDLEY, 1983).

Na pele, o eritema nodoso se caracteriza por lesões eritematosas, dolorosas, de tamanho variado incluindo pápulas e nódulos localizados em qualquer região do corpo. Os episódios de ENH são frequentemente acompanhados de febre e comprometimento do estado geral. Em alguns casos, ocorrem neurite, orquite, epididimite, irite, iridociclite, artrite, mãos e pés reacionais, linfadenite e dano hepático (TALHARI et al., 2006; WALKER; LOCKWOOD, 2007).

Pode surgir, ainda, episódio reacional com dor espontânea ou por compressão de tronco nervoso acompanhado ou não de espessamento, sem associação ao quadro cutâneo da reação tipo 1 ou tipo 2, sendo considerado um terceiro tipo de reação, denominada neurite isolada (LIENHARDT; FINE, 1994).

2.4. RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA AO *Mycobacterium leprae*

O desenvolvimento de resposta antígeno-específica das células T frente a antígenos bacterianos depende de fatores relacionados ao parasita e ao hospedeiro que determinam a progressão da doença e o prognóstico clínico.

O bacilo *Mycobacterium leprae* quando fagocitado pelo macrófago pode ou não ser processado, resultando em sua destruição, (forma TT), ou em sua multiplicação, como ocorre na forma VV (OTTENHOFF, 1994). Além dos macrófagos, as células dendríticas (DC), que são células apresentadoras de antígenos (APC) para linfócitos T virgens, desempenham um papel fundamental na modulação da resposta imune inicial no local da invasão pelo *Mycobacterium leprae* (De SOUZA et al., 2011). As DC são provavelmente as primeiras células do sistema imune a entrar em contato com *M. leprae*, Modlin et al. (1984), e podem apresentar antígenos proteicos via MHC de classe I e II ou antígenos lipídicos ou glicolipídicos, via CD1, para linfócitos T γ : δ (SIELING et al., 1999).

A captura dos bacilos, o processamento deste antígeno que serão apresentados aos linfócitos TCD4⁺ virgens e a produção subsequente de citocinas pelas células dendríticas induzem a polarização da resposta imune para T_H1 ou T_H2 ou outra linhagem de linfócitos T_H ainda não definida (De SOUZA et al., 2011). As DC de pacientes com hanseníase da forma TT, assim como seus macrófagos ativados, podem produzir citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, que induzirão uma resposta imune do tipo T_H1. Já, as DC de pacientes infectados com *Mycobacterium leprae* na forma VV, na presença de IL-4, polarizam a resposta para a linhagem T_H2 (MAEDA et al., 2003). Na forma VV, a produção dos antígenos glicolipídeo fenólico-1 (PGL-1) e lipoarabinomanana (LAM) pelo bacilo, no interior do macrófago, favorecem o seu escape à oxidação intramacrofágica. Esses antígenos têm capacidade de inibir a atividade do macrófago ajudando a disseminação do bacilo. Foss (1999) atribuía a alta carga bacilar, na forma VV, o papel na indução *in vivo* da tolerância imunológica. Porém, Santos et al. (2001), demonstraram que a expressão de proteínas coestimuladoras como a B7.1, nas DC, está diminuída, em pacientes na forma VV, o que pode explicar a tolerância imune ao *Mycobacterium leprae*.

De Souza e colaboradores (2011) observaram grande expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), a qual suprime a apresentação de antígenos do *Mycobacterium leprae* para células T, nos pacientes com a hanseníase na forma MB. Algumas linhagens de DC diferenciam-se a partir de precursores mieloides, um processo que pode ser interrompido por receptores inibitórios que detectam fosfolipídeos oxidados, em excesso, e esses receptores são encontrados nas lesões de pacientes na forma VV (LEE et al., 2007). Por isso, monócitos periféricos de pacientes VV não se diferenciam em DC CD1+ (KRUTZIK et al., 2005). As lesões de pacientes na forma VV/BV apresentam um déficit acentuado de células dendríticas tanto na derme quanto na epiderme (SIELING et al., 1999; MODLIN, 2010).

A participação de células dendríticas plasmocitoides (DCp) na hanseníase, pela detecção de CD123, foi investigada em biópsia de pele em todas as formas da doença, porém só foram observadas em dois pacientes que apresentavam episódios reacionais do tipo ENH. No entanto, o anti-CD123 também pode se ligar ao receptor IL-3 α , que é expresso em basófilos, mastócitos e macrófagos dificultando a identificação conclusiva de células dendríticas plasmocitoides, pois essas outras linhagens celulares podem também estar presentes no infiltrado que caracteriza o ENH (MASSONE et al., 2010).

A origem da deficiência da resposta imune não está totalmente esclarecida, porém a ocorrência de agregação familiar e a alta concordância em gêmeos monozigóticos sugerem participação genética. Os genes não determinam a susceptibilidade à hanseníase, *per se*, mas, influenciam a forma clínica que os indivíduos irão desenvolver após a exposição ao bacilo. Os indivíduos com HLA-DR2 e HLA-DR3 desenvolvem mais frequentemente a forma TT, enquanto os com HLA-DQ1, a forma virchowiana (DE VRIES, 1991). Estudos imunohistoquímicos têm confirmado a predominância de células CD4⁺ sobre CD8⁺ nas lesões tuberculoides, enquanto nas lesões VV há reduzido número de linfócitos, com proporções semelhantes de células T CD4⁺ e CD8⁺ (MODLIN et al., 1988; BRITTON, 1993).

2.5. PADRÃO T_H1-T_H2 e T_{reg} NA HANSENÍASE

Tem sido proposto que as duas formas polares estáveis da hanseníase representem a dominância de uma das duas subpopulações de células T auxiliar, T_H1 ou T_H2. O espectro da hanseníase refletiria o balanço entre as linhagens de linfócitos T_H1 ou T_H2 ativados pela micobactéria, definindo o padrão de citocinas produzido por cada uma destas populações de células.

Os pacientes com hanseníase apresentam diversas formas clínicas que estão diretamente associadas com a resposta imune desenvolvida, por exemplo, indivíduos na forma TT apresentam resposta imune celular eficiente, do tipo hipersensibilidade tardia frente aos antígenos bacterianos, com perfil predominante de citocinas séricas T_H1 (INF- γ , TNF- α e IL-2), resultando na contenção bacilar. Em contraste, na doença disseminada VV, as citocinas detectadas nos pacientes são as do padrão T_H2 (IL-4 e IL-5) e, embora contribuam para o aumento da produção de anticorpos, resultam em uma ineficiente resposta imune celular, com falha da ativação de macrófagos e, conseqüente, falha na eliminação do bacilo (YAMAMURA et al., 1991). Essa diferença entre subtipos de linfócitos T é direcionada pelas citocinas produzidas no local da lesão. Estudos que avaliaram a expressão local de citocinas na forma TT mostraram a predominância das citocinas IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ , caracterizando esse pólo com resposta celular do tipo T_H1. Na forma VV observou-se a presença de resposta humoral, com produção de citocinas do padrão T_H2, tais como, IL-4 e IL-5 (MOUBASHER et al., 1998).

Apesar de descritas as respostas T_H1 e T_H2 para as formas TT e VV da hanseníase, vários aspectos imunes desta doença precisam ainda ser elucidados, por exemplo, o envolvimento de outras linhagens de linfócitos T_H.

Estudos anteriores atribuíam a liberação de IL-10 aos linfócitos da linhagem T_H2 Yamamura et al. (1991); Moubasher et al. (1998), porém, hoje, sabe-se que esta citocina anti-inflamatória é sintetizada pelos linfócitos T reguladores ou T_{reg} ($CD4^+CD25^+$ FOXP3), os quais também produzem outras citocinas anti-inflamatórias como a TGF- β e a IL-35 (VIGNALI et al., 2008). Os linfócitos T_{reg} participam na regulação da resposta inflamatória induzida pelos linfócitos T_H1 . Por isso, no sangue periférico as células T_{reg} encontram-se elevadas em pacientes TT, nos quais há predomínio da resposta T_H1 , e diminuídas em pacientes VV e em estado reacional ENH (ATTIA et al., 2010). No tecido, a Imunohistoquímica revelou a presença de FoxP3 positivo em 95% dos casos de hanseníase estudados, sendo a sua distribuição não relacionada à área granulomatosa. Entre as formas clínicas da doença, não houve diferença estatística da presença de FoxP3, mas esta linhagem celular encontrava-se novamente diminuída em pacientes em estado reacional ENH (MASSONE et al., 2010).

Estudos de Da Motta-Passos e colaboradores (2012) verificaram a participação de linfócitos T_H17 detectando os níveis séricos e em biópsia da lesão das citocinas IL-6, IL-17 e IL-23, em pacientes portadores de hanseníase com diferentes formas clínicas e em indivíduos sem hanseníase, os controles. Os autores não detectaram as citocinas IL-17 e IL-23 no sangue periférico tanto nos pacientes quanto nos controles, porém a IL-6 estava aumentada nos pacientes VV. Quando avaliados a expressão dessas citocinas na biópsia da lesão dos pacientes de hanseníase, todas as formas clínicas apresentaram baixa expressão de IL-17, IL-23 e IL-6 em comparação aos controles, demonstrando que os linfócitos T_H17 não participam da resposta imune de indivíduos com hanseníase crônica.

2.6 MANIFESTAÇÕES ARTICULARES

As diversas queixas clínicas relacionadas à hanseníase, muitas vezes se assemelham a outras enfermidades de evolução clínica insidiosa, tornando um desafio o diagnóstico, nos primeiros meses e anos, da hanseníase.

O comprometimento osteoarticular na hanseníase foi descrito pelos chineses desde 600 a.C.. No curso da hanseníase, classicamente, foram descritos três tipos de acometimento osteoarticular: as artropatias neuropáticas ou de Charcot acometendo as extremidades; a osteíte ou as artrites sépticas específicas decorrentes da presença do bacilo intra-articular e a osteíte ou artrites sépticas não específicas, secundárias à infecção piogênica originada nas

ulcerações cutâneas (BONVOISIN et al., 1983). Além dos mecanismos acima descritos também foi relatada artropatia inflamatória no curso da hanseníase, independente da presença do agente infeccioso, sugerindo que a inflamação articular possa ser causada por outros mecanismos (MARAZZI, 1962).

Na hanseníase a artrite ocorre mais frequentemente na vigência de episódios reacionais, sobretudo no ENH e foram Karat e colaboradores (1967), os primeiros autores a descreverem esta associação. A artrite relacionada ao ENH geralmente tem início súbito, é predominantemente poliarticular, acometendo principalmente joelhos, tornozelos, punhos, metacarpofalangeanas (MCF) e interfalangeanas proximais (IFP), de forma semelhante à doença reumatoide de início agudo. A poliartrite é acompanhada por dor intensa e evolui na maioria das vezes sem deixar sequelas clínicas ou radiológicas, remitindo com a instituição da terapêutica antimicrobacteriana ou antirreacional (BONVOISIN et al., 1983; CHAVEZ-LEGASPI et al., 1985; ATKIN et al., 1989). Casos com comprometimento mono ou oligoarticular também foram descritos, apesar de remitir com o tratamento do quadro reacional ou da hanseníase; e é frequentemente recorrente e alguns autores descreveram como artrite de longa duração (LELE et al., 1965; ALBERT et al., 1980; CHAVEZ-LEGASPI et al., MISSI et al., 1985).

Artropatia associada a outros estados reacionais, como reação reversa na forma BB e BT também têm sido relatada (BONVOISIN et al., 1983; SALGADO, 1984; PERNAMBUCO, 1988).

Vários autores também descreveram artrite crônica em pacientes com todas as formas de hanseníase, sem relação com quadros reacionais, muitos destes pacientes já haviam terminado o tratamento específico da hanseníase há vários anos (LELE et al., 1965; ALCOCER et al., 1979; ATKIN et al., 1987; COSSERMELLI et al., 1998). Este fato sugere que a artrite hanseníase possa ser perpetuada mesmo após a eliminação do bacilo, uma vez que o *Mycobacterium leprae* íntegro, na maioria das vezes, não é encontrado na sinóvia. Entesites e sacroilítes também foram descritas (COSSERMELLI et al., 1998). Recentemente em nosso meio um estudo avaliando a frequência de manifestações articulares em 1.257 pacientes com hanseníase, com diversas formas clínicas, encontrou a presença de dor articular relacionada à hanseníase em 79 (6,3%) pacientes, sendo artralgia em 24 (2,1%) e artrite em 55 (4,4%) (PEREIRA et al., 2009).

O mecanismo fisiopatológico da artrite hanseníase seria semelhante ao das artropatias reativas crônicas associadas a agentes infecciosos (ALCOCER et al., 1979; HOLLA et al.,

1983; MISSI et al., 1985). Portanto, nestas formas, a injúria articular seria causada pelas reações imunológicas desencadeadas pelos antígenos micobacterianos.

Os autores descrevem o fenômeno de Lúcio da hanseníase na forma VV, manifestações isquêmicas vasculares, que essas em diversos casos, mesmo sem isquemia e necrose evidentes, evoluem em nódulos palpáveis e dolorosos, que na biópsia demonstram vasculite e necrose (BAKOS et al., 1996; ROVERANO et al., 2000).

2.7 AUTOANTICORPOS NA HANSENÍASE

A origem dos autoanticorpos na hanseníase e em outras doenças infecciosas crônicas ainda não é bem conhecida, podendo ser devida à ativação policlonal das células B por componentes da bactéria, presença de reação cruzada entre antígenos bacterianos e autoantígenos, ou, à lesão tecidual crônica e exposição de antígenos habitualmente ocultos (BONFÁ et al., 1987; McADAM et al., 1984; CHAVEZ-LEGASPI et al., 1985; MEDINA et al., 1998; MILLER et al., 1987).

Pacientes com hanseníase podem desenvolver uma variedade de autoanticorpos, incluindo anticorpos antinucleares (AANs), fator reumatoide (FR), anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP), anticorpos anti-DNA nativo (anti-dsDNA), anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), anticorpos aCL, anticorpos anti- β_2 GPI, anticorpos contra proteínas do citoesqueleto, tireoglobulina, células T e antígenos testiculares (SCHOENFELD; ISENBERG, 1988; ATKIN et al., 1989; PRADHAN et al., 2004; EDINGTON et al., 2007; GUEDES-BARBOSA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2011). Estes anticorpos são mais frequentes nos indivíduos com a forma VV, entretanto, na literatura, sua frequência é bastante variada. Na forma tuberculoide, paucibacilar, a resposta imune celular é eficiente e a presença de autoanticorpos é menos frequente (GARCIA-DE LA TORRE, 1993; NAAFS, 1994; OTTENHOFF, 1994).

A grande variabilidade da frequência destes autoanticorpos, encontrados na hanseníase, pode ser atribuída a fatores como etnia, forma clínica, tempo de doença, número de episódios reacionais, efeito da poliquimioterapia (PQT) e diferença nos métodos utilizados para a detecção dos autoanticorpos (BONFÁ et al., 1987; GARCIA-DE LA TORRE, 1993).

Na literatura há poucos estudos sobre prevalência avaliando diferentes autoanticorpos em um mesmo paciente na hanseníase (GUEDES-BARBOSA et al., 1996; PRADHAN et al., 2004; RIBEIRO et al., 2009).

Além da grande variabilidade na positividade de diferentes autoanticorpos em pacientes com hanseníase referida na literatura, há poucos trabalhos correlacionando a presença de autoanticorpos em geral e manifestações articulares nessa doença (DHOPLE, 1972; ATKIN et al., 1987; SINGH et al., 1994; DACAS et al., 2000., RIBEIRO et al., 2009).

2.8 ANTICORPOS ANTIFOSFOLIPÍDEOS (aFL)

2.8.1 Anticorpos Anticardiolipina (aCL) e Anti- β_2 Glicoproteína I (anti- β_2 GPI)

Anticorpos antifosfolipídeos são imunoglobulinas autorreativas estreitamente relacionadas entre si que reagem com fosfolipídeos aniônicos. Esses anticorpos são chamados de lúpus anticoagulante (LA) quando prolongam o tempo de coagulação dependente de fosfolipídeo ou denominados anticorpos aCL quando reagem com esse fosfolipídeo. Estes anticorpos constituem um grupo heterogêneo de autoanticorpos descritos em diversas doenças autoimunes, particularmente na SAF primária e no LES, estando frequentemente associados a fenômenos trombóticos e morbidade gestacional (ASHERSON; CERVERA, 2003; MCNEIL et al., 1991).

A ocorrência da SAF em doenças autoimunes como no LES e na SAF primária, por exemplo, passou a ser explicada a partir da descrição de um cofator β_2 GPI (também conhecido como apolipoproteína h). Estudos da década de 90, do século XX, sugeriram que a ligação de aFL à cardiolipina, em doenças autoimunes como no LES e na SAF primária, seria dependente desse cofator, enquanto aFL "não-trombogênicos" não dependeriam de β_2 GPI (GALLI et al., MATSUURA et al., MCNEIL et al., 1990; PIERANGELI et al., 1992; McNALLY et al., 1995). Já os anticorpos aCL de doenças infecciosas, até esta época descritos, ligam-se à cardiolipina em fase sólida e líquida, na ausência de β_2 GPI. O requerimento, ou não, de β_2 GPI tem sido considerado elemento de clara distinção entre os dois grupos de anticorpos aFL (ORDI et al., 1993; FORASTIERO et al., 1996). Nessa época, os aFL foram divididos em "autoimunes", ou β_2 GPI-dependentes, e, "infecciosos", ou β_2 GPI-independentes. No entanto, esta distinção não tem se mostrado como absoluta (ROUBEY et al., 1995). A literatura é também controversa quanto à participação da β_2 GPI, sendo sugerido

que a própria β_2 GPI expressaria o epítopo contra o qual o anticorpo é dirigido (ROUBEY, 1999).

A β_2 -glicoproteína I (β_2 GPI), presente no plasma, apresenta massa molecular de 50 kDa e está em uma concentração elevada variando entre 50 a 400 mcg/ ml. A proteína é constituída por 326 aminoácidos organizados em 5 domínios repetidos, com “motif” denominado proteína de controle do complemento (CCP) ou superfamília do “domínio-Sushi” (ICHINOSE et al., 1990; KATO; ENJYOJI, 1991). Os domínios I- IV consistem cada um dos 60 aminoácidos. Domínios III e IV são altamente glicosilados contendo, respectivamente, um e três locais de N-glicosilação. O quinto domínio é diferente dos outros domínios, apresenta uma ponte dissulfeto adicional às duas pontes encontradas em cada um dos quatro domínios, em que consiste de 82 aminoácidos contendo um loop hidrofóbico o qual se insere na bicamada da membrana e atua estabilizando a ligação de β_2 GPI à superfície dessa membrana (STEINKASSERER et al., 1992; SCHWARZENBACHER et al., 1999; BOUMA et al., 1999). Estudos têm demonstrado que o domínio V é importante para a ligação de β_2 GPI ao fosfolípídeo e, conseqüentemente, para a expressão da atividade do cofator (LAUER et al., 1993; HUNT; KRILIS, 1994). A ligação de β_2 GPI aos fosfolípídeos poderia gerar um neopítopo entre a proteína e o fosfolípídeo, ou ainda epítomos crípticos na estrutura de β_2 GPI ou do fosfolípídeo, aos quais os anticorpos aFL ligar-se-iam (AMENGUAL et al., 1996).

A β_2 GPI é uma proteína com função inibidora natural da coagulação sanguínea e um importante cofator no teste de aCL. Embora anticorpos aCL sejam considerados marcadores da SAF, em alguns estudos, anticorpos anti- β_2 GPI mostraram maior especificidade diagnóstica Detkova, et al. (1999); Obermoser et al. (2004), e, em 3 a 10% de pacientes com SAF, anti- β_2 GPI pode ser o único teste positivo (EBELING et al., LEE et al., 2003; NASH et al., 2004).

Sendo que a maioria dos estudos sobre SAF revelou uma relação entre os isotipos IgG para anticorpos anti- β_2 GPI e trombose venosa e à falta de associação com isotipo IgM (McNALLY et al.; CABIEDES et al.; CABRAL et al.; MARTINUZZO et al., 1995, SANMARCO et al., 1997; DETKOVA et al., 1999). No entanto, a associação entre os isotipo IgM para anticorpos anti- β_2 GPI e trombose arterial, perda fetal e trombocitopenia também têm sido relatadas na SAF (HORBACH et al., 1996; FALCÓN et al., 1997; STERN et al., 1998; TEIXÍDO et al., 1997; VOSS et al., 2001). De acordo com essas observações, a presença de anticorpos anti- β_2 GPI, independentemente do isotipo (IgG ou IgM), foi incluída

nos critérios laboratoriais para a classificação da síndrome antifosfolípídeos (MIYAKIS et al., 2006).

Na SAF, eventos trombóticos são normalmente associados com o isotipo IgG de anticorpos aCL e anti- β_2 GPI (MOLINA et al., 1997). Os anticorpos anti- β_2 GPI da classe G desempenham importante papel, pois são especificamente dirigidos contra um epítipo de carga positiva, presente no domínio I de β_2 GPI, e correlacionados com trombose, enquanto os anti- β_2 GPI direcionados para outros domínios da molécula não parecem ser patogênicos (LAAT et al., 2005).

Arvieux et al. (2002), mostraram que anticorpos anti- β_2 GP de pacientes com hanseníase são dirigidos contra domínio V de β_2 GPI, enquanto os de pacientes com SAF são dirigidos contra domínio I.

2.8.2 Anticorpos Antifosfolípídeos em Doenças Infecciosas.

As doenças infecciosas com frequência causam dor, impotência funcional de membros, artrite, entesite, lombalgia, lesões de pele e fenômenos trombóticos que se assemelham ao observado em outras enfermidades reumatológicas, inclusive na SAF.

Diversos estudos em doenças infecciosas evidenciam positividade para aFL, como sífilis, malária, tuberculose, hanseníase, em algumas infecções virais como retrovíroses, hepatites, parvovirose B19 e mononucleose (SANTIAGO et al., 1989; LOIZOU et al., 1997; LEROY et al., 1998; De LARRAÑAGA et al., 1999; De LARRAÑAGA et al., 2000; LOIZOU et al., 1997; VON LANDENBERG et al., 2003; HUH et al., 2011; RIBEIRO et al., 2011; BEN-CHETRIT et al., 2013) e após exposição a algumas drogas (CERVERA; ASHERSON, 2003). Nestas condições, usualmente, aFL não estão associados às complicações clínicas atribuídas à SAF, Roubey (1996), sendo frequentemente transitórios e podendo desaparecer com o tratamento da infecção (DE LARRAÑAGA et al., 1999; CARRERAS et al., 2000).

Vários estudos sugerem que anticorpos anti- β_2 GPI seriam marcadores mais específicos de SAF, apresentando maior associação com as complicações típicas da SAF e menor frequência em doenças infecciosas (CABIEDES et al., CABRAL et al.; MARTINUZZO et al., McNALLY et al., 1995; FORASTEIRO et al., 1997; GUERIN et al., 1999).

2.8.3 Anticorpos Antifosfolípídeos em Hanseníase

Os estudos com paciente portadores de hanseníase de anticorpos aFL não mostraram associação entre presença deste anticorpos e manifestações trombóticas (DE LARRAÑAGA et al., 2000; ARVIEUX et al., 2002; LOIZOU et al., 2003; FORASTIERO et al., 2005., RIBEIRO et al., 2011).

2.8.3.1 Anticorpos Anticardiolipina

Anticorpos aCL em pacientes com hanseníase são relatadas em diversos estudos, em frequência variando de 20 a 98% utilizando a técnica de ELISA, principalmente nas formas multibacilares (FURUKAWA et al., 1986; SANTIAGO et al., 1989; HOJNIK et al., THAWANI et al., 1994; FIALLO et al., 1998a, 1998b; De LARRAÑAGA et al., ELBEIALY et al., 2000; REPKA et al., 2001, ARVIEUX et al., 2002; LOIZOU et al., 2003; FORASTIERO et al., 2005, RIBEIRO et al., 2011). Nas formas paucibacilares a positividade relatada foi menor, variando de 7% a 39,5% (THAWANI et al., 1994; REPKA et al., 2001).

Com relação ao isotipo de aCL, ocorre predomínio da classe IgM (SANTIAGO et al., 1989; DE LARRAÑAGA et al., 2000., RIBEIRO et al., 2011). Entretanto, há estudos com maior prevalência do isotipo da classe IgG que foram descritos pelos autores, Thawani et al. (1994); Hojnik et al. (1994); Fiallo et al. (1998b) e, em um único trabalho com pacientes negros da África do Sul, foi encontrada maior prevalência do isotipo IgA (LOIZOU et al., 2003).

Na literatura há dois estudos, um que avaliaram poucos pacientes, todos com a forma clínica *borderline*, nos quais a presença de altos títulos de anticorpos aCL estava associada com risco aumentado de surtos reacionais Fiallo et al. (1998a). No outro estudo foi avaliado um grande número de pacientes com todas as formas clínicas da hanseníase e não foi encontrada essa associação (RIBEIRO et al., 2011).

Ha alguns relatos de casos associando anticorpos aCL do isotipo IgM a fenômenos trombóticos em pacientes com hanseníase (BAKOS et al., 1996; AKERKAR, BICHILE, 2005; AZULAY-ABULAFIA et al., 2006, WALLIN et al., 2009).

2.8.3.2 Anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI)

A literatura mostra estudos discordantes com relação a anticorpos anti- β_2 GPI em pacientes com hanseníase. Alguns estudos referem positividade baixa, como: 18% por Hojnik

et al. (1994) e 2,9 % por Elbeialy et al. (2000), enquanto outros vão de 39 até 89% (DE LARRAÑAGA et al., 2000; ARVIEUX et al., 2002; LOIZOU et al., 2003; FORASTIERO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2011).

O isotipo IgM, foi o mais frequentemente encontrado, por vários autores (DE LARRAÑAGA et al., 2000; LOIZOU et al., 2003; RIBEIRO et al., 2011). Entretanto, Arvieux et al. (2002), estudando pacientes multibacilares da forma VV, não encontraram predomínio de um dado isotipo.

2.8.4 Persistência de Anticorpos Antifosfolipídeos.

Há um relato com persistência de anticorpos anti- β_2 GPI em cinco de seis pacientes com hanseníase por dois anos após a avaliação inicial (ARVIEUX et al., 2002).

Em outras doenças infecciosas a positividade de curta duração do anticorpo aFL tem sido demonstrado, tais como mononucleose infecciosa aguda Ben-Chetrit et al. (2013) e da infecção da hepatite B (HUH et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Pesquisar a associação de autoimunidade em pacientes com hanseníase positivos para anticorpos antifosfolipídeos, visando o desenvolvimento para biomarcadores.

3.2 ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar associação entre os isotipos G e M de imunoglobulinas anticardiolipina (aCL) e anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI) com fenômenos autoimunes;
- 2) Avaliar associação entre os isotipos G e M de imunoglobulinas anticardiolipina (aCL) e anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI) com as características clínicas da hanseníase;
- 3) Verificar a persistência da positividade de IgG e IgM anticardiolipina (aCL) e anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI) em pacientes com hanseníase após o tratamento;
- 4) Validar o uso de isotipos G e M de imunoglobulinas antifosfolipídeos como biomarcadores de fenômenos autoimunes ou formas de hanseníase.
- 5) Verificar fatores que influenciam na a persistência da positividade de IgG e IgM anticardiolipina (aCL) e anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI) em pacientes com hanseníase após o tratamento.

4 METODOLOGIA

A metodologia que foi aplicada neste estudo é do tipo investigatório, que envolveu pacientes portadores de hanseníase e visa gerar conhecimento para aplicação prática dirigida a solução de problemas.

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Em um estudo anterior foram pesquisados anticorpos antifosfolipídeos em 158 pacientes com diagnóstico de hanseníase que faziam seguimento regular no Ambulatório de Dermatologia e Venereologia da Fundação "Alfredo da Matta" (FUAM), na cidade de Manaus, um centro de referência para tratamento da hanseníase no Estado do Amazonas; no período de junho/2004 a outubro/2006. Destes, 77 foram positivos para um dos anticorpos antifosfolipídeos: 25 para o anticorpo aCL, 73 para o anti- β_2 GPI, sendo que 21 apresentaram concomitantemente positividade para anticorpo aCL e anti- β_2 GPI.

Neste estudo, os 77/158 pacientes com diagnóstico de hanseníase foram contactados via telefônica, correio e residenciais, para comparecerem a Fundação Alfredo da Matta, onde foram entrevistados, avaliados e convidados a participar no período de maio/2010 a novembro/2011, conforme fluxograma/Figura 6.

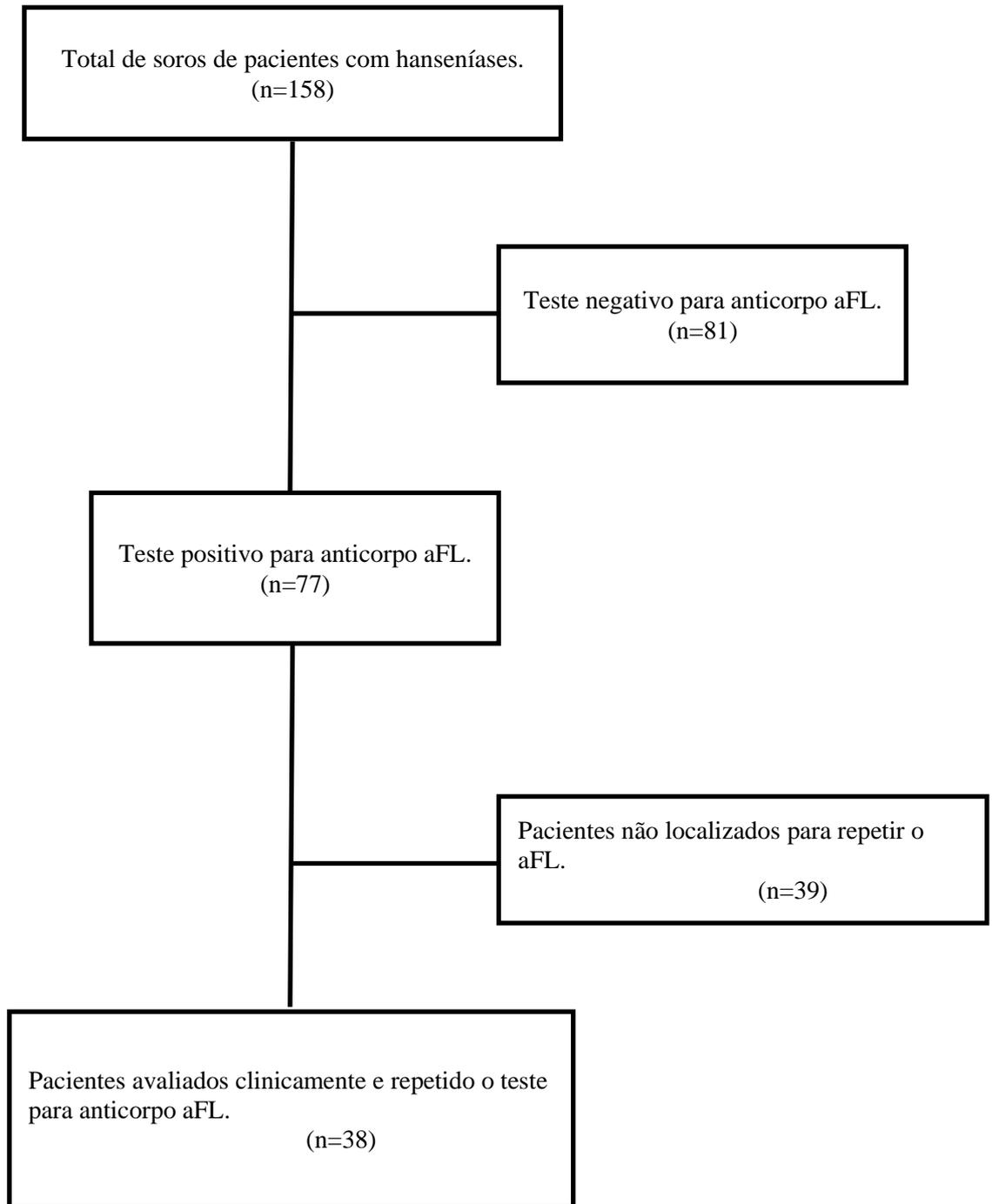


Figura 6- Etapas de seleção dos pacientes para o estudo.

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

4.2 AMOSTRA

Dos 77 pacientes com diagnóstico de hanseníase positivos para um dos anticorpos antifosfolípídeos convidados a participar da segunda fase do estudo, 38 compareceram ao local de estudo e todos preencheram os critérios de inclusão, compondo assim a amostra do estudo.

4.2.1 Critérios de Inclusão

Pacientes com diagnóstico de hanseníase baseado em critérios clínicos, baciloscópico e/ou histopatológico e classificados de acordo com (MADRID, 1953; RIDLEY & JOPLING, 1966).

- ✓ Pacientes que foram positivos para algum dos anticorpos antifosfolípídeos no estudo anterior;
- ✓ Idade acima de 18 anos.

4.2.2 Critérios de Exclusão

- ✓ Pacientes que não comparecerem ao local de estudo.

4.3 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de coorte longitudinal realizado no ambulatório de Dermatologia Tropical da FUAM. Os pacientes que compareceram e concordaram em participar do estudo, foram avaliados e submetidos à anamnese e exame físico detalhado, para caracterizar o tipo de comprometimento articular e se apresentavam manifestações autoimunes tais como artrite, vasculite, eritema nodoso. Todos foram submetidos a exame físico completo e responderam um questionário (apêndice A).

Dados referentes à hanseníase, obtidos por meio de entrevista e da revisão do prontuário, assim como os achados do exame articular e os referentes às manifestações autoimunes, comprometimento clínico e articular foram anotados em uma ficha-protocolo,

que serviu também como formulário para a pesquisa (apêndice A citado) e transferidos para um banco de dados informatizado (programa Excell, 2010, Microsoft®). Especificamente, questionamento sobre antecedentes de trombose vascular (arterial ou venosa), morbidade gestacional e diabetes foi feito a todos os pacientes (apêndice A). Ainda, foi realizada a revisão do prontuário pesquisando a existência de fenômenos trombóticos atuais e no passado.

Importante ressaltar que todos os participantes do estudo assinaram o TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndice B), aprovado pelo Comitê de Ética de Estudos em Humanos da FUAM (anexo A).

4.4 EXAMES LABORATORIAIS

Para a realização dos exames laboratoriais, pesquisa dos anticorpos antifosfolídeos suas classes (IgG e IgM), foram coletados 20 mililitros (mL) de sangue venoso periférico em tubo seco, de todos os participantes. Após centrifugação os soros foram aliquotados, congelados a -20°C no Laboratório da FUAM e posteriormente transportados para o laboratório da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e Imunologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), para realização dos exames.

Os soros coletados em 2004 foram retestados com os soros coletados 2010/2011, em 2012, com o mesmo “Kit” para os anticorpos aCL e anti- $\beta_2\text{GPI}$, para validar os resultados encontrados no exames anterior.

4.4.1 Detecção de Autoanticorpos

a) Anticorpos anticardiolipina (aCL)

Anticorpos anticardiolipina foram pesquisados utilizando a técnica de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), com placas preparadas *in house* de acordo com padronização do laboratório de rotina de disciplina de Reumatologia da UNIFESP (SILVA; ANDRADE, 2004). Inicialmente as placas de ELISA (Polysorp NUNC, USA) foram sensibilizadas com $50\mu\text{L}$ /poço na concentração de $50\mu\text{g}/\text{mL}$ (em etanol) de cardiolipina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e mantidas *overnight* a 4°C . Após, as placas foram bloqueadas por 1h com PBS contendo albumina soro bovino adulto a 10% (BSA/ PBS). A seguir, soros teste e controles diluídos 1:50 em PBS/ BSA foram distribuídos em duplicata ($50\mu\text{L}$ /poço) e as

placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Após três lavagens com PBS, foram adicionados aos poços conjugados anti-IgG ou anti-IgM humanas marcados com fosfatase alcalina (Calbiochem, La Jolla, Califórnia) diluídos 1/4.000 e 1/5.000, respectivamente (50µL/poço). Após 90 minutos de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas, acrescentado o *p*-nitrofenilfosfato (50µL/poço) e mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz por 30 minutos. A leitura foi realizada com espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 450 nm (Labsystems Multiskan MS).

Uma curva de calibração foi construída usando padrões internacionais (*Louisville APL Diagnostics, Inc, Doraville, Estados Unidos. Prod#LAPL-GM100 IgG/IgM Calibrators*) e obtida a equação correspondente. Os valores médios de densidade ótica das amostras foram utilizados nessa equação para obtenção dos resultados em unidades GPL e MPL. Foram considerados positivos para aCL das classes IgG e IgM soros com resultados acima de 20 GPL e de 10 MPL, respectivamente. Estes valores de referência foram obtidos mediante cálculo do percentil 95% de 200 amostras de doadores de sangue analisados no Laboratório de Reumatologia da UNIFESP.

b) Anticorpos anti-β₂ glicoproteína I (anti-β₂GPI)

Anticorpos anti-β₂ glicoproteína I dos isotipos G e M foram detectados por ELISA, utilizando kits comerciais (BINDAZYME Human Anti-β₂GPI IgG e Anti-β₂GPI IgM, *The Binding Site, Birmingham, UK*) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, os soros testes foram diluídos 1:100 no diluente de amostra do kit e 100µL dos soros diluídos e dos padrões, controles positivo e negativo e foram distribuídos nos poços de placas previamente sensibilizadas. Após incubação em temperatura ambiente por 30 minutos, as placas foram lavadas por três vezes. A seguir, foram colocados 100 µL de conjugado (anti-IgG ou anti-IgM) em cada poço e as placas foram novamente incubadas por 30 minutos. Após nova lavagem, 100 µL de substrato (TMB) foram distribuídos em cada poço e as placas foram incubadas 30 minutos ao abrigo da luz. A reação foi então interrompida pela adição de 100 µL da solução de parada a cada poço e as placas foram lidas a 450nm no leitor de placas (Labsystems Multiscan MS).

Uma curva de calibração foi construída usando os padrões do kit e obtida a equação correspondente, que foi usada para converter a densidade ótica das amostras em U/mL. Foram

considerados positivos para anticorpos anti- β_2 GPI IgG os soros com resultados superiores a 20U/mL e para anticorpos anti- β_2 GPI IgM aqueles com resultados superiores a 10U/mL.

Os exames foram realizados no Laboratório da Disciplina de Reumatologia UNIFESP sob a supervisão dos docentes: Neusa Pereira da Silva e Luís Eduardo Coelho Andrade.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado para a análise estatística o Programa R, versão 2.14.0 (Nova Zelândia). Para a análise descritiva dos dados quantitativos foram utilizados a média, mediana, desvio-padrão (DP) e valores mínimos e máximos para variáveis contínuas e proporções para variáveis categóricas. O teste binomial foi utilizado para verificar se havia diferença na distribuição dos dados.

Para avaliar os possíveis fatores que influenciaram para tornar negativo o anticorpo aFL durante o período de observação, utilizou-se para as variáveis categóricas o teste Qui-quadrado de Pearson e para as variáveis contínuas o teste de Mann-Whitney. Utilizou-se regressão logística binária multivariada, no Modelo 1 onde considerou-se a variável categórica aFL (1 = negativo para aFL; 0 = positivo para aFL) como dependente e, como independentes as variáveis sexo (1 = masculino; 2 = feminino), idade (contínua), forma clínica wircchowiana (1 = MHV; 0 = outras formas), uso de prednisona (1 = usou; 0 = não usou), uso de talidomida (1 = usou; 0 = não usou). No Modelo 2 foi utilizado um ajuste para as diferentes doses de talidomida ou prednisona como variáveis contínuas, para avaliar se influenciaram em tornar negativo o aFL. Para a regressão logística foi utilizado o Software MiniTab[®] 16.

Como os pacientes deste trabalho foram avaliados em diferentes tempos de diagnóstico da doença, foi testada a hipótese de que o tempo de persistência dos anticorpos aFL seriam diferentes de acordo com as formas clínicas (VV e outras formas-BT, BB e BV). Considerando como censura a “negativação” dos anticorpos aFL, foi construída a curva da Kaplan-Meier utilizando o método *Log-Rank* de *Mantel-Cox*. Para avaliar diferenças, com ênfases nos primeiros meses, utilizou-se o método de *Grehan-Breslow-Wilcoxon*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Foi utilizado Software GraphPad Prisma 6.02.

5 RESULTADOS

5.1 Dados demográficos e características da hanseníase

Neste estudo participaram 38 pacientes com diagnóstico de hanseníase, com média de idade de $46,42 \pm 16,62$ anos, sendo 28 (73,68%) do sexo masculino e 10 (26,32%) do feminino. O teste de proporções indicou diferença significativa na distribuição de homens e mulheres ($p=0,005$). Episódios reacionais estavam presentes em quatro pacientes (10,53%) no momento do estudo. Destes, três apresentavam eritema nodoso hansênico (ENH) e estavam usando talidomida e prednisona e um com neurite, prednisona/20mg. Em relação à medicação, 18 (47,37%) estavam usando alguma medicação, sendo seis (33,33%) prednisona, quatro (22,22%) TLD e oito (44,44%) as duas medicações (Tabela 1).

Tabela 1- Características demográficas, episódios reacionais e uso de medicação em pacientes portadores de hanseníase.

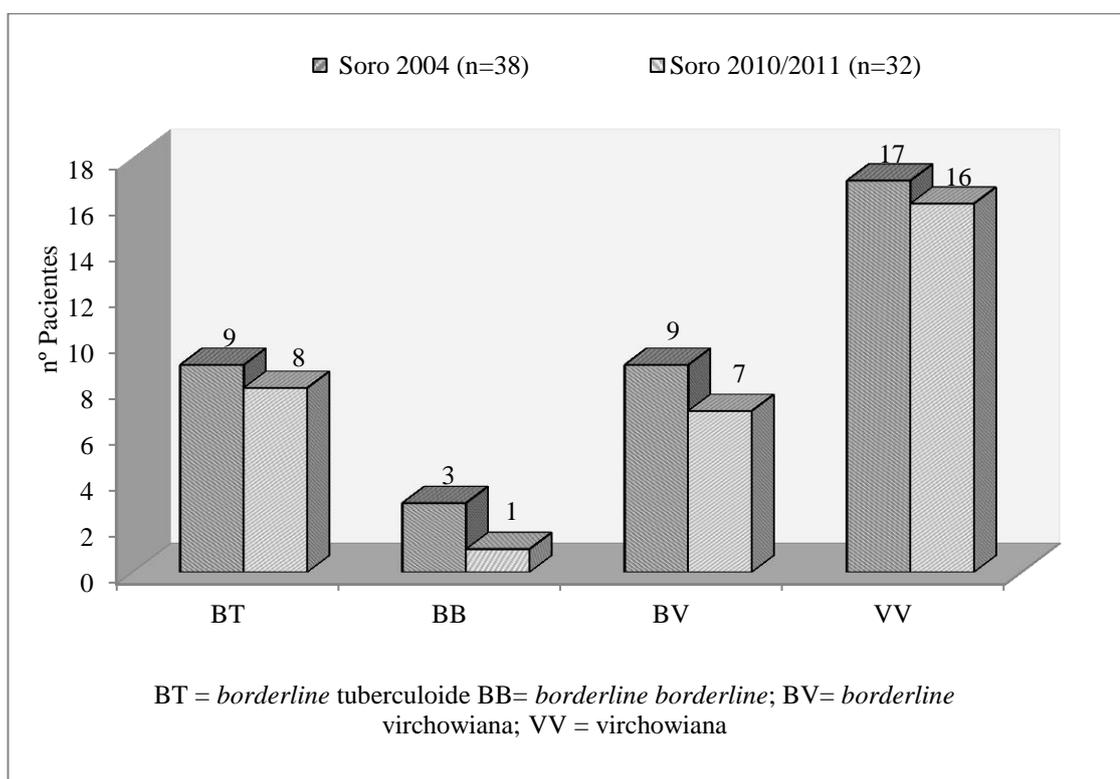
CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES (n=38)	
Idade/anos - média \pm DP*	46,42 \pm 16,62
Sexo	
Masculino	28 (73,68%)
Feminino	10 (26,32%)
Episódios Reacionais	
Presentes	4 (10,53%)
Ausentes	34 (89,47%)
Tipo de Reação	
Eritema nodoso	3 (75,00%)
Neurite	1 (25,00%)
Uso de Medicação	
Sim	18 (47,37%)
Não	20 (52,63%)
Tipo de Medicação	
Talidomida	6 (33,33%)
Prednisona	4 (22,22%)
Talidomida e Prednisona	8 (44,44%)

*DP=desvio padrão

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Diferença significativa foi observada na distribuição das formas clínicas no total de 38 pacientes com hanseníase ($p < 0,001$). A figura 7 mostra a frequência das diferentes formas clínicas da hanseníase nos pacientes, nos quais foram coletados os soros em 2004, 2010 e 2011. Comparando as formas clínicas desses pacientes, virchowiana foi significativamente mais frequente ($p = 0,026$), sendo encontrada em 17 (44,74%) dos pacientes, em 2004 e em 16 (50%) em 2010. As formas BT e BV estavam presentes em nove (23,68%), em oito (25%) e em sete (21,87%) pacientes em 2004, 2010 e 2011, respectivamente.

Figura 7- Distribuição dos pacientes com hanseníase, segundo a classificação da forma clínica dos soros coletados em 2004, 2010 e 2011.



Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Todos os 38 pacientes estavam em alta do tratamento específico com poliquimioterapia (PQT). A média e a mediana calculadas para o tempo de alta foram 78,00 e 67,50 meses, respectivamente, com uma variação de 9 a 174 meses. Uma paciente teve recidiva da doença, em 2009, mas quando o soro foi coletado já estava em alta do tratamento há nove meses.

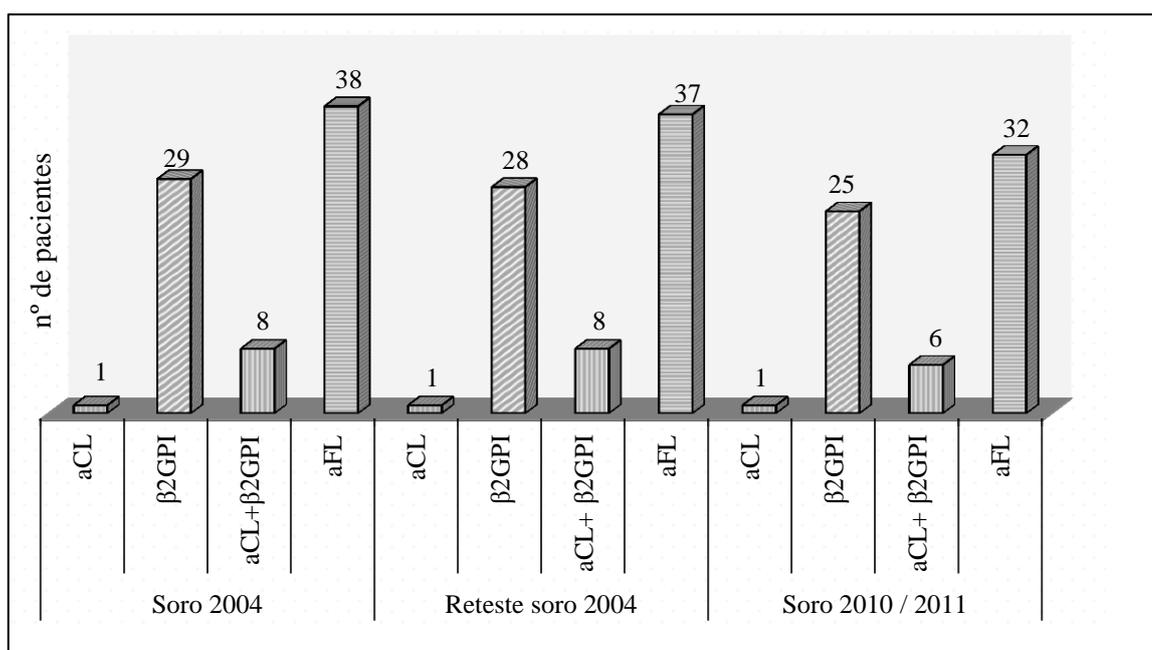
Os cálculos da média e da mediana do intervalo de tempo entre a primeira e a segunda coleta, foram, respectivamente, 66,89 e 66,10 meses, com uma variação de 53,43 e 86,83 meses.

5.2 EXAMES LABORATORIAIS

a) Anticorpos Anticardiolipina (aCL) e Anti- β_2 glicoproteína I (anti- β_2 GPI)

Dos 38 soros positivos para anticorpos aFL no primeiro estudo, foi realizado o reteste nos soros do estudo anterior e o teste da nova coleta (entre 2010 e 2011), sendo todos testados para anticorpos anti- β_2 GPI e 11 para aCL (pacientes que eram positivos em 2004). Nos soros retestados, 37 (97,4%) continuaram positivos para um dos aFL e um (2,6%) negativou, sendo este anteriormente positivo para anti- β_2 GPI. Na nova coleta 32 (84,2%) continuaram positivos e seis (15,8%) ficaram negativos (Figura 8).

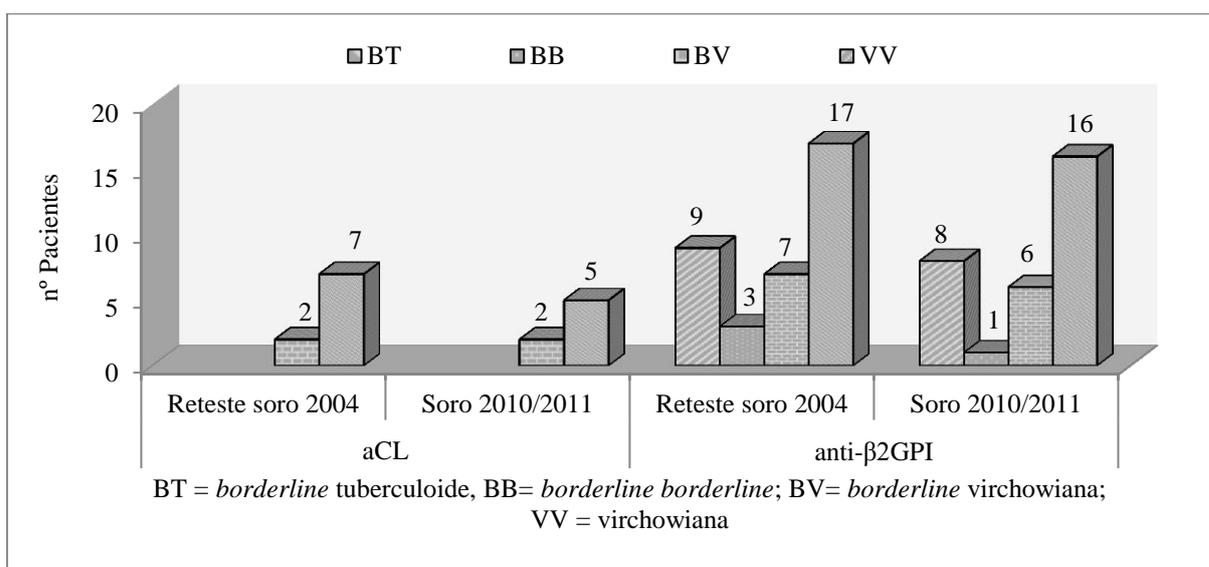
Figura 8 - Positividade de anticorpos aCL e anti- β_2 GPI em diferentes período de coleta de soro nos 38 pacientes com hanseníase.



Fonte: Autor (dados da pesquisa)

O anticorpo aCL foi detectado apenas nos pacientes que apresentavam as formas clínicas BV e VV. Dos sete pacientes positivos para anticorpo aCL, no reteste (soro 2004), com forma clínica VV, dois tornaram-se negativos em 2010/2011. O anticorpo anti- β_2 GPI foi quantificado em pacientes que apresentavam as formas clínicas BT, BB, BV e VV, tanto no reteste (soro 2004) quanto no soro 2010/2011, e observou-se que no soro testado de 2010/2011 houve uma diminuição da positividade em todas as formas clínicas, conforme apresentado Figura 9.

Figura 9 - Positividade de anticorpos aCL e anti- β_2 GPI de acordo com a forma clínica nos pacientes com hanseníase no reteste em 2012 e na nova coleta 2010/2012.



Fonte: Autor (dados da pesquisa)

A distribuição dos isotipos para os anticorpos aCL e anti- β_2 GPI, nos soros testados em 2004, retestados em 2012 e nos soros coletados em 2010/2011, pode ser observada na Tabela 2. O isotipo IgM foi o mais frequente nas três análises dos soros dos pacientes com hanseníase. Dos nove paciente retestados para o anticorpo aCL, sete foram positivos para IgM e dois positivos para IgG e IgM. No soro da nova coleta dois ficaram negativos e sete permaneceram positivos para IgM. No soro dos 37 pacientes retestados para o anticorpo anti- β_2 GPI, 35 foram positivos para imunoglobulina da classe M, um para IgG e IgM (sendo que dos três soros de pacientes que eram positivos para os isotipos G e M, dois tornaram-se negativos para o isotipo G e continuaram positivos para isotipo M) e o soro IgG-positivo ficou negativo. Em relação aos soros da nova coleta (2010/2011), 31 permaneceram positivos para o anti- β_2 GPI, sendo detectado apenas IgM.

Tabela 2 - Positividade de anticorpos aCL e anti- β_2 GPI dos isotipos IgG e IgM nos pacientes com hanseníase em diferentes período de coleta de soro.

Isotipos:	Soro/2004 (n=38)		Reteste-Soro/2004 (n=38)		Soro 2010/2011 (n=38)	
	aCL	Anti- β_2 GPI	aCL	Anti- β_2 GPI	aCL	Anti- β_2 GPI
IgG	0	1	0	0	0	0
IgM	8	33	7	35	7	31
IgG+IgM	1	3	2	1	0	0
Total	9(23,7%)	37(97,4%)	9(23,7%)	36(94,7%)	7(18,4%)	31(81,6%)

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

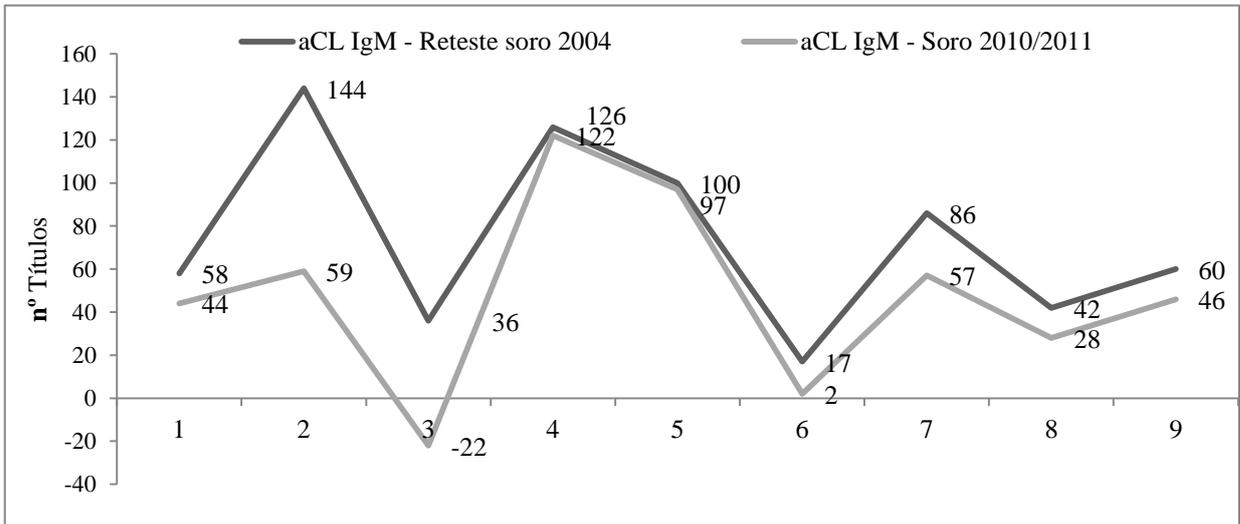
Dos pacientes positivos para anticorpos aCL e/ou anti- β_2 GPI com o isotipo IgM, os níveis médios de concentração de aCL foram de 74,3 U/mL no soro retestado, em 2012, e de 64,6 U/mL no soro 2010/2011. Em relação ao anti- β_2 GPI as concentrações foram de 67,7 e 62,5 U/mL respectivamente, conforme tabela 3.

Tabela 3- Valores dos anticorpos aCL e anti- β_2 GPI por isotipos IgG e IgM nos pacientes com hanseníase no reteste 2012 e nova coleta 2010/2011.

Variáveis	Média U/mL	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
<u>Reteste soro 2004</u>					
aCL IgG	34,0	2,8	34,0	32,0	36,0
aCL IgM	74,3	42,7	60,0	17,0	144,0
anti-β_2GPI IgG	159,0	-	159,0	159,0	159,0
anti-β_2GPI IgM	67,7	95,6	22,5	11,0	357,0
<u>Nova coleta 2010/2011</u>					
aCL IgM	64,7	33,0	57,0	28,0	122,0
anti-β_2GPI IgM	62,5	107,5	16,0	11,0	410,0

Observa-se na Figura 10 que, dos pacientes positivos para anticorpos aCL, todos apresentaram diminuição nas concentrações do isotipo IgM no soro retestado, em 2012, em relação a na nova coleta (2010/2011).

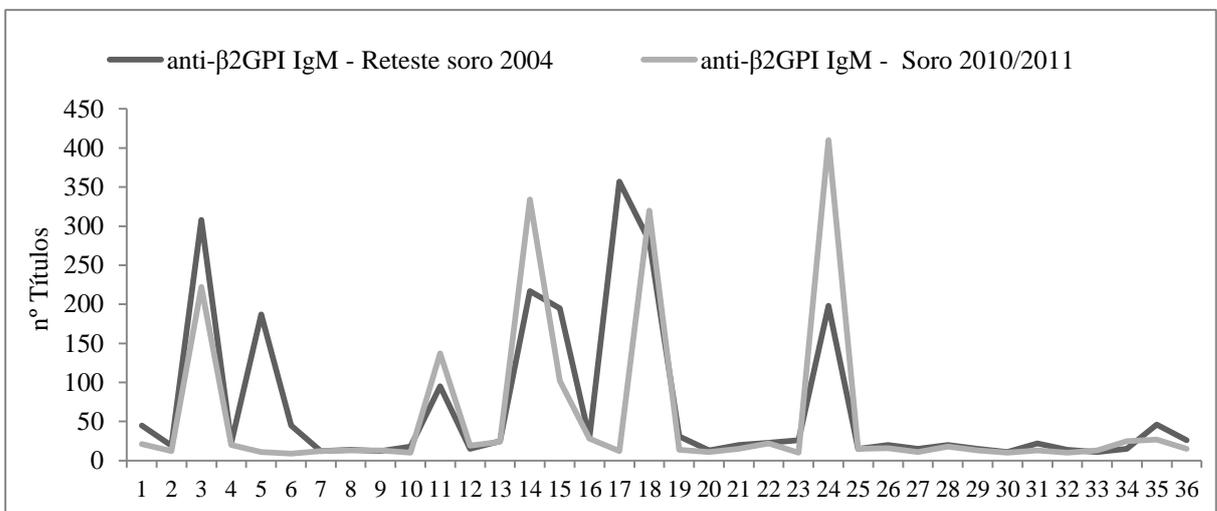
Figura 10 - Positividade de anticorpos aCL do isotipo IgM em diferentes período de coleta de soro.



Fonte: Autor (dados da pesquisa)

O isotipo IgM para o anti- β_2 GPI apresentou variabilidade nos títulos para o isotipo IgM no soro retestado, em 2012, em relação a na nova coleta, conforme Figura 11.

Figura 11 - Positividade de anticorpos anti- β_2 GPI do isotipo IgM em diferentes período de coleta.



Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Dos nove pacientes com hanseníase positivos para anticorpos aCL no reteste, 7/9 (77,8%) apresentaram títulos > 40 U/mL, sendo todos do isotipo IgM e com nível médio de concentração de anticorpos aCL de 88 MPL. Destes, seis (85,7%) permaneceram com títulos de IgM > 40U/mL na nova coleta, com nível médio de anticorpo aCL de 70,8 MPL. Anti- β_2 GPI em títulos de IgM > 40 U/mL foram encontrados em 12|37 (32,4%) dos soros positivos no reteste, sendo um do isotipo IgG (159 U/mL) e 11 do IgM. Sendo que na nova coleta 6|12 (50,0%) continuaram com altas concentrações, conforme tabela 4.

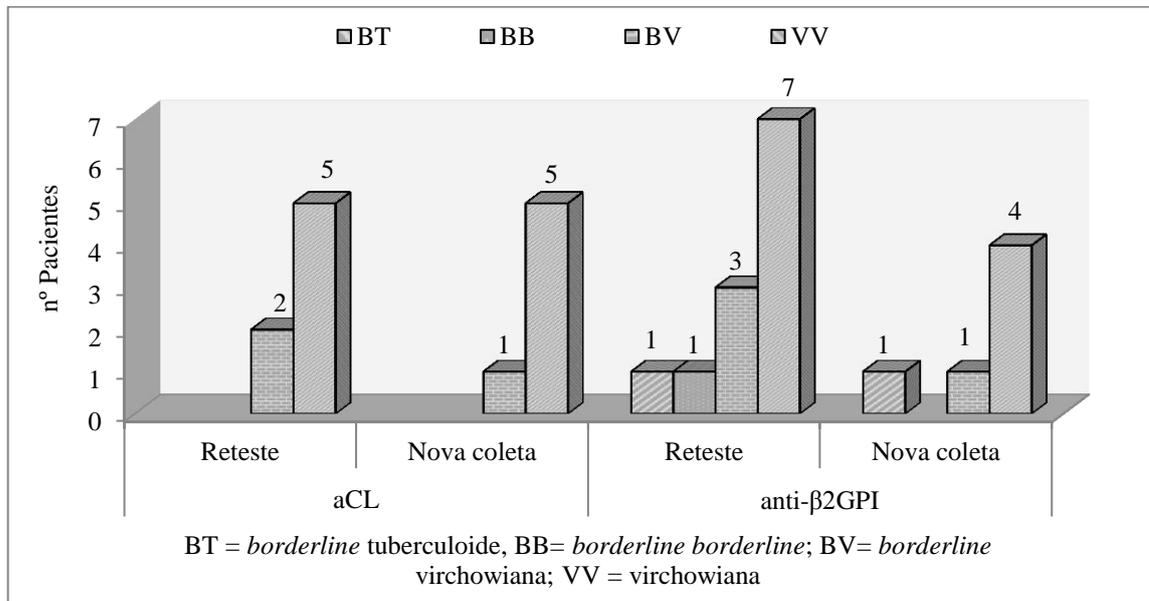
Tabela 4 - Análise dos pacientes com hanseníase positivos para aFL com títulos > 40 U/mL no reteste e na nova coleta.

aFL	Títulos > 40 U/mL					
	N	%	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
aCL						
Reteste soro/2004	7 9	77,8	88,0	86,0	42,0	144,0
Soro 2010/2011	6 7	85,7	70,8	58,0	44,0	122,0
anti- β_2 GPI						
Reteste soro/2004	12 37	32,4	177,7	191,0	45,0	357,0
Soro 2010/2011	6 12	50,0	254,0	271,0	102,0	410,0

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Considerando a distribuição das formas clínicas nos pacientes positivos para anticorpos aFL com títulos > 40 U/mL, foi observado que a forma VV predominou em relação aos anticorpos aCL e anti- β_2 GPI para o reteste e para o soro da nova coleta em 2010/2011 (Figura 12).

Figura 12 - Distribuição das formas clínicas nos pacientes com hanseníase com títulos 40U/mL os para os anticorpos aCL e anti- β_2 GPI em relação ao reteste e a nova coleta.

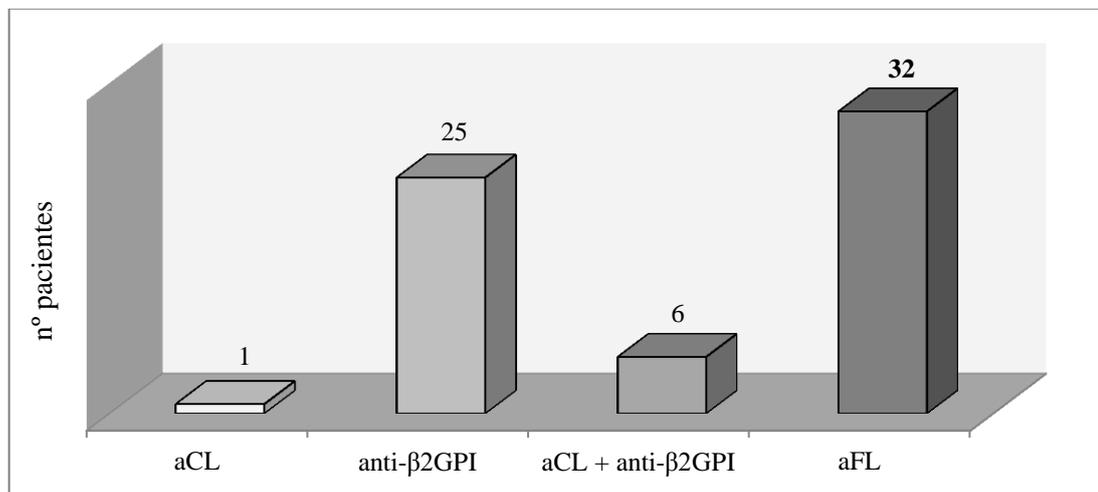


Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Entre os sete pacientes com hanseníase positivos para anticorpos aCL, seis (85,7%) apresentaram concomitantemente anti- β_2 GPI.

Nos soros dos pacientes com hanseníase da nova coleta 2010/2011, 32 (84,2%) apresentavam positividade para pelo menos um dos anticorpos aFL estudados, destes, um (3,1%) foi positivo para anticorpo aCL, 25 (78,1%) para anti- β_2 GPI e 6 (18,8%) para ambos anticorpos, conforme Figura 13.

Figura 13 - Positividade de anticorpos aCL, anti- β_2 GP e aFL nos 32 pacientes com hanseníase.



Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Na nova coleta 2010/2011 dos 38 pacientes com hanseníase, 32 (84,2%) eram positivos para os anticorpos aFL (aCL e anti- β_2 GPI) e seis (15,8%), negativos. Esses pacientes foram comparados quanto as suas características demográficas e clínica, e observou-se que não houve diferença significativa para estas variáveis, conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Análise das características demográficas e clínicas dos 38 pacientes com hanseníase segundo o anticorpo aFL na nova coleta 2010/2011.

Variáveis	aFL (soro 2010/2011)						P
	Negativo		Positivo		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Sexo							0,670*
Masculino	5	83,3%	23	71,9%	28	73,7%	
Feminino	1	16,7%	9	28,1%	10	26,3%	
Idade	37,0 \pm 18,2		48,1 \pm 16,0		46,3 \pm 16,6		0,075**
Tempo de Atendimento	81,2 \pm 18,3		77,4 \pm 36,5		80,0 \pm 34,1		0,389**
Forma Clínica							0,081*
BT	1	16,7%	8	25,0%	9	23,7%	
BB	2	33,3%	1	3,1%	3	7,9%	
BV	2	33,3%	7	21,9%	9	23,7%	
VV	1	16,7%	16	50,0%	17	44,7%	
Episódios reacionais							1*
Presentes	0	0,0%	1	3,1%	3	7,9%	
Ausentes	6	100,0%	31	96,9%	35	92,1%	
Episódios reacionais no momento							1*
Presentes	1	16,7%	3	9,4%	4	10,5%	
Ausentes	5	83,3%	29	90,6%	34	89,5%	
Medicação							0,188*
Não	5	83,3%	15	46,9%	20	52,6%	
Sim	1	16,7%	17	53,1%	18	47,4%	
Prednisona							0,278*
Não	0	0,0%	4	23,5%	4	22,2%	
Sim	1	100,0%	13	76,5%	14	77,8%	
TLD							0,387*
Não	0	0,0%	6	35,3%	6	33,3%	
Sim	1	100,0%	11	64,7%	12	66,7%	

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

* Teste de Qui-Quadrado

** Teste de Mann-Whitney

Em relação às variáveis clínicas nesses 38 pacientes não foi observado diferença significativa entre os pacientes positivos e negativos para os anticorpos aFL de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 - Análise das variáveis clínicas dos 38 pacientes com hanseníase segundo o anticorpo aFL na nova coleta 2010/2011.

Variáveis	aFL (soro 2010/2011)						P
	Negativo		Positivo		Total		
	N	%	n	%	n	%	
Trombose Vascular							1*
Não	6	100,0%	31	96,9%	37	97,4%	
Sim	0	0,0%	1	3,1%	1	2,6%	
Morbidade Gestacional							1*
Não	6	100,0%	31	96,9%	37	97,4%	
Sim	0	0,0%	1	3,1%	1	2,6%	
Diabetes							1*
Não	6	100,0%	30	93,8%	36	94,7%	
Sim	0	0,0%	2	6,3%	2	5,3%	
Tabagismo							0,670*
Não	3	50,0%	20	62,5%	23	60,5%	
Sim	3	50,0%	12	37,5%	15	29,5%	
Etilismo							0,315*
Não	5	83,3%	31	96,9%	36	94,7%	
Sim	1	16,7%	1	3,1%	2	5,3%	

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

* Teste de Qui-Quadrado

Não houve associação entre as características demográficas e clínicas da hanseníase com os títulos para um dos anticorpos aFL, > 40 U/mL (oito - 25,0%) ou ≤ 40 U/mL (24 - 75,0%), nos 32 pacientes. Vide Tabela 7.

Tabela 7 - Análise das características demográficas e clínicas dos 32 pacientes com hanseníase segundo título do anticorpo aFL na nova coleta 2010/2011.

Variáveis	Título aFL Soro 2010/2011						P
	> 40 U/mL		≤ 40 U/mL		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Sexo							1*
Masculino	6	75,0%	17	70,8%	23	71,9%	
Feminino	2	25,0%	7	29,2%	9	28,1%	
Idade		52,6 ± 19,8		46,5 ± 14,7		48,1 ± 15,9	0,571**
Tempo de Atendimento		95,6 ± 44,2		71,3 ± 32,4		77,4 ± 36,5	0,231**
Forma Clínica							0,820*
BT	1	12,5%	7	29,2%	8	25,0%	
BB	0	0,0%	1	4,2%	1	3,1%	
BV	2	25,0%	5	20,8%	7	21,9%	
VV	5	62,5%	11	45,8%	16	50,0%	
Episódios reacionais							1*
Presentes	8	100,0%	23	95,8%	31	96,9%	
Ausentes	0	0,0%	1	4,2%	1	3,1%	
Episódios reacionais no momento							0,554*
Presentes	0	0,0%	3	12,5%	3	9,4%	
Ausentes	8	100,0%	21	87,5%	29	90,6%	
Medicação							0,419*
Não	5	62,5%	10	41,7%	15	46,9%	
Sim	3	37,5%	14	58,3%	17	53,1%	
Prednisona							0,428*
Não	6	75,0%	13	54,2%	19	59,4%	
Sim	2	25,0%	11	45,8%	13	40,6%	
Talidomida							0,670*
Não	6	75,0%	15	62,5%	21	65,6%	
Sim	2	25,0%	9	37,5%	11	34,4%	

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

* Teste de Qui-Quadrado

** Teste de Mann-Whitney

Não houve diferença entre as frequências dos anticorpos aFL, em pacientes com títulos maiores ou menores que 40 U/mL em relação as variáveis clínicas, conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Análise das variáveis clínicas dos 32 pacientes com hanseníase segundo título do anticorpo aFL na nova coleta 2010/2011.

Fatores Associados	Título aFL Soro 2010/2011						P
	> 40 U/mL		≤ 40 U/mL		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Trombose Vascular							1
Não	8	100,0%	23	95,8%	31	96,9%	
Sim	0	0,0%	1	4,2%	1	3,1%	
Total	8	100,0%	24	100,0%	32	100,0%	
Morbidade Gestacional							0,250
Não	7	87,5%	24	100,0%	31	96,9%	
Sim	1	12,5%	0	0,0%	1	3,1%	
Total	8	100,0%	24	100,0%	32	100,0%	
Diabetes							1
Não	8	100,0%	22	91,7%	30	93,8%	
Sim	0	0,0%	2	8,3%	2	6,3%	
Total	8	100,0%	24	100,0%	32	100,0%	
Tabagismo							0,350
Não	5	62,5%	15	62,5%	20	62,5%	
Não, mas já fumou	0	0,0%	5	20,8%	5	15,6%	
Sim	3	37,5%	4	16,7%	7	21,9%	
Total	8	100,0%	24	100,0%	32	100,0%	
Etilismo							1
Não	8	100,0%	23	95,8%	31	96,9%	
Sim	0	0,0%	1	4,2%	1	3,1%	
Total	8	100,0%	24	100,0%	32	100,0%	

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Na tabela 9, utilizando-se o Modelo 1 de regressão logística binária multivariada, foram observadas que as variáveis idade ($p = 0,045$, OR = 0,91 e IC 95% 0,82 - 1,00) e forma clínica virchowiana ($p = 0,034$; OR = 0,02 e IC 95% = 0,0 - 0,76) reduzem as chances dos pacientes tornarem-se aFL negativo. Considerando que a variável idade é contínua, deve-se observar que idades mais avançadas tendem a reduzir a chance do paciente ser negativo para o anticorpo aFL. O uso de prednisona ou talidomida e a dose não influenciou a “negativação”

do aFL, mesmo quando houve ajuste (Modelo 2) pelas doses de prednisona e talidomida ($p = 0,504$; $p = 0,670$, respectivamente).

Tabela 9 - Modelos de regressão logística binária multivariada avaliando fatores prováveis para a “negativação” do aFL em pacientes com hanseníase.

Preditor	IC 95%	Odds Ratio (OR)	p-valor
Modelo 1			
Idade	0,82 - 1,00	0,91	0,045
Sexo	0,0 - 2,84	0,11	0,185
Forma virchowiana	0,0 - 0,76	0,02	0,034
Uso de Prednisona	0,0 - 4,88	0,09	0,237
Uso de Talidomida	0,01 - 14,7	0,44	0,647
Modelo 2			
Idade	0,84 - 1,00	0,92	0,044
Sexo feminino	0,0 - 2,16	0,08	0,134
Forma virchowiana	0,0 - 0,92	0,03	0,044
Dose de Prednisona	0,71 - 1,18	0,92	0,504
Dose de Talidomida	0,95 - 1,03	0,99	0,670

Fonte: Autor (dados da pesquisa) ¹Hosmer-Lemeshow 3.805, $p=0.874$; ²Hosmer-Lemeshow 5.171, $p=0.739$

Para avaliar se o índice baciloscópico inicial influencia na positividade dos anticorpos, utilizou-se a regressão logística binária onde cada anticorpo (aCL ou anti- β_2 GPI) foi inserido no modelo como variáveis dependentes e o índice baciloscópico inicial como variável independente contínua. Na tabela 10 está evidente que o índice baciloscópico inicial influenciou na positividade para os anticorpos aCL ($p = 0,043$; OR = 2,75) e anti- β_2 GPI ($p = 0,044$; OR = 2,46).

Tabela 10 - Regressão logística binária avaliando influencia do índice baciloscópico inicial sobre os anticorpos aFL em 38 pacientes com hanseníase.

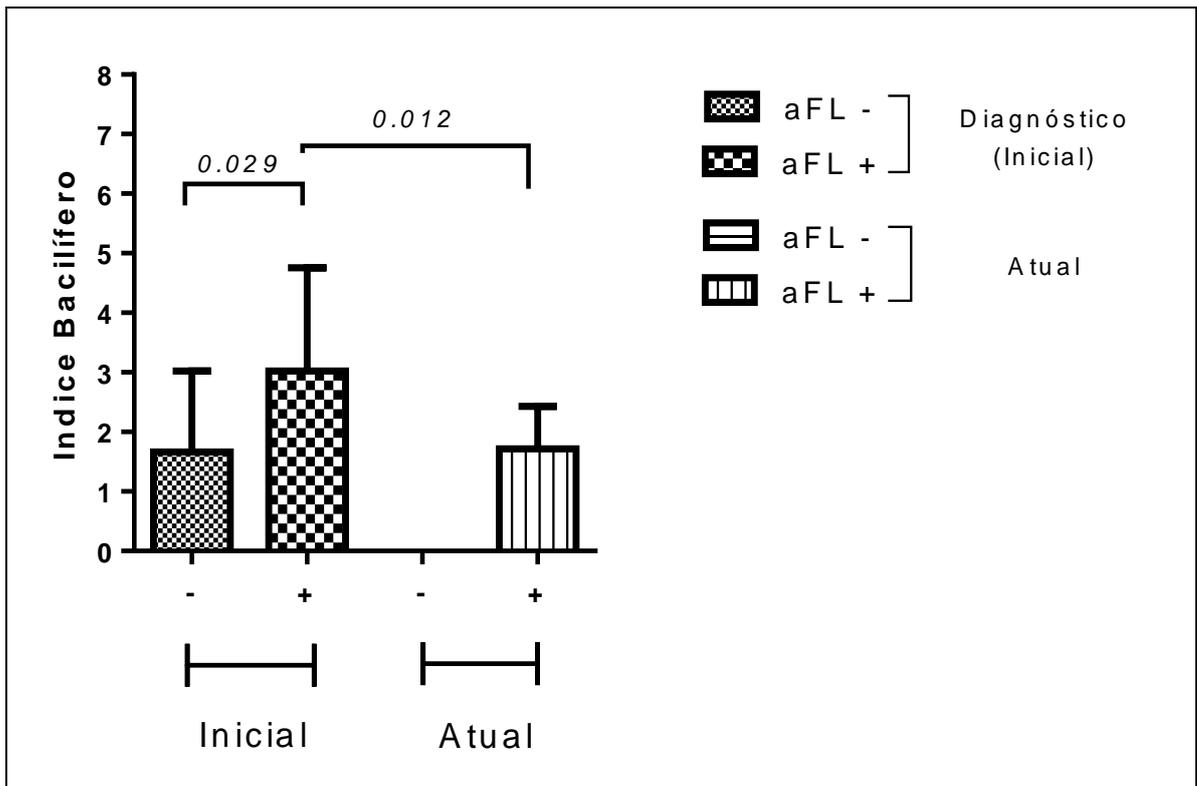
Modelo	IC 95%	Odds Ratio (OR)	p-valor
aCL vs. Índice Baciloscópico Inicial ¹	1,03 - 7,33	2,75	0,043
Anti- β_2 GPI vs. Índice Baciloscópico Inicial ²	1,02 - 5,58	2,46	0,044
aFL vs. Índice Baciloscópico Inicial ³	1,03 - 7,33	2,74	0,044

¹Hosmer-Lemeshow 4.968, $p=0.874$; ²Hosmer-Lemeshow 5.171, $p=0.739$; ³Hosmer-Lemeshow 4.968, $p=0.874$.

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Posteriormente, o índice baciloscópico inicial e atual foram agrupados segundo anticorpo aFL (positivos e negativos), utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$), utilizando-se o teste de Dunn para comparações múltiplas. Na Figura 14 observa-se que o índice baciloscópico no diagnóstico e atual é maior nos indivíduos com anticorpos aFL positivos ($p = 0,029$ e $0,012$, respectivamente).

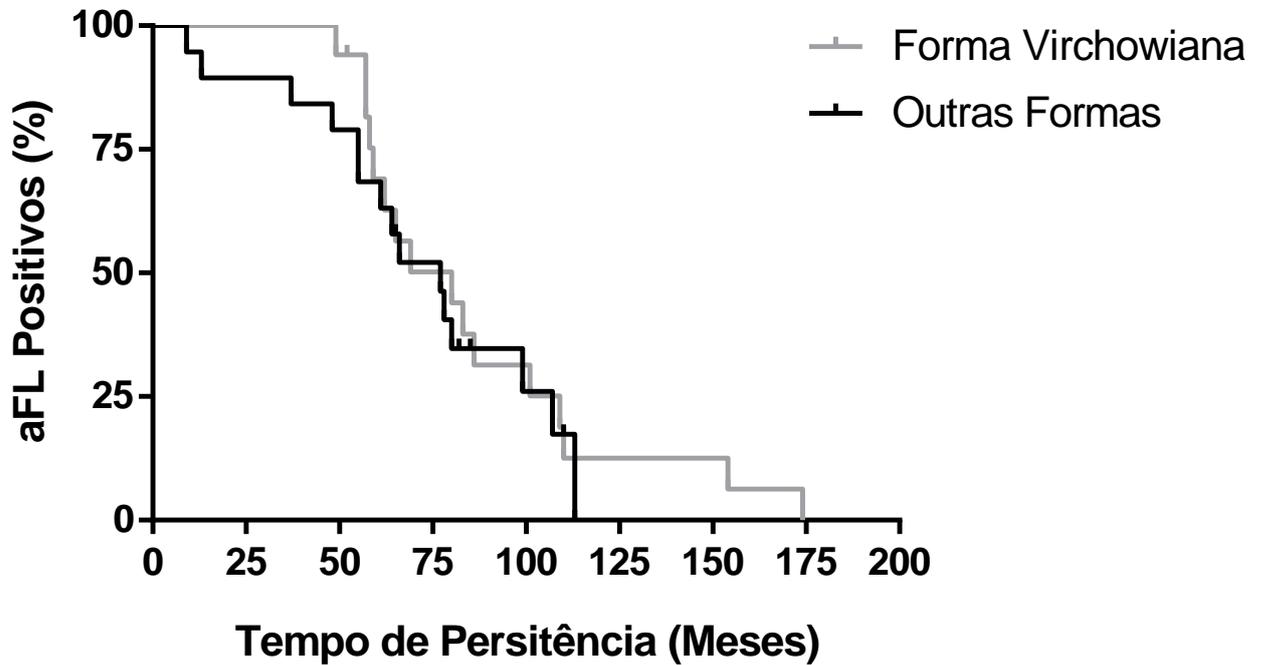
Figura 14 - Índice baciloscópico inicial (soro 2004) e atual (soro 2010/2011) de acordo com os anticorpos aFL em 38 pacientes com hanseníase.



Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Na Figura 15, observa-se a curva de Kaplan-Meier que não apresentou diferença estatística no tempo de persistência dos anticorpos aFL, para a forma clínica VV (mediana de 80 meses) quando comparado com as outras formas da hanseníase - BT, BB e BV (mediana de 77 meses) - (Log-rank Mantel-Cox $p = 0.623$; de Grehan-Breslow-Wilcoxon $p = 0.495$).

Figura 15 - Curva de Kaplan-Meier para comparar a persistência dos anticorpos aFL em relação a forma virchowiana e as outras formas clínicas da hanseníase (BT, BB e BV).



Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Uma tabela completa com as características demográficas e clínicas dos pacientes com hanseníase e os resultados de anticorpos aFL, de 2004 e 2010/2011 estão demonstradas no apêndice C.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado com pacientes ambulatoriais, em um centro de referência para atendimento de hanseníase no Estado do Amazonas, incluindo as diversas formas clínicas, a maioria apresentava a forma multibacilar, sem reação e todos estavam em alta do tratamento específico com PQT por longo tempo, em média 78,0 meses. O intervalo entre a primeira e a segunda coleta de sangue, foi em média de 66,9 meses.

O predomínio do sexo masculino entre os pacientes com hanseníase encontrado em nosso estudo está de acordo com a literatura. Na maioria dos países, as taxas de detecção da doença são maiores nos homens do que nas mulheres, numa proporção de 2:1, exceção feita a alguns países da África (LE GRAND, 1997).

Vários estudos apontam uma frequência aumentada de alguns autoanticorpos em hanseníase, predominantemente na forma VV, multibacilar, e menos frequente na forma TT (CHAVEZ-LEGASPI et al., 1985; GARCIA-DE LA TORRE, 1993; NAAFS, OTTENHOFF, 1994; RIBEIRO et al., 2009).

Anticorpos antifosfolipídeos constituem um grupo heterogêneo de autoanticorpos descritos em diversas doenças autoimunes, particularmente na SAF primária e no LES, estando frequentemente associados a fenômenos trombóticos e morbidade gestacional (ASHERSON, CERVERA, 2003). Porém, em doenças infecciosas anticorpos aFL normalmente não estão associadas com coagulopatia (ROUBEY, 1996).

Anticorpos aFL têm sido também descritos em várias doenças infecciosas. Tais anticorpos estão frequentemente presentes durante hepatites B e C, retrovírus e em algumas infecções bacterianas como hanseníase e sífilis (SANTIAGO et al., 2001; DE LARRAÑAGA et al., 1999; LOIZOU et al.; 2003; RIBEIRO et al., 2011). O significado clínico de anticorpos aFL associados a diversas infecções é controverso. Em muitos estudos a presença desses anticorpos associados às infecções tem sido considerada como não patogênica (CERVERA, ASHERSON, 2005; AVCIN, TOPLAK, 2007). Entretanto alguns autores, mostram complicações tromboembólicas relacionadas aos aFL em pacientes com doenças infecciosas Blank, Shoenfeld (2004), como hepatite C Kida et al. (2009), citomegalovírus (LABARCA et al., 1997; ABGUEGUEN et al., 2003; LADD et al, 2009; ABGUEGUEN et al., 2010) e na hanseníase (BAKOS et al., 1996; AKERKAR, BICHILE, 2005; BROCHADO et al., 2010). No entanto, os mecanismos que levam ao desenvolvimento de anticorpos aFL e suas possíveis implicações fisiopatológicas, em pacientes com infecções, não têm sido bem estabelecidos.

Na vigência de um processo infeccioso, anticorpos aFL poderiam ser induzidos por sutís distúrbios da regulação da imunidade humoral e celular ou, alternativamente, seu desenvolvimento poderia ser decorrente da exposição à moléculas próprias de fosfolipídeos, durante o processo inflamatório subsequente à infecção. Atualmente, a hipótese mais aceita para o surgimento anticorpos aFL patogênicos é que as infecções constituem um gatilho, para a indução desses anticorpos, pelo mimetismo molecular, em indivíduos geneticamente predispostos (SHOENFELD et al., 2000; LOIZOU et al., 2003; BLANK, SHOENFELD, 2004). Nesse caso, na vigência de uma infecção, peptídeos de origem bacteriana ou viral, de sequência homóloga a peptídeos da molécula de β_2 GPI seriam apresentados por células dendríticas aos linfócitos T que iriam estimular linfócitos B a produzirem anticorpos contra a sequência heteróloga, os quais reagiriam de modo cruzado com a β_2 GPI do indivíduo (BLANK, SHOENFELD, 2004; SHOENFELD, et al., 2006).

Em nosso estudo, a frequência de anticorpos aFL nos pacientes com hanseníase foi maior na forma multibacilar VV, geralmente sem manifestações clínicas relacionados à SAF, como já referido em vários estudos (DE LARRAÑAGA et al., 2000; ARVIEUX et al., 2002; LOIZOU et al., 2003; FORASTIERO et al., 2005; RIBEIRO et al., 2011). No entanto, não foi encontrada associação entre positividade para anticorpos aFL e episódios reacionais, corroborando os dados de outro estudo (RIBEIRO et al., 2011). Entretanto, um único trabalho com poucos pacientes encontrou esta associação (FIALLO et al., 1998a).

Nos pacientes foi observada, predominância do isotipo IgM para a positividade de anticorpos aFL (aCL e anti- β_2 GPI), nos dois momentos nos soros testados, corroborando os dados de alguns autores (DE LARRAÑAGA et al., 2000; LOIZOU et al., 2003, RIBEIRO et al., 2011). Entretanto, há estudos com maior prevalência do isotipo da classe G para anticorpo aCL (THAWANI et al., 1994; HOJNIK et al., 1994; FIALLO et al., 1998b). E outro estudo em pacientes da África do Sul, foi encontrada maior prevalência do isotipo IgA (LOIZOU et al., 2003). Para anticorpo anti- β_2 GPI somente um estudo não foi encontrado predomínio para IgM (ARVIEUX et al., 2002).

Alguns autores afirmam que os anticorpos aFL na infecção são frequentemente transitórios podendo desaparecer após o tratamento (DE LARRAÑAGA et al., 1999; CARRERAS et al., 2000). No entanto, quando 158 pacientes com hanseníase foram acompanhados observou-se que a positividade de anticorpos aFL não sofreu influência do tempo de alta da PQT, persistindo em títulos elevados meses e anos após término do tratamento (RIBEIRO et al., 2011). Não foram encontradas evidências sugestivas de que a presença de anticorpos aFL constitua um fenômeno transitório. Por isso, foi decidido fazer um

estudo com segmento longitudinal com esses pacientes para avaliar a persistência desses autoanticorpos.

Na revisão da literatura não foram encontradas referências com desenho semelhante ao deste estudo em hanseníase ou em outras doenças infecciosas. Portanto, este é o primeiro estudo relatando a persistência de anticorpos aFL em um grande número de pacientes com hanseníase com diferentes formas clínicas e após um longo período de acompanhamento: 38 pacientes por mais de cinco anos. Estudo anterior, de Arvieux e colaboradores (2002), avaliou a persistência do anti- β_2 GPI em apenas seis pacientes com hanseníase, testados após dois anos. Positividade por curto período para anticorpos aFL, foi observada em outras doenças infecciosas, tais como a mononucleose Ben-Chetrit et al. (2013), e na forma aguda da hepatite B (HUH et al., 2011).

No presente estudo, a persistência da positividade para pelo menos um dos anticorpos aFL (aCL ou anti- β_2 GPI circulantes) foi encontrada em 32 (84,2%) dos 38 pacientes com hanseníase, e seis (18,8%) desses pacientes apresentavam positividade para ambos os anticorpos (aCL e anti- β_2 GPI) sendo todos do isotipo IgM. No entanto, os que eram positivos, na primeira coleta, para isotipo IgG não permaneceram positivos no teste da nova coleta (2010/ 2011). Portanto, não houve persistência de IgG e, com isso, não foi possível quantificar os subtipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que inicialmente era um dos objetivos de nosso estudo para identificar biomarcadores para SAF na hanseníase.

Persistência foi observada em pacientes com hanseníase, com predomínio da forma VV, que apresentavam títulos maiores que 40U/mL (77,8% para aCL e 32,4% para anti- β_2 GPI), nos soros coletados em 2010/2011. Apesar de títulos elevados do isotipo IgM e longo tempo de persistência de anticorpos aFL, não foi encontrada associação com eventos trombóticos, confirmando dados da literatura (ARVIEUX et al., 2002) . No entanto, há alguns relatos de casos de hanseníase associados aCL do isotipo IgM, mas o significado clínico destes anticorpos ainda não está claro nesta doença (BAKOS et al., 1996; AKERKAR, BICHILE, 2005; AZULAY-ABULAFIA et al., 2006, WALLIN et al., 2009).

Na literatura, autores relatam a importância desta associação de títulos elevados de anticorpos aFL, para o isotipo IgM, com as manifestações clínicas de SAF (FALCÓN et al., 1997; TEIXIDÓ et al., 1997; STERN et al., 1998; WILSON et al., 1999; VOSS et al., 2001). Com isso, presença de anticorpos anti- β_2 GPI, do isotipo IgM foi adicionado como critério sorológico para a classificação de SAF (MIYAKIS et al., 2006).

Linfócitos B1 ou da Zona Marginal do Baço (BZM) são componentes do sistema imune

inato, que possuem receptores de linfócitos B (BCR) com a região hipervariável codificada na linhagem germinativa. Esses linfócitos secretam predominantemente imunoglobulinas da classe M polireativas com pouca especificidade e baixa afinidade, capazes de se ligarem fracamente a patógenos e estruturas do próprio organismo, tendo, portanto, potencial de defesa e autoimunidade (MILNER et al., 2005). Esses anticorpos polireativos são estimulados por antígenos não peptídicos em uma forma T-independente. As micobactérias são ricas em moléculas glicolípídeos capazes de interagir com o sistema imune inato. O glicolípídeo fenólico I (PGL-I) é uma desses agentes, abundantes e preenchendo as características de um mitógeno para linfócito B1 (SPENCER; BRENNAN, 2011). O fato de o isotipo IgM ser persistente sugere que os anticorpos aFL, principalmente aCL, originam-se de resposta imune T-independente, associada ao reconhecimento de antígenos não peptídicos por parte dos Linfócitos B1 e B2M. Esses antígenos em geral incluem açúcares e glicolípídeos que geram anticorpos IgM de baixa afinidade e que raramente induzem o *switch* de classe para IgG.

Considerando que a cardiolipina é um fosfolípídeo de membrana de bactérias, incluindo as micobactérias, é provável que na forma clínica VV, com índice bacilar mais alto, fosfolípídeos da membrana do *Mycobacterium leprae* estejam sendo reconhecidos na fase extracelular (liberação durante necrose celular?) por Linfócitos B1 ou da zona marginal do baço (antígenos na corrente sanguínea), estimulando a produção contínua de IgM. É interessante notar que o complemento pode ser ativado em razão da presença do *M. leprae* nos tecidos com a produção de C3d elemento necessário à ativação do Linfócito B. Desse modo, desde que a oferta de antígenos persista a produção de IgM (aCL ou anti- β_2 GPI) tende a persistir. É também curioso que bactérias presentes no intestino e no trato urinário como *Escherichia coli* contenham cardiolipina na sua constituição de membrana, o que sugere a possibilidade de anticorpos naturais aCL IgM em indivíduos saudáveis.

Vários estudos sugerem que anticorpos contra a β_2 GPI seriam marcadores mais específicos de SAF, apresentando maior associação com as complicações típicas da SAF e menor frequência em doenças infecciosas (CABIDES et al., MARTINUZZO et al., McNALLY et al., 1995; FORASTEIRO et al., 1997; GUERIN et al., 1999). Na hanseníase, há um estudo em camundongos, no qual os autores demonstraram que anti- β_2 GPI, isolados de pacientes portadores da doença, não foram trombogênicos e apresentaram efeito pró-inflamatório (FORASTIERO et al, 2011). No presente estudo foi encontrada alta frequência de persistência da positividade para anti- β_2 GPI (81,6%), mas sem associação com as complicações típicas da SAF.

Estudo de Arvieux et al. (2002), com pacientes de hanseníase sem SAF mostrou que anticorpos anti- β_2 GPI são dirigidos contra os domínios V de β_2 GPI, enquanto aqueles de pacientes com SAF são dirigidos contra o domínio I. De Laat et al. (2005), mostrou que os anticorpos IgG reconhecem um epítopo em domínio I de β_2 GPI, incluindo as posições G40 - R43, havendo associação com história de trombose e um teste anticoagulante lúpus positivo. Domínio I comporta-se como um epítopo críptico, sendo exposto de maneira conformacional sempre que o β_2 GPI é submetido a estresse oxidativo ou de outra natureza (GIANNAKOPOULOS et al., 2012; DE GROOT; URBANUS, 2012).

A troca do aminoácido leucina (Leu) pela valina (Val), no códon 247, no domínio V da β_2 GPI, pode ocasionar mudança conformacional na proteína, induzindo a produção de anticorpos anti- β_2 GPI, observado na SAF. Os pacientes que apresentam homozigose Val247Val possuem maior risco de desenvolver fenômenos tromboembólicos que caracterizam a SAF (LOIZOU et al., 2003; PRIETO et al., 2003; YASUDA et al., 2005; CHAMORRO et al., 2012). Brochado e colaboradores (2010), mostraram variações polimórficas da β_2 GPI em pacientes com hanseníase e concluíram que as substituições Leu247Val e Trp316Ser podem representar fatores de risco genético para a produção de anti- β_2 GPI em pacientes multibacilares.

No presente trabalho, como foi detectada a persistência dos anticorpos aFL foram analisados alguns fatores que poderiam contribuir para este achado, tais como: características demográficas, clínicas da hanseníase e as manifestações tromboembólicas comparando os pacientes que eram positivos e negativos para anticorpos aFL, e não houve influência nos resultados, mesmo quando avaliamos os valores dos títulos de anticorpos > 40 U/mL ou ≤ 40 U/mL.

Em razão de algumas variáveis, como forma clínica ($p=0,081$), idade ($p=0,075$) e tratamento ($p= 0,188$) terem apresentado tendência de associação estatística, considerando-se como critério para tendência estatística $p<0,2$ (RIFFEENBURG, 2012). Foi realizada a análise com regressão logística múltipla com ajuste para o sexo e, desta forma, foi observada que a persistência dos anticorpos aFL é influenciada pela idade, forma clínica VV e índice baciloscópico.

Os dados mostraram que idades mais avançadas tendem a aumentar a chance do paciente ser positivo para o anticorpo aFL, talvez por exposição cumulativa maior a antígenos da micobactéria e antígenos de outras infecções (ou pela senescência do sistema imune que impede a eliminação total da micobactéria).

Pela Curva de Kaplan-Meier não foi observada diferença da persistência dos anticorpos aFL na forma VV e em relação às outras formas clínicas (BT, BB e BV) provavelmente devido ao pequeno número de pacientes incluídos no estudo.

Está evidente que o índice baciloscópico inicial influenciou na positividade para os anticorpos aFL. É plausível supor que *Mycobacterium leprae* persiste em forma inativa ou latente no corpo humano, mesmo após o tratamento, principalmente em indivíduos na forma clínica VV, os quais apresentam uma resposta supostamente T_H2 . A latência é um fato bem aceito para as micobactérias, como sugerido pela "reativação" da tuberculose quando uma pessoa infectada e "curada" é submetida a forte imunossupressão (GUPTA et al, 2012). Espiroquetas, Borrelia e vírus, particularmente da família Herpesviridae também o fazem (ALBERT et al., 1999; WHITE et al., 2012). A ocorrência do episódio reacional e o uso prolongado de prednisona e/ou talidomida suporta a persistência do patógeno, ainda que inativo, e sugerem discreta interação com o sistema imune. Não se sabe onde o *Mycobacterium leprae* pode situar-se: dentro macrófagos? em células Schawnn? De qualquer forma um modo de comunicação deve ser estabelecido entre o patógeno e o sistema imune.

Em conclusão, aFL do isotipo M são frequentes e persistente por longo período em pacientes com hanseníase, como na SAF, entretanto sem associação com as manifestações tromboembólicas. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o porquê dessa persistência; o papel desses anticorpos aFL no curso da doença; e as linhagens de linfócitos B responsáveis pela produção desses anticorpos. Esses conhecimentos poderão contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos imunológicos subjacentes ao controle da relação do *Mycobacterium leprae* com o hospedeiro humano.

7 CONCLUSÕES

1. Anticorpos aFL (aCL ou anti- β_2 GPI) são persistentes, por um longo período, em pacientes com hanseníase assim como na SAF.
2. A persistência para anticorpos aCL e anti- β_2 GPI foi com predomínio do isotipo IgM .
3. Não houve associação entre positividade e persistência para os anticorpos aFL e presença de episódios reacionais.
4. A persistência de anticorpos aFL foi influenciada pela idade do paciente, a forma clínica virchowiana e o índice baciloscópio. Outras características clínicas e demográficas não apresentaram associação.
5. A positividade ou negatividade do teste para anticorpos aFL não foram associadas a ocorrência de fenômenos tromboembólicos, que não foram registrados em ambos os grupos.

8 REFERÊNCIAS

ABGUEGUEN P, DELBOS V, DUCANCELLE A, JOMAA S, FANELLO S, PICHARD E. Venous thrombosis in immunocompetent patients with acute cytomegalovirus infection: a complication that may be underestimated. **Clin Microbiol Infect.** 2010, 16(7):851-4.

ABGUEGUEN P, DELBOS V, CHENNEBAULT JM, PAYAN C, PICHARD E. Vascular thrombosis and acute cytomegalovirus infection in immunocompetent patients: report of 2 cases and literature review. **Clin Infect Dis.** 2003, 1; 36(11):134-9.

AKERKAR, S.M; BICHILE L.S. Leprosy & gangrene: a rare association; role of anti-phospholipid antibodies. **BMC Infect Dis.** 2005; 5:74.

ALBERT S, SCHULZE J, RIEGEL H, BRADE V. Lyme arthritis in a 12-year-old patient after a latency period of 5 years. **Infection.** 1999; 27(4-5):286-8.

ALBERT, D.A; WEISMAN, M.H; KAPLAN, R. The rheumatic manifestations of leprosy (Hansen disease). **Medicine (Baltimore).** 1980; 59(6):442-8.

ALCOCER J.; HERRERA, R.; LAVALLE C.; GUDIÑO J. Fraga A. Inflammatory arthropathy in leprosy. **Arthritis Rheum.** 1979; 22:587.

AMENGUAL, O.; ATSUMI, T.; KHAMASHTA, M.; HUGHES, G. Clinical significance of anti-beta 2-glycoprotein I antibodies. **Ann. Med. Interne (Paris).** 1996, 147, suppl.1:15-7.

ARVIEUX, J.; RENAUDINEAU, Y.; MANE, I; PERRAULT, R.; KRILIS, S.A, YOUINOU, P. Distinguishing features of anti-beta2 glycoprotein I antibodies between patients with leprosy and the antiphospholipid syndrome. **Thromb Haemost.** 2002; 87(4):599-605.

ASHERSON, R.A, CERVERA, R. Antiphospholipid antibodies and infections. **Ann Rheum Dis.** 2003; 62(5):388-93.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**, Informação e documentação: trabalhos acadêmicos (Estrutura/Normalização). Rio de Janeiro, 2011, 3. ed. 17-03, p.5.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6022**: informação e documentação (Resumo\Abstract) elaboração. Rio de Janeiro, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação (Referências) elaboração. Rio de Janeiro, 2005.

ATKIN, S.L.; EL-GHOBAREY, A.; KAMEL M.; OWEN, J.P.; DICK, W.C. Clinical and laboratory studies of arthritis in leprosy. **BMJ.** 1989; 298:1423-5.

ATKIN, S.L.; WELBURY, R.R; STANFIELD, E.; BEAVIS, D.; IWAIS, B.; DICK, W.C.; Clinical and laboratory studies of inflammatory polyarthritis in patients with leprosy in Papua New Guinea. **Ann Rheum Dis**. 1987; 46(9):688-90.

ATTIA E.A; ABDALLAH M.; SAAD, A.A; AFIFI, A.; EL TABBAKH, A.; EL-SHENNAWY, D.; et al. Circulating CD4 + CD25 high FoxP3 + T cells vary in different clinical forms of leprosy. **Int J Dermatol**. 2010; 49(10):1152-8.

AVCIN T, TOPLAK N. Antiphospholipid antibodies in response to infection. **Curr Rheumatol Rep**. 2007; 9:212-218.

AZULAY-ABULAFIA, L.; PEREIRA SPINELLI, L.; HARDMANN, D.; KAWA KAC, B.; LEVY, R.A.; TALHARI, C.; RUZIICKA, T.; Lucio-Phänomen Vaskulitis oder okklusive Vaskulopathie? **Hautarzt**. 2006; 57(12):1101-5.

BAKOS, L.; CORREA, C.C.; BERGMANN, L.; BONAMIGO, R.R.; MULLER, L.F. Antiphospholipid antibodies thrombotic syndrome misdiagnosed as Lucio's phenomenon. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. 1996; 64(3):320-3.

BEN-CHETRIT, E.; WIENER-WELL, Y.; FADEELA, A.; WOLF, D.G. Antiphospholipid antibodies during infectious mononucleosis and their long term clinical significance. **J Clin Virol**. 2013-Jul; 56(4):312-5.

BLANK M, SHOENFELD Y. Beta-2-glycoprotein-I, infections, antiphospholipid syndrome and therapeutic considerations. **Clin Immunol**. 2004; 112:190-9.

BOLETIM EPIDEMIOLOGICO. Manaus: Fundação Alfredo da Matta (anual), 2012.

BONFÁ, E.; LLOVET, R.; SCHEINBERG, M.; SOUZA, J.M.; ELKON, K.B. Comparison between autoantibodies in malaria and leprosy with lupus. **Clin Exp Immunol**. 1987; 70(3): 529-37.

BONVOISON B, MARTIN JM., BOUVIER M, BOCQUET M, BOULLIAT J, DUIVON JP. Les manifestations articulaires de la lepre. **Sem Hôp Paris**. 1983;9:302-5.

BOUMA, B.; de GROOT, P.G.; VAN DEN ELSEN, J.M.; et al. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. **Embo J**. 1999; 18: 5166-5174.

BRASIL/SINAN/DATASUS/MS. Secretaria de Vigilância: **Guia de vigilância epidemiológica**. 7ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. São Paulo. 2012. p. 436.

BREIGUELMAN, B. Genética e Hanseníase. **Ciência & Saúde**. 2002, 7:117-28.

BRITTON, W.J, LOCKWOOD DN. **Leprosy**. **Lancet**. 2004; 363 (9416):1209-19.

BRITTON, W.J. Immunology of leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1993; 87(5): 508-14.

BROCHADO, M.J.; FIGUEIREDO JF, MENDES-JUNIOR CT, LOUZADA-JUNIOR P, KIM OM, ROSELINO AM. Correlation between beta-2-glycoprotein I gene polymorphism and anti-beta-2 glycoprotein I antibodies in patients with multibacillary leprosy. **Arch Dermatol Res.** 2010; 302(8):583-91.

CABIEDES, J.; CABRAL, A.R.; ALARCÓN-SEGOVIA D. Clinical manifestations of the antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus associate more strongly with anti-beta 2-glycoprotein I than with Antiphospholipid antibodies. **J Rheumatol.** 1995; 22: 1899-906.

CABRAL, A.R.; CABIEDES, J.; ALARCÓN-SEGOVIA D. Antibodies to phospholipid-free beta 2-glycoprotein-I in patients with primary antiphospholipid syndrome. **J Rheumatol.** 1995; 22(10):1894-8.

CARRERAS, L.O.; FORASTIERO, R.R.; MARTINUZZO, M.E.; Which are the best biological markers of the antiphospholipid syndrome? **J Autoimmun.** 2000; 15(2):163-72.

CERVERA, R.; ASHERSON, R.A. Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics. **Immunobiology.** 2005; 210:735-41.

CERVERA, R.; ASHERSON, R.A. Clinical and epidemiological aspects in the antiphospholipid syndrome. **Immunobiol.** 2003; 207(1): 5-11.

CHAMORRO, A.J.;MARCOS, M.;MIRÓN-CANELO, J.A.; CERVERA R.;ESPINOSA G. Val247Leu β 2-glycoprotein-I allelic variant is associated with antiphospholipid syndrome: systematic review and meta-analysis. **Autoimmun Rev.** 2012;11(10):705-12.

CHAVEZ-LEGASPI, M.; GOMEZ-VASQUEZ, A.; GARCÍA-DE LA TORRE I. Study of rheumatic manifestations and serologic abnormalities in patients with lepromatous leprosy. **J Rheumatol.** 1985; 12(4):738-41.

COSSERMELLI-MESSINA, W.; FESTA NETO, C.; COSSERMELLI, W. Articular Inflammatory manifestations in patients with different forms of leprosy. **J Rheumatol.** 1998; 25(1):111-9.

CUA D.J; TATO C.M. Innate IL17 - Producing cells: The sentinels of the immune system. **Nat Rev Immunol** 2010. 10(7): 479-89.

DA MOTTA-PASSOS, I.; MALHEIRO, A.; GOMES, N.F.; DE SOUZA PASSOS, LF.; RIBEIRO, DE B.C.C.; DA GRAÇA, S.C.M.; PÔRTO, DOS S.M.; VILLAROUÇO, S. G.A.; SILVA, F.L.; DE PAULA, L. Decreased RNA expression of interleukin 17A in skin of leprosy. **Eur J Dermatol.** 2012; 22(4):488-94.

DACAS, P.; PICANSO M.; MOUCHAILEH, G.; PERCEGONA, L.; SCHULTZ, M.T.; SILVA, MGB.; SKARE, T.L. Auto-anticorpos e manifestações reumáticas em pacientes com mal de Hansen. **An Bras Dermatol.** 2000; 75(5): 553-61.

DE GROOT, P.G.; URBANUS, R.T. The significance of autoantibodies against β 2-glycoprotein I. **Blood.** 2012; 120(2):266-74.

DE LAAT, H.B., DERKSEN, R.H.; URBANUS, R.T; DE GROOT, P.G. IgG antibodies that recognize epitope Gly 40-Arg43 in domain I of beta2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. **Blood**. 2005; 105:1540-45.

DE LARRAÑAGA, G.F.; FORASTEIRO, R.R.; MARTINUZZO, M.E.; CARRERAS, L.O.; TSARIKTSIAN, G.; STURNO, M.M.; ALONSO, B.S. High prevalence of antiphospholipid antibodies in leprosy: evaluation of antigen reactivity. **Lupus**. 2000; 9(8): 594-600.

DE LARRAÑAGA, G.F.; FORASTIERO, R.R., CARRERAS, L.O., ALONSO, B.S. Different types of antiphospholipid antibodies in AIDS: a comparison with syphilis and the antiphospholipid syndrome. **Thromb Res**. 1999; 96(1):19-25.

DE SOUZA, S.J.; LARA, F.A., AMADEU, T.P., DE OLIVEIRA, F.T., DA COSTA NERY, J. A.; SAMPAIO, E.P.; PINHEIRO, R.O.; AND SARNO, E.N. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 165(2):251-63.

DE VRIES, R.R.; Genetic control of immunopathology induced by *Mycobacterium leprae*. **Am J Trop Med Hyg**. 1991; 44(4, part 2)12-6.

DETKOVA, D.; GIL-AGUADO, A.; LAVILLA, P.; CUESTA, M.V.; FONTAN, G.; PASCUAL-SALCEDO, D. Do antibodies to beta2-glycoprotein 1 contribute to the better characterization of the antiphospholipid syndrome? **Lupus**. 1999; 8: 430-8.

DHOPLE, A.M. Possible autoimmune phenomenon in leprosy. **Jpn J Exp Med**. 1972; 42(2):125-9.

EBELING, F.; PETTERSSON, T.; MUUKKONEN, L.; VAHTERA, E.; RASI, V. Beta-2-glycoprotein I antibodies in patients with thrombosis. **Scand J Clin Lab Invest**. 2003; 63: 111-8.

EDINGTON, F.L.; BACELLAR, M.O.; MACHADO, P.R.; BARBOSA, L.; REIS, E.; REIS, M.; SANTIAGO, M.B. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in leprosy. **Clin Rheumatol**. 2007; 26(2):208-10.

ELBEIALY, A.; STRASSBURGER-LORNA, K.; ATSUMI, T.; BERTOLACCINI, M.L.; AMENGUAL, O.; HANAFI, M.; KHAMASHTA, M.A.; HUGHES, G.R. Antiphospholipid antibodies in leprosy: a correlation with disease manifestations. **Clin Exp Rheumatol**. 2000; 18(4):492-4.

FALCÓN CR, MARTINUZZO ME, FORASTIERO RR, CERRATO GS, CARRERAS LO. Pregnancy loss and autoantibodies against phospholipid-binding proteins. **Obstet. Gynecol**. 1997; 89: 975-80.

FIALLO, P.; NUNZI, E.; CARDO, P.P. Beta2-glycoprotein I-dependent anticardiolipin antibodies as risk factor for reactions in borderline patients. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. 1998a; 66(3):387-8.

FIALLO, P.; TRAVAGLINO, C.; NUNZI, E.; CARDO, P.P. β 2-glycoprotein I-dependence of anticardiolipin antibodies in multibacillary leprosy patients. **Lepr Rev.** 1998b; 69(4):376-81.

FINE, P.E. Leprosy: The epidemiology of a slow bacterium. **Epidemiol. Rev.** 1982; 4:161-88.

FLEURY, R.N. Dificuldade no emprego da classificação de Ridley e Jopling: uma análise morfológica. **Hansen. Int.** 1989;14(2):101-6.

FORASTIERO R, MARTINUZZO M, DE LARRANAGA G, VEGA-OSTERTAG M, PIERANGELI S. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies from leprosy patients do not show thrombogenic effects in an in vivo animal model. **J Thromb Haemost.** 2011; 9 (4):859-61.

FORASTIERO, R.; MARTINUZZO, M.; KORDICH, L.; CARRERAS, L. Reactivity to beta 2 glycoprotein I clearly differentiates anticardiolipin antibodies from antiphospholipid syndrome and syphilis. **Thromb Haemost.** 1996; v.75, p. 717-20.

FORASTIERO, R.R.; MARTINUZZO, M.E.; CERRATO, G.S.; KORDICH, L.C.; CARRERAS, L.O. Relationship of anti beta2-glycoprotein I and anti prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. **Thromb Haemost.** 1997; 78(3): 1008-14.

FORASTIERO, R.R.; MARTINUZZO, M.E.; DE LARRAÑAGA, G.F. Circulating levels of tissue factor and proinflammatory cytokines in patients with primary antiphospholipid syndrome or leprosy related antiphospholipid antibodies. **Lupus.** 2005; 14(2): 129-36.

FOSS, NT. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **An Bras. Dermatol.** 1999; 74:113-9.

FURUKAWA, F.; KASHIHARA, M.; IMAMURA, S.; OHSHIO, G.; HAMASHIMA, Y. Evaluation of anti-cardiolipin antibody and its cross-reactivity in sera of patients with lepromatous leprosy. **Arch Dermatol Res.** 1986; 278(4): 317-9.

GALLI, M.; COMFURIUS, P.; MAASSEN, C.; HEMKER, H.C.; DE BAETS, M.H.; VAN BREDA-VRIESMAN, P.J.; BARBUI, T.; ZWAAL, R.F.; BEVERS, E.M.I. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. **Lancet.** 1990; 335: 1544-7.

GARCIA-DE LA TORRE I. Autoimmune phenomena in leprosy, particularly antinuclear antibodies and rheumatoid factor. **J Rheumatol.** 1993; 20(5):900-3.

GIANNAKOPOULOS B.; GAO L, QI M, WONG JW, YU DM, VLACHOYIANNOPOULOS PG, MOUTSOPOULOS HM, ATSUMI T, KOIKE T, HOGG P, QI JC, KRILIS SA. Factor XI is a substrate for oxido reductases: enhanced activation of reduced FXI and its role in antiphospholipid syndrome thrombosis. **J Autoimmun.** 2012; 39(3):121-9.

GUEDES BARBOSA, L.S.; GILBRUT, B.; SHOENFELD, Y.; SCHEINBERG, M.A. Autoantibodies in leprosy sera. **Clin Rheumatol.** 1996; 15(1): 26-8.

GUEDES-BARBOSA, L.S.; MANGUEIRA, C.; SCHEINBERG, M. Anticitrulline peptide antibodies (CCP3) in leprosy sera: a negative association. **Clin Rheumatol.** 2008; 27(4):515-6.

GUERIN, V.; RYMAN, A.; COUCHOURON, A. Transitory anti-beta2-glycoprotein I antibodies in infections. **Lupus.** 1999; 8(6):490-1.

GUPTA, A.; KAUL, A.; TSOLAKI, AG.; KISHORE, U.; BHAKTA, S. Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. **Immunobiology.** 2012; 217(3):363-64.

HARRIS, N.E.; GHARAVI, A.E & BOEY, M.L. Clinical and serological features of the "antiphospholipid syndrome" (APS). **Br J Rheumatol.** 1987; 26:19.

HOJNIK, M.; GILBURD, B.; ZIPOREN, L.; BLANK, M.; TOMER, Y.; SCHEINBERG, M.A.; TINCANI, A.; ROZMAN, B.; SHOENFELD, Y. Anticardiolipin antibodies in infections are heterogenous in their dependency on beta 2-glycoprotein I: analysis of anticardiolipin antibodies in leprosy. **Lupus.** 1994; 3(6):515-21.

HOLLA, V.V.; KENETKER, M.V.; KOLHATKAR, M.K.; KULKARIN, C.N. Leprous synovitis. A study of fifty cases. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1983; 51(1):29-32.

HORBACH, D.A.; VAN OORT E., DONDEERS R.C.; DERKSEN, R.H.; DE GROOT, P.G. Lupus anticoagulant is the strongest risk factor for both venous and arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus. **Thromb. Haemost.** 1996; 76(6): 916-24.

HUH, J.Y.; Y.I.; D.Y.; HWANG, S.G.; CHOI, J.J.; KANG, M.S. Characterization of antiphospholipid antibodies in chronic hepatitis B infection. **Korean J Hematol.** 2011; 46:36-40.

HUNT, J.; KRILIS, S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies. **J. Immunol.** 1994, v.152, p. 653-9.

ICHINOSE, A.; BOTTENUS, R.E; DAVIE, E.W. Structure of transglutaminases. **J. Biol. Chem.** 1990, v.265, p.13411-4.

JOPLING, W.H.; MACDOUGALL, A.C. Reações leproáticas. In: Jopling WH, MacDougall AC **Manual de Hanseníase Atheneu.** 1991 p. 89-98: 4ª ed. Rio de Janeiro.

KARAT, A.B.; KARAT, S.; JOB, C.K.; FURNESS, M.A. Acute exudative arthritis in leprosy-rheumatoid-arthritis-like syndrome in association with erythema nodosum leprosum. **Br Med J.** 1967; 3:770-2.

KATO, H.; ENJYOJ, I.K. Amino acid sequence and location of the disulfide bonds in bovine beta 2 glycoprotein I: the presence of five Sushi domains. **Biochemistry.** 1991; 30: 11687-94.

KIDA, Y.; MAESHIMA E.; YAMADA Y. Portal vein thrombosis in a patient with hepatitis C virus-related cirrhosis complicated with antiphospholipid syndrome. **Rheumatol Int.** 2009;29:1495-8.

KRUTZIK, S.R.; TAN, B.; LI, H.; OCHOA, M.T.; LIU, P.T.; SHARFSTEIN, S.E.; GRAEBER, T.G.; SIELING, P. A.; LIU, Y.J.; REA, TH.; BLOOM, B.R. AND MODLIN, R.L. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat. Med.** 2005.11(6): 653-60.

LABARCA J.A.; RABAGGLIATI R.M.; RADRIGAN F.J.; ROJAS P.P.; PEREZ C.M.; FERRES M.V.; ACUNA GG; BERTIN PA. Antiphospholipid syndrome associated with cytomegalovirus infection: case report and review. **Clin Infect Dis.** 1997; 24:197-200.

LADD A.M.; GOYAL R.; ROSAINZ L.; BAIOTTO P.; DI FABRIZIO L. Pulmonary embolism and portal vein thrombosis in an immunocompetent adolescent with acute cytomegalovirus hepatitis. **J Thromb Thrombolysis.** 2009; 28(4):496-9.

LAUER, S.; HEMPEL, U.; GRIES, A.; FRANK, K. Amino acid sequence of the region of beta 2-glycoprotein 1 (gp1) which mediates binding of autoantibodies to the cardiolipin-gp1 complex in humans. **Immunology.** 1993.80: 22-8.

LE GRAND A. Women and leprosy: a review. **Lepr Rev.** 1997; 68(3):203-11.

LEE, D.J.; SIELING, P.A.; OCHOA, M.T.; KRUTZIK, S.R.; GUO, B.; HERNANDEZ, M.; REA, T.H.; CHENG, G.; COLONNA, M.; AND MODLIN, R.L. LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. **J. Immunol.** 2007, 179(12): 8128-36.

LEE, E.Y.; LEE, C.K.; LEE, T.H.; CHUNG, S.M.; KIM, S.H.; CHO, Y.S.; YOO, B.; MOON, H.B. Does the anti-beta 2-glycoprotein I antibody provide additional information in patients with thrombosis? **Thromb Res.** 2003; 111: 29-32.

LELE, R.D.; SAINANI, G.S.; SHARMA, K.D. Leprosy presenting as rheumatoid arthritis. **J Assoc Physicians India.** 1965; 13:275-7.

LEROY, V.; ARVIEUX, J.; JACOB, M.C.; MAYNARD-MUET, M.; BAUD, M.; ZARSKI, J.P. Prevalence and significance of anticardiolipin, anti-beta2 glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in chronic hepatitis C. **Br J Haematol.** 1998; 101(3):468-74.

LIENHARDT, C.; FINE, P.E. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? **Lepr Rev.** 1994; 65(1):9-33.

LOCKWOOD, D.N.J. The management of erythema nodosum leprosum: Current and future options (Editorial). **Leprosy Review.** 1996; 67: 253-59.

LOIZOU, S.; CAZABON, J.K.; WALPORT, M.J.; TAIT, D.; SO, A.K. Similarities of specificity and cofactor dependence in serum antiphospholipid antibodies from patients with human parvovirus B19 infection and from those with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** 1997; 40(1):103-08.

LOIZOU, S.; SINGH, S.; WYPKEMA, E.; ASHERSON, R.A. Anticardiolipin, anti-beta (2)-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies in black South African patients with infectious disease. **Ann Rheum Dis**. 2003; 62(11):1106-11.

Madrid Congress Number. **Int J Lepr**. 1953; 21(4):504-10.

MAEDA, Y., GIDOH, M., ISHII, N., MUKAI, C., AND MAKINO, M. Assessment of cell mediated immunogenicity of Mycobacterium leprae-derived antigens. **Cell Immunol**. 2003; 222(1), 69-77.

MAIDEN, M.C. **Nat Genet**, 2009 41(12):(1264-6) Putting Leprosy on the map.

MANOUSSAKIS, M.N.; TZIOUFAS, A.G.; SILIS, M.P; PANGE, P.J.E.; GOUDEVENOS, J.; MOUTSOPOULOS, H.M. High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. **Clin. exp. Immunol**. 1987, 69: 557-565.

MARAZZI, G. Reumatismo inflamatorio in corso di lebbra. [Inflammatory rheumatism during leprosy]. **Reumatismo**, 1962; 14:39-43.

MARTINUZZO, M.E.; FORASTEIRO, R.R.; CARRERAS, L.O. Anti beta 2 glycoprotein I antibodies: detection and association with thrombosis. **Br J Haematol**. 1995; 89(2):397-402.

MASSONE, C.; NUNZI, E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; TALHARI, C.; TALHARI, S. SCHETTINI, A.P. et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? **Am J Dermatopathol**. 2010; 32(3):251-6.

MATSUURA, E.; IGARASHI, Y.; FUJIMOTO, M.; ICHIKAWA, K.; KOIKE, T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. **Lancet**. 1990; 336:177-8.

MCADAM, K.P.W.J.; MUDD, D.; SHOENFELD, Y. Autoantibodies to DNA in leprosy: Antigenic similarities between DNA and mycobacterial phospholipids defined by human monoclonal antibodies. **Int J Lepr (Suppl)**. 1984; 52:597.

MCNALLY, T.; PURDY, G.; MACKIE, I.J.; MACHIN, S.J.; ISENBERG, D.A. The use of an anti-beta2-glycoprotein-I assay for discrimination between anticardiolipin antibodies associated with infection and increased risk of thrombosis. **Br J Haematol**. 1995; 91(2): 471-3.

MCNEIL, H.; CHESTERMAN, C.; KRILIS, S. Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies. **Adv. Immunol**. 1991, 49;193-280.

MCNEIL, H.P.; SIMPSON, R.J.; CHESTERMAN, C.N.; KRILIS, AS. Anti-phospholipid antibodies are direct against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta-2-glycoprotein I (apolipoprotein H). **Proc Natl Acad Sci USA**. 1990; 87: 4120-4.

MEDINA F.; CAMARGO A.; MORENO J.; ZONONA-NACACH A.; ACEVES-AVILA J.; FRAGA A. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in Leprosy. **Br J Rheumatol**. 1998; 37(3):270-3.

MILLER, R.A. WENER, M.H.; HARNISCHI, J.P.; GILLILAND, B.C. The limited spectrum of antinuclear antibodies in leprosy. **J. Rheumatol.** 1987; 14(1): 108-10.

MILNER E.C.; ANOLIK J.; CAPPIONE A.; SANZ I. Human innate B cells a link between host defense and autoimmunity? **Springer Semin Immunopathol.** 2005; 26(4):433-52.

MISSI S.M.; ALMEIDA NETO E.; SCHAF S.; GONÇALVES C.R.; RODRIGUES C.J.; MARGARIDO L.C. Contribuição ao estudo das artrites específicas em pacientes hansenianos. **Rev Hosp. Clin Fac Med São Paulo.** 1985; 40(1): 22-6.

MIYAKIS, S.; LOCKSHIN, M.D.; ATSUMI, T.; BRANCH, D.W.; BREY, R.L.; CERVERA, R.; DERKSEN, R.H.; DE GROOT, P.G.; KOIKE, T.; MERONI, P.L.; REBER, G.; SHOENFELD, Y.; TINCANI, A.; VLACHOYIANNOPOULOS, P.G.; KRILIS, S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). **J Thromb Haemost.** 2006; 4(2):295-306.

MODLIN, R. L., HOFMAN, F. M., HORWITZ, D. A., HUSMANN, L. A., GILLIS, S., TAYLOR, C. R., AND REA, T. H. In situ identification of cells in human leprosy granulomas with monoclonal antibodies to interleukin 2 and its receptor. **J. Immunol.** 1984;132(6), 3085-90.

MODLIN, R.L. The innate immune response in leprosy. **Curr Opin Immunol.** 2010; 22(1): 48-54.

MODLIN, R.L.; MELANCON-KAPLAN, J.; YOUNG, S.M.; PIRMEZ, C.; KINO, H.; CONVIT, J.; REA, T.H.; BLOOM, B.R. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc Natl Acad Sci (USA).** 1988; 85 (4): 1213-7.

MODLIN, R.L.; REA, T.H. Leprosy: new insight into an ancient disease. **J Am Acad Dermatol.** 1987; 17(1):1-13.

MOLINA, J.F.; GUTIERREZ-UREÑA, S.; MOLINA, J.; URIBE, O.; RICHARDS, S.; DE CEULAER, C.; GARCIA, C.; WILSON, W.A.; GHARAVI, A.E.; ESPINOZA, L.R. Variability of anticardiolipin antibody isotype distribution in 3 geographic populations of patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatol.** 1997; 24(2):291-6.

MOUBASHER, A.D.; KAMEL, N.A.; ZEDAN, H.; RAHEEM, D.D. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. **Int J Dermatol.** 1998; 37(10):733-40.

NAAFS, B. Leprosy reactions. **Trop Geogr Med.** 1994; 46(2): 80-4.

NASH, M.J.; CAMILLERI, R.S.; KUNKA, S.; MACKIE, I.J.; MACHIN, S.J.; COHEN, H. The anticardiolipin assay is required for sensitive screening for Antiphospholipid antibodies. **J Thromb Haemost.** 2004; 2: 1077-81.

NOUSSITOU, F.M.; SANSARRICK, H.; WALTER, J. Leprosy in children. WHO. **Geneva: witzerland**, 1976, 28p.

OBERMOSER, G.; BITTERLICH, W.; KUNZ, F.; SEPP, N.T. Clinical significance of anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies. **Int Arch Allergy Immunol.** 2004; 135(2): 148-53.

OPROMOLLA, D.V.A. **Noções de Hanseonologia.** 2. ed. Bauru: Centro de Estudos. Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

ORDI, J.; SELVA, A.; MONEGAL, F.; PORCEL, J.; MARTINEZ-COSTA, X.; VILARDELL, M. Anticardiolipin antibodies and dependence of a serum cofactor. A mechanism of thrombosis. **J. Rheumatol.** 1993; 20:1321-4.

OTTENHOFF, THM. Immunology of leprosy: lessons from and for leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1994; 62(1):108-21.

PEREIRA, H.L.; RIBEIRO, S.L.; PENNINI, S.N.; SATO, E.I. Leprosy related joint involvement. **Clin Rheumatol.** 2009; 28(1): 79-84.

PERNAMBUCO, J.C.A. Artropatia inflamatória hansênica: estudo clínico-evolutivo, laboratorial e radiográfico [tese]. São Paulo: **Escola Paulista de Medicina**; 1998.

PETRI, M. Epidemiology of the Antiphospholipid Antibody Syndrome. **Review Article Journal of Autoimmunity.** 2000; 15:145-51.

PIERANGELI, S.S.; HARRIS, E.N.; DAVIS, S.A.; DE LORENZO, G. Beta 2-glycoprotein 1 (beta 2GP1) enhances cardiolipin binding activity but is not the antigen for antiphospholipid antibodies. **Br J Haematol.** 1992; 82(3):565-70.

PRADHAN, V.; BADAKERE, S.S.; SHANKAR KUMAR, U. Increased incidence of cytoplasmic ANCA(c-ANCA) and other autoantibodies in leprosy patients from western India. **Lepr Rev.** 2004; 75 (1): 50-6.

PREVEDELLO, F.C.; MIRA, M.T. Hanseníase: uma doença genética? **Anais Brasileiros de Dermatologia.** 2007, 82(5): 451-9.

PRIETO, G.A.; CABRAL, A.R.; ZAPATA-ZUÑIGA, M.; SIMÓN, A.J.; VILLA A.R.; ALARCÓN-SEGOVIA, D.; CABIEDES, J. Valine/valine genotype at position 247 of the beta2 glycoprotein I gene in Mexican patients with primary antiphospholipid syndrome: association with anti-beta2 glycoprotein I antibodies. **Arthritis Rheum.** 2003;48(2):471-4.

REPKA, J.C.D.; SKARE, T.L.; SALLES, G. JR.; PAUL, G.M. Anticorpo anticardiolipina em pacientes com mal de Hansen. **Rev Bras Reumatol.** 2001; 41(1):1-6.

RIBEIRO, S.L.; PEREIRA, H.L.; SILVA, N.P.; NEVES, R.M.; SATO, E.I. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in leprosy patients with articular involvement. **Braz J Med Biol Res.** 2008; 41 (11) :1005-10.

RIBEIRO, S.L.; PEREIRA, H.L.; SILVA, N.P.; SOUZA, A.W.; SATO, E.I. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies are highly prevalent in a large number of Brazilian leprosy patients. **Acta Reumatol Port.** 2011; 36(1): 30-7.

RIBEIRO, S.L.E.; PEREIRA, H.L.A.; SILVA, N.P.; SATO, E.I. Autoantibodies in leprosy patients, with and without joint involvement, in the state of Amazonas. **Bras J Rheumatol.** 2009;49 (5):547-61.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H: Classification of Leprosy according to immunity. A five group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** 1966; 34(3):255-73.

RIDLEY, M.J.; RIDLEY, D.S. The immunopathology of erythema nodosum leprosum: the role of extravascular complexes. **Lepr Rev.** 1983; 54(2):95-107.

RIFFEENBURG, R. H. **Statistics in Medicine.** 3^o Ed. Elsevier. London UK. 2012

ROUBEY, R.A. Immunology of the antiphospholipid syndrome: antibodies, antigens, and autoimmune response. **Thromb Haemost.** 1999; 82(2):656-61.

ROUBEY, R.A.; EISENBERG, R.A.; HARPER, M.F.; WINFIELD, J.B. Anticardiolipin' autoantibodies recognize beta 2-glycoprotein I in the absence of phospholipid. Importance of antigen density and bivalent binding. **J Immunol.** 1995; 154(2):954-60.

ROUBEY, R.A. Immunology of the antiphospholipid antibody syndrome. **Arthritis Rheum.** 1996; 39(9):1444-54.

ROVERANO, S.; PAIRA, S.; SOMMA, F. Lucio's Phenomenon: Report of two cases and review of the literature. **Journal of Clinical Rheumatology.** 2000, 6, p. 210-13.

SALGADO, M.C. Manifestações reumatológicas da hanseníase. **Rev Bras Reumatol.** 1984; 24(3):97-104.

SAMPAIO, E.P.; OLIVEIRA, R.B.; WARWICK-DAVIES, J.; FARIA-NETO, R.B.; GRIFFIN, G.E.; SHATTOCK, R.J. T Cell-Monocyte Contact Enhances Tumor necrosis Factor- α Production in Response to Mycobacterium leprae. **The Journal of Infectious Diseases,** 2000; 182:1463-72.

SAMPAIO, E.P; SARNO, N. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. **Braz J Med Biol Res.** 1998; 31(1):69-76.

SANMARCO, M.; SOLER, C.; CHRISTIDIES, C.; RAOULT, D.; WEILLER, P.J.; GEROLAMI, V.; BERNARD, D. Prevalence and clinical significance isotype of IgG anti-beta 2-glycoprotein I antibodies in antiphospholipid syndrome: a comparative study with anticardiolipina antibodies. **J Lab Clin Med.** 1997; 29:499-506.

SANTIAGO M, MARTINELLI R, KO A, REIS EA, FONTES RD, NASCIMENTO EG, PIERANGELI S, R ESPINOLA, GHARAVI A. Anti-beta2 glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in leptospirosis, syphilis and Kalazar. **Clin Exp Rheumatol** 2001; 19:425-30.

SANTIAGO MB, COSSERMELLI W, TUMA MF, PINTO MN, OLIVEIRA RM. Anticardiolipin antibodies in patients with infectious diseases. **Clin Rheumatol.** 1989; 8(1):23-8.

SANTOS, D.O.; SANTOS, S.L.; ESQUENAZI, D.; NERY, J.A.; DEFROYT, M.; LORRE, K.; AND VAN, H.H. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. **Nihon Hansenbyo. Gakkai Zasshi.** 2001; 70(1), 15-24.

SCHOENFELD, Y.; ISENBERG, D.A. Mycobacteria and autoimmunity. **Immunol Today**, 1988; 9(6): 178-82.

SCHWARZENBACHER, R.; ZETH, K.; DIEDERICHS, K.; GRIES A.; KOSTNER GM, LAGNER P.; PRASSL R. Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. **Embo J.** 1999; 18(22): 6228-39.

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

SHI, W.; KRILIS, S.A.; CHONG, B.H.; GORDON, S.; CHESTER-MAN, C.N. Prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a healthy population. **Aust N Z J Med.** 1990; 20:231-36.

SHOENFELD Y, BLANK M, CERVERA R, FONT J, RASHI E, MERONI PL. Infectious origin of the antiphospholipid syndrome. **Ann Rheum Dis.** 2006;65(1):2-6.

SHOENFELD Y, BLANK M, KRAUSE I. The relationship of Antiphospholipid antibodies to infections-do they bind to infecting agents or may they even be induced by them? **Clin Exp Rheumatol.** 2000; 18:431-2.

SELING, P.A.; JULLIEN, D.; DAHLEM, M.; TEDDER, T.F.; REA, T.H.; MODLIN, R.L.; AND PORCELLI, S.A. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. **J. Immunol.** 1999; 162(3), 1851-1858.

SILVA NP, ANDRADE LEC. Laboratório em Reumatologia. In: Sato E. (Coord). **Guia de Reumatologia.** Barueri (SP). Ed. Manole; 2004 [Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da UNIFESP/Escola Paulista de Medicina]. p. 17-34.

SINGH, I.; KAUR, S.; KHANDELWAL, N.; KAUR, I.; DEODHAR,S.D. Arthritis in leprosy: clinical, laboratory and radiological assessments. **Int J Lepr. Other Mycobact Dis.** 1994; 62(3):428-33.

SPENCER JS, BRENNAN PJ. The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Lepr Rev.** 2011; 82(4):344-5.

STEINKASSERER, A.; BARLOW, P.N.; WILLIS, A.C, et al. Activity, disulphide mapping and structural modelling of the fifth domain of human beta 2-glycoprotein I. **FEBS Lett.** 1992; 313: 193-7.

STERN C, CHAMLEY L, HALE L, KLOSS M, SPEIRS A,GORDON BAKER H.W. Antibodies to beta 2 glycoprotein I are associated with in vitro fertilization implantation failure as well as recurrent miscarriage: results of a prevalence study. **Fertil. Steril.**1998; 70(5): 938-44.

- TALHARI, S.; NEVES, R.G. **Hansenologia. Manaus, Brasil**. 1984, 1ª edição, p.108.
- TALHARI, S.; NEVES, R.G.; PENNA, G.O.; OLIVEIRA, M.L.V. **Dermatologia Tropical: hanseníase**, 2006, 4. ed. Manaus: Editora Tropical.
- TEIXIDÓ, M.; FONT, J.; REVERTER, J.C.; CERVERA, R.; TÀSSIES, D.; INGELMO, M.; ESCOLAR, G.; ORDINAS, A. Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies: a useful marker for the antiphospholipid syndrome. **Br J Rheumatol**. 1997; 36(1):113-6.
- THAWANI, G.; BHATIA, V.N.; MUKHERJEE A. Anticardiolipin antibodies in leprosy. **Indian J Lepr**. 1994; 66 (3): 307-14.
- VALVERDE, C.R.; CANFIELD, D.; TARARA, R.; ESTEVES, M.I.; GORMUS, B.J. Spontaneous leprosy in a wild-caught cynomolgus macaque. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. 1998; 66(2): 140-8.
- VIGNALI DA, COLLISON L.W.; WORKMAN C.J. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol**. 2008; 8(7):523-32.
- VON LANDENBERG, P.; LEHMANN, H.W.; KNÖLL, A.; DORSCH, S.; MODROW, S. Antiphospholipid antibodies in pediatric and adult patients with rheumatic disease are associated with parvovirus B19 infection. **Arthritis Rheum**. 2003; 48(7):1939-47.
- VOSS, A.; JACOBSEN, S.; HEEGAARD, N.H. Association of beta2-glycoprotein I IgG and IgM antibodies with thrombosis and thrombocytopenia. **Lupus**. 2001; 10(8): 533-8.
- WALKER, S.L.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy. **Clinics in Dermatology**. 2007; v.25:165-72.
- WALLIN, L.; BECKHAUSER, A.P.; HAIDER, O.; ARAUJO, F.; SILVA, M.B.; SKARE, T.L. Mal de Hansen, Anticorpos antifosfolípidos e obstrução das artérias fibulares. **Rev Bras Reumatol**. 2009; 49 (2): 181-7.
- WHITE DW, SUZANNE BEARD R, BARTON ES. Immune modulation during latent herpesvirus infection. **Immunol Rev**. 2012; 245(1):189-208.
- WHO/World Health Organization. Global leprosy situation, beginning of 2012. **Wkly Epidemiol Rec**. 2012; 87(34): 317-28.
- WILSON WA, GHARAVI AE, KOIKE T, LOCKSHIN MD, BRANCH DW, PIETTE JC, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: re-report of an international workshop. **Arthritis Rheum**. 1999; 42: 1309-11.
- YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; DEANS, R.J.; WEINBERG, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Defining protective responses to pathogens: cytokines profiles in leprosy lesions. **Science**. 1991; 254 (5029): 277-9.

YAMAMURA, M.; WANG, X.H.; OHMEN, J.D.; UYEMURA, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage **J Immunol.** 1992; 149(4): 1470-5.

YASUDA S, ATSUMI T, MATSUURA E, KAIHARA K, YAMAMOTO D, ICHIKAWA K, KOIKE. T. Significance of valine/leucine247 polymorphism of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies to the valine247 beta2-glycoprotein I variant. **Arthritis Rheum.** 2005;52:212-8.

APÊNDICE-A**FORMULÁRIO PARA PESQUISA****ANÁLISE PROSPECTIVA DA POSITIVIDADE DO ANTICORPO ANTICARDIOLIPINA E ANTI β 2 EM PACIENTES COM HANSENÍASE E SUA ASSOCIAÇÃO COM FENÔMENOS TROMBÓTICOS.****1. IDENTIFICAÇÃO**

Ordem: ----- nº do prontuário ----- Data da coleta: ----- /----- / -----
 Nome: ----- Idade: -----/anos - Data Nasc: ---- /--- / ---
 Sexo: 1 Masculino 2 Feminino
 Profissão: ----- Naturalidade: ----- Procedência: -----
 Endereço: ----- Bairro:- ----- Telefone: -----

2. HISTÓRIA CLÍNICA DA HANSENÍASE

Data do início do diagnóstico: ---- / ---- / ---- Data da alta: ---- / ---- / ----
 Forma clínica: 1 MHI - 2 MHT - 3 MHTB - 4 MHBB - 5 MHBV - 6 MHV.
 Início do tratamento: - / - / - Esquema: 1 PQT6 - 2 PQT12 - 3 PQT24 - 4 outros.
 Recidiva: 1 2 não
 Reação hansênica: 1 sim 2 não Data último episódio: ---- / ---- / -----
 Tipo de reação: 1 Neurite isolada 2 Tipo1 3 Tipo2
 Quando? 1 antes - 2 durante o tto - 3 após alta - 4 ambos
 Reação no momento? 1 sim - 2 não
 Tipo reação hoje: 1 Neurite isolada - 2 Tipo1 - 3 Tipo2
 Tratamento 1 AINES - 2 Prednisona 3 Talidomida – Dose _____

3. MANIFESTAÇÕES ARTICULARES:

Doença reumática prévia: 1 Sim 2 Não
 Qual? _____
 Queixas reumáticas atuais:
 1 Artrite - 2 Artralgia - 3 Artrite /Artralgia
 Artrite: 1 Mono - 2 Oligo - 3 Poli - 1 Simétrica - 2 Assimétrica
 Articulações: 1 IFPs D IFPs E - 2 MCFs D MCFs E - 3 Punho D PunhoE - 4 Cotv.D Cotv.E - 5 OmbroD OmbroE - 6 MTFs D MTFsE - 7 Tnz D Tnz E - 8 JoelhoD Joelho E - 9 Cxfem D CxfemE.

4. Manifestações tromboembólicas**CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO (SAF):**

Critérios clínicos:

1 - Trombose vascular ()

Venosa () _____

Arterial () _____

Microvascular () _____

2 - Morbidade gestacional ()

(a) Um ou mais óbitos inexplicáveis de fetos morfológicamente normais (US ou exame direto do feto), na ou após a 10^o semana.

(b) Um ou mais nascimentos prematuros de neonato morfológicamente normal, na ou antes da 34^o semana de gestação. Devidos à pré-eclâmpsia, à eclâmpsia ou à insuficiência placentária grave.

(c) Três ou mais abortos consecutivos e inexplicáveis, antes da 10^o semana. Devem-se excluir alterações hormonais ou anatômicas maternas, além de alterações maternas e/ou paternas.

Critérios laboratoriais:

ACL _____

LAC _____

Anti- β 2 GPI _____

Outros autoanticorpos: _____

Diabetes () Glicemia: _____ mg/dL

Tabagismo atual () Descrever: _____

Evento aterosclerótico () Descrever: _____

História familiar DAC precoce ()

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

Colesterol total: _____ mg/dL HDL-c: _____ mg/dL

LDL-c: _____ mg/dL Triglicérides: _____ mg/dL

ANTECEDENTES PESSOAIS

Trombose ? sim () não ()

Localização:

Quando: _____

Confirmada por: suspeita clínica ()

Exames complementares: US com Doppler ()

Tratamento: _____

FRAMINGHAM

Idade: ____ + CT: ____ + Tabagismo: ____ + HDL: ____ + PA sistólica: _____

Pontuação total: _____ Percentagem de risco de DAC em 10 anos: _____

4- Laboratório:

Hemograma:	Erit	HT	HB
Leuc	Neu	Linf	Eos.
Plaquetas:			
Bioquímica:	TGO	TGP	VHS
Sorologia:	FR	FAN HEp-2	anti-DNA
	Anti-CCP	ANCA	aCL
	anti- β ₂ -glicoproteína I		

ASSINATURA: -----

DATA: -----

APÊNCIDE-B**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****“Manifestações reumáticas na Hanseníase: Aspecto clínico e laboratorial”**

A hanseníase é uma doença que causa problemas principalmente na pele e nos nervos, mas, alguns doentes podem ter dor e inchaço nas juntas, podendo dificultar os movimentos e o trabalho do dia-a-dia. Este estudo tem como objetivo contribuir para melhor conhecer os mecanismos porque a hanseníase causa artrite. O melhor conhecimento da doença pode ajudar os médicos a escolher um tratamento para a artrite.

Se o (a) senhor (a) participar deste estudo, responderá um questionário com perguntas relacionadas à sua doença e será examinado. Será coletado 10 ml de sangue para realização de exames laboratoriais.

O Sr (a) está sendo convidado (a) a fazer parte deste estudo e, se concordar, será submetido aos procedimentos acima citados.

Todos os dados pessoais e resultados obtidos serão mantidos em segredo. O senhor (a) poderá tirar qualquer dúvida sobre os exames, podendo decidir participar ou não, sabendo que isso não interferirá no seu tratamento na instituição, assim como pode sair do estudo caso seja essa a sua vontade. O Sr. (a) terá direito a assistência médica pela instituição caso ocorra algum problema durante a realização do estudo.

Eu ----- (paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhado.

O Dr (a) ----- garantiu-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome do Paciente: -----

Assinatura do paciente: -----

Nome do pesquisador: -----

Assinatura do pesquisador: -----

Manaus, ___ de _____ de 2010.

Endereço para contato com o pesquisador: Ambulatório Alfredo da Matta de segunda à sexta feira no período da manhã no Ambulatório de Hanseníase Tel.: 3663-2126.

Dr^a Sandra Lúcia Euzébio Ribeiro Fone: 92373309
Dr^a Helena Lúcia Alves Pereira Fone: 9102-0941

APÊNDICE-C**CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES COM HANSENÍASE E RESULTADOS DE ANTICARDIOLIPINA E ANTI- β_2 GLICOPROTEÍNA I.**

	Sx	Coleta	Id	FC	Tdça	Alta	Talta	Reaç	Tipo reaç	Tratamento Reação	aFL	aCL	aCL GPL	aCL MPL	anti β_2 IgG/ IgM	anti β_2 IgG	anti β_2 IgM
1	M	2004	68	VV	4	N	-	S	ENH	P-60 T-100	pos	pos	neg	90	pos	neg	44
		2010/2011	74	VV	80	S	62	N	*	P-10 T-100	pos	pos	neg	44	pos	NR	21
2	F	2004	41	BT	2	N	-	N	*	¥	pos	neg	neg	neg	pos	neg	15
		2010/2011	47	BT	78	S	66	N	8	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	12
3	M	2004	28	VV	21	N	-	N	*	P-40 T-200	pos	pos	neg	107	pos	neg	358
		2010/2011	33	VV	82	S	57	N	*	T-100	pos	pos	neg	59	pos	NR	222
4	M	2004	46	BV	23	S	0	N	*	P-15-50 T-100	pos	neg	neg	neg	pos	neg	21
		2010/2011	47	BV	36	S	13	N	*	P-20 T-100	pos	NR	NR	NR	pos	NR	20
5	M	2004	24	VV	19	N	-	N	*	P-60 T-100	pos	pos	neg	29	pos	neg	90
		2010/2011	30	VV	92	S	65	N	*	P-10 T-50	pos	neg	neg	neg	pos	NR	11
6	M	2004	21	BB	48	S	23	S	ENH	P-60 T-100	pos	neg	neg	neg	pos	neg	32
		2010/2011	28	BB	135	S	110	S	ENH	P-20mg T-100	neg	NR	NR	NR	neg	NR	neg
7	F	2004	28	I	3	N	-	N	*	P-50	pos	neg	neg	neg	pos	neg	12
		2010/2011	34	BT	76	S	9	N	*	P-10	pos	NR	NR	NR	pos	NR	12
8	M	2004	25	VV	70	S	47	N	*	P-60	pos	neg	neg	neg	pos	neg	15
		2010/2011	29	VV	125	S	101	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	13
9	M	2004	55	BT	0	N	-	S	RR	P-60	pos	neg	neg	neg	pos	neg	11
		2010/2011	61	BT	73	S	61	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	13
10	M	2004	24	BB	35	S	24	N	*	P-60	pos	neg	neg	neg	pos	neg	11
		2010/2011	29	BV	99	S	87	N	*	¥	neg	NR	NR	NR	neg	NR	neg
11	F	2004	25	BT	16	S	6	S	RR	P-60	pos	neg	neg	neg	pos	neg	16
		2010/2011	32	BT	96	S	85	N	*	¥	neg	NR	NR	NR	neg	NR	10
12	F	2004	74	BT	8	N	-	N	*	P-40	pos	neg	neg	neg	pos	neg	41
		2010/2011	81	BT	81	S	78	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	137
13	M	2004	28	VV	62	S	34	S	ENH	P-50 T-100	pos	neg	neg	neg	pos	neg	11
		2010/2011	34	VV	135	S	110	N	*	P-30 T-100	pos	NR	NR	NR	pos	NR	19
14	M	2004	72	BB	25	S	14	N	*	P-60	pos	neg	neg	neg	pos	neg	20
		2010/2011	74	BB	49	S	37	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	24
15	M	2004	36	VV	77	S	38	N	*	P-40 T-200	pos	pos	neg	77	pos	neg	761
		2010/2011	42	VV	147	S	109	N	*	¥	pos	pos	neg	122	pos	NR	334
16	M	2004	45	VV	127	S	103	N	*	P-60 T-100	pos	pos	neg	71	pos	neg	127
		2010/2011	51	VV	198	S	174	N	*	¥	pos	pos	neg	97	pos	neg	102
17	M	2004	39	VV	12	N	-	N	*	P-40 T-200	pos	pos	neg	25	pos	22	38
		2010/2011	44	VV	72	S	49	N	*	P-15 T-100	pos	neg	neg	neg	pos	neg	28
18	M	2004	48	BV	16	N	-	S	ENH	P-10 T-100	pos	neg	neg	neg	pos	20	269
		2010/2011	62	BV	67	S	48	N	*	T-100	pos	neg	neg	neg	pos	NR	12
19	M	2004	20	VV	40	S	2	N	*	¥	pos	pos	46	76	pos	neg	346
		2010/2011	26	VV	108	S	83	N	*	¥	pos	pos	neg	57	pos	NR	320

Continua...

20	M	2004	18	BV	12	N	-	S	RR	P-50	pos	neg	neg	neg	pos	neg	23
		2010/2011	23	BV	78	S	55	N	*	P-20 T-100	pos	NR	NR	NR	pos	NR	14
21	F	2004	53	BT	47	S	36	N	*	¥	pos	neg	neg	neg	pos	neg	17
		2010/2011	59	BT	110	S	99	S	NI	P-20	pos	NR	NR	NR	pos	NR	11
22	M	2004	26	VV	23	S	1	S	ENH	P-50	pos	neg	neg	neg	pos	21	14
		2010/2011	31	VV	92	S	57	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	neg	15
23	F	2004	15	BV	21	S	10	N	*	P-05-50	pos	neg	neg	neg	pos	20	11
		2010/2011	20	BV	89	S	77	N	*	P-5	pos	NR	NR	NR	pos	NR	22
24	M	2004	23	BV	6	N	-	N	*	¥	pos	neg	neg	neg	pos	neg	27
		2010/2011	28	BV	74	S	65	N	*	¥	neg	NR	NR	NR	neg	NR	10
25	M	2004	63	BV	7	N	-	N	*	¥	pos	pos	neg	57	pos	46	478
		2010/2011	68	BV	69	S	55	N	*	P-5	pos	pos	neg	28	pos	neg	410
26	M	2004	41	BT	8	N	-	N	*	¥	pos	neg	neg	neg	pos	neg	23
		2010/2011	47	BT	74	S	64	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	15
27	M	2004	56	BT	77	S	-	N	*	¥	pos	neg	neg	neg	pos	neg	16
		2010/2011	61	BT	127	S	113	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	16
28	M	2004	63	BV	54	S	43	N	*	P-5	pos	neg	neg	neg	pos	770	neg
		2010/2011	69	BV	118	S	107	N	*	P-10	pos	NR	NR	NR	pos	neg	11
29	M	2004	45	VV	21	N	-	S	ENH	P-40 T-100	pos	neg	neg	neg	pos	neg	22
		2010/2011	50	VV	83	S	59	S	ENH	P-05 T-100	pos	NR	NR	NR	pos	NR	18
30	M	2004	29	BB	29	S	14	S	NI	P-60	pos	neg	neg	neg	pos	neg	13
		2010/2011	35	VV	94	S	80	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	13
31	M	2004	67	BB	13	S	2	N	*	P-10	pos	neg	neg	neg	pos	neg	11
		2010/2011	74	BB	92	S	82	N	*	¥	neg	NR	NR	NR	neg	NR	10
32	M	2004	47	VV	52	S	16	S	ENH	T-100	pos	neg	neg	neg	pos	neg	19
		2010/2011	53	VV	122	S	86	N	*	T-100	pos	NR	NR	NR	pos	NR	13
33	F	2004	41	BV	112	S	86	S	RR	P-60	pos	pos	neg	66	neg	neg	neg
		2010/2011	46	BV	171	S	147	N	*	¥	pos	pos	neg	46	neg	NR	neg
34	M	2004	26	VV	17	N	-	S	ENH	P-100	pos	neg	neg	neg	pos	neg	11
		2010/2011	31	VV	81	S	58	N	*	¥	neg	NR	NR	NR	neg	NR	10
35	F	2004	41	BT	35	N	-	N	*	¥	pos	neg	neg	neg	pos	neg	14
		2010/2011	63	BT	94	S	80	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	13
36	M	2004	58	VV	14	N	-	N	*	P-05-50	pos	neg	neg	neg	pos	neg	12
		2010/2011	46	VV	77	S	52	S	ENH	P-60 e T-200	pos	NR	NR	NR	pos	NR	25
37	F	2004	46	VV	124	S	94	N	*	T-100	pos	neg	neg	neg	pos	neg	41
		2010/2011	51	VV	184	S	154	N	*	¥	pos	NR	NR	NR	pos	NR	27
38	F	2004	42	BT	21	S	7	S	RR	P-50	pos	neg	neg	neg	pos	neg	26
		2010/2011	47	VV	83	S	69	N	*	P-05	pos	neg	neg	neg	pos	NR	15

Id = Idade
Sx = Sexo

FC- Forma Clínica

I = Indeterminado
TT = Tuberculose
BT = Borderline Tuberculose
BB = Borderline Borderline
BV = Borderline Virchowiana
VV = Virchowiana

Tdça – Tempo da doença

Talta-Tempo de alta

- = Sem alta

Tipo Reaç – Tipo Reação

ENH = Eritema Nodoso hansênico
RR = Reação Reversa
NI = Neurite Isolada
* = Sem Reação

Tratamento Reaç – Tratamento da Reação

P = Prednisona
T = Talidomida
¥ = Sem tratamento da reação

aFL- anticorpos antifosfolípeios

NR- Não realizado
aCL = anticardiolipina
Anti-β₂GPI – anti-β₂ glicoproteína I
Pos = Positivo
Neg = Negativo

ANEXO A

Governo do Estado do Amazonas
Secretaria de Estado da Saúde
FUNDAÇÃO "ALFREDO DA MATTA"
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Manaus, 10 de março de 2010

CARTA Nº. 010/10 – CEP/FUAM

A: Pesquisadora

Sandra Lúcia Euzébio Ribeiro

Assunto: Administrativo. Encaminhamento de **Parecer nº. 008/10 – CEP**

Informamos a Vossa Senhoria o **Parecer Nº 008 10 CEP/FUAM** do projeto intitulado: "ANTICORPO ANTIFOSFOLÍPIDES E ASSOCIAÇÃO COM FENÔMENOS TROMBÓTICOS EM PACIENTES COM HANSENÍASE", foi **APROVADO**, devendo comparecer junto ao Departamento de Ensino e Pesquisa para discutir a operacionalização.

Respeitosamente,


ROSSILENE CONCEIÇÃO DA SILVA CRUZ
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B

001_Template (2014) [10.2.2014 2:23pm] [10.2.2014 2:23pm] (10) [10.2.2014 2:23pm]

Author Query Form

Journal Title: Lupus (LUP)

Article Number: 529469

Dear Author/Editor,

Greetings, and thank you for publishing with SAGE. Your article has been copyedited and typeset, and if we have any queries for you they are listed below. Please address these queries when you return your proof corrections. Thank you for your time and effort.

Please ensure that you have obtained and enclosed all necessary permissions for the reproduction of artistic works, (e.g. illustrations, photographs, charts, maps, other visual material, etc.) not owned by yourself, and ensure that the Contribution contains no unlawful statements and does not infringe any rights of others, and agree to indemnify the Publisher, SAGE Publications Ltd, against any claims in respect of the above warranties and that you agree that the Conditions of Publication form part of the Publishing Agreement.

Any colour figures have been incorporated for the on-line version only. Colour printing in the journal must be arranged with the Production Editor, please refer to the figure colour policy outlined in the e-mail.

SPECIAL ARTICLE

Long-term persistence of anti- β 2 glycoprotein I in treated leprosy patients

SLE Ribeiro¹, HLA Pereira¹, NP Silva², EI Sato², LFS Passos¹ and MC Dos-Santos³

¹Department of Medicine; Faculty of Medicine, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil; ²Division of Rheumatology, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil; and ³Department of Parasitology & Immunology, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

β 2 glycoprotein I (β 2GPI) is a phospholipid binding protein that plays important roles in endothelial stability, blood coagulation, clearance of apoptotic debris and other physiologic processes. Anti- β 2GPI antibodies occur in normal individuals and transiently during the course of infections, but are also associated with thrombotic events in autoimmune disease: the antiphospholipid syndrome (APS). A total of 31 out of 37 treated leprosy patients previously found to present high titers of IgM anti- β 2GPI and/or anticardiolipin antibodies (aCL) remained positive for IgM antiphospholipid antibodies (aPL), and exhibited high titers of anti- β 2GPI. The 37 patients were part of the 77 aPL-positive patients from a previous study that evaluated 158 leprosy patients. The median time elapsed between the first and second sample was 66 months. None of the 37 patients had any thrombotic event and 24 had a reactional state and were still requiring the use of prednisone, thalidomide or both. None of them fulfilled World Health Organization criteria for leprosy recurrence. *Lupus* (2014) 0, 1–3.

Key words: anticardiolipin antibodies; antiphospholipid syndrome; anticoagulation

Infection-related antiphospholipid antibodies (aPL) are supposed to be of short duration, as observed in syphilis, malaria, tuberculosis, hepatitis C and other infections.^{1–3} The reported prevalence of aPL in leprosy patients varies across studies, mainly in association with lepromatous leprosy, usually without antiphospholipid syndrome (APS)-related clinical manifestations.^{4–6} We previously reported a survey of 158 leprosy patients, of which 77 had circulating aPL, either anticardiolipin (aCL) or anti- β 2 glycoprotein I (anti- β 2GPI) antibodies, predominantly IgM, some in high titers.⁴ Five years later, we re-evaluated 37 of them, 32 still with detected aPL, 31 with anti- β 2GPI antibodies; none developed thrombotic phenomena. Herein we present clinical and serological data of these patients and discuss possible pathogenic mechanisms.

Our initial survey included 158 leprosy patients followed at the Tropical Dermatology and Venereal Clinic of Alfredo de Matta Foundation, in Manaus, Amazon, Brazil. Clinical, demographic

and serological data of the original 77 patients with aPL and the 38 recalled patients are shown in Table 1. Of these, 77 (48.7%) had aPL antibodies (25 for aCL and 73 for anti- β 2GPI). All of them were submitted to multidrug therapy, according to World Health Organization (WHO) protocols and so were considered 'bacteriologically' cured. These patients with aPL were reassessed after a mean 66.8 months (range of 53–86 months), and we succeeded to locate 38 of them. Their previously stored sera were retested and one resulted negative, so this patient was excluded from re-analysis. Male/female ratio (28/10) was similar to the original set. The mean age was 46 ± 16 years, compared with 39 ± 15 years in the original cohort. The distributions of clinical forms of disease according to the Ridley Joplin classification presented in the original cohort and in the recalled group were similar (Figure 1).

All serum samples were tested for aCL isotypes IgG and IgM by an in house-developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Normal ranges for aCL in Brazilian population were previously determined in a sample of 200 healthy blood donors and the 95th percentile cut-off points established with the use of international APL calibrators (LAP-GM-200 calibrators, Louisville APL

Correspondence to: Sandra Lúcia Euzébio Ribeiro, Avenida Apuriná 04, Bairro Praça 14, Manaus – Amazonas State 69020-170, Brazil.
 Email: sandraler04@gmail.com
 Received 11 February 2014; accepted 4 March 2014

© The Author(s), 2014. Reprints and permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

10.1177/0961203314529469

Long-term persistence of anti-β2 glycoprotein I in treated leprosy patients
 SLE Ribeiro et al

2

Diagnostics, Inc, KY, USA) established 20 GPL and 10 MPL, respectively, as limits of normality. Anti-β2GPI antibodies IgG and IgM were tested with a commercial ELISA kit with a human source of β2GPI (The Binding Site, Birmingham, UK), according to the manufacturer's instructions. The cut-off values were 10 U/ml for IgM and 20 U/ml for IgG.

As shown in Table 2, 32 out of 37 samples collected in 2010 remained positive for aPL (86.4%). Seven patients out of 37 (18.9%) had aCL, and 31 (83.7%) had anti-β2GPI. Six patients were

positive to both. All sera reactive in the 2010 group were of the IgM isotype. Six (85.7%) of the seven aCL-positive sera had titers higher than 40 MPL (mean 70.8 MPL, range 44–122 MPL). Of the 31 sera with anti-β2GPI, 6 (19.3%) had titers higher than 40 U/ml, (median 271 U/ml, range 102–410 U/ml).

To the best of the authors' knowledge, this is the first study reporting the persistence of aPL antibodies in a large cohort of leprosy patients after a long-term follow up: more than 5 years. Arvieux et al. had previously reported aPL persistence in five patients followed for 2 years.⁵ Our results suggest that leprosy-related aPL do not follow the rule of other infection-related aPL, which are said to be transient.⁷ Our patients, despite complete treatment and supposedly cured status, remained with detected circulating aPL (32/37, 86.4%), all with the IgM isotype, most (31/37, 83.7%) for anti-β2GPI, some with high titers. Notwithstanding, none presented thromboembolic events or pregnancy morbidity. Medical literature sustains that infection-related aPL antibodies are transient and not associated with thrombotic events, although some reports asserts otherwise.⁸ Nevertheless, the mechanisms that lead to the development of aPL and their possible pathophysiological implications in patients with infections have not been well established. Forastiero et al. demonstrated that, in mice, aPL/anti-β2GPI isolated from leprosy patients do not show thrombogenic and pro-inflammatory effect.⁹ Arvieux et al., in 2002, showed that anti-β2GPI antibodies from leprosy patients are directed against domain V of β2GPI, whereas those from APS patients are directed against domain I.⁵ Brochado et al., in 2010, studied the polymorphism of β2GPI in leprosy patients and concluded that the

Table 1 Demographical, clinical and serological data of the initial cohort (2004) and the aPL-positive 2010 recalled patients

Year 2004	
158 Leprosy	<ul style="list-style-type: none"> • 113 male/45 female/median age = 39 ± 15 years • TT = 6/BT = 32/BB = 25/BL = 35/LL = 56/I = 4 • 64 on MDT/94 completed MDT
77/158	<ul style="list-style-type: none"> • aCL = 25/77 (32.4%)
aPL+ (48.7%)	<ul style="list-style-type: none"> • anti-β2GPI = 73/77 (94.8%) • IgG = 3/IgM = 9 • IgM = 24/IgM = 72 • Thrombosis/APS = none
Year 2010	
38/77 recalled (49.3%)	<ul style="list-style-type: none"> • 28 male/10 female/median age = 46 ± 16 years • BT = 9/BB = 3/BL = 8/LL = 18 • All completed MDT (median 66.8 months before) • 24/38 still on prednisone or/and thalidomide
On re-tested negative	
32/37	<ul style="list-style-type: none"> • aCL = 7/37 (18.9%)
aPL+ (86.4%)	<ul style="list-style-type: none"> • anti-β2GPI = 31/37 (83.7%) • IgG = 0/IgM = 0 • IgM = 7/IgM = 31 • Thrombosis/APS = none

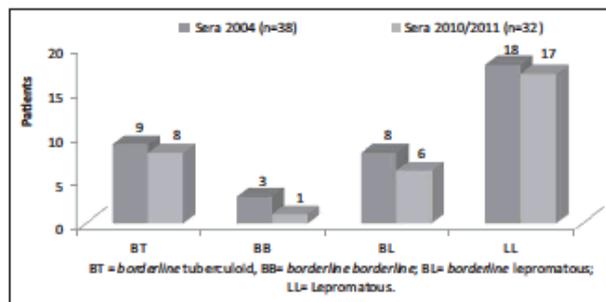


Figure 1 Distribution of leprosy patients according to Ridley and Jopling classification to the clinical type of aPL positive patients in 2004 and 2010.

Lepus

Table 2 Frequency of aCL and anti-β2GPI antibodies in sera collected in 2004 and 2010, with analysis of high titers distribution among groups of patients

	aPL positive		aCL positive		Anti-β2GPI positive	
	N	%	N	%	N	%
2004 sera	37/37	100%	9/37	24.3%	36/37	97.2%
2010 sera	32/37	86.40%	7/37	18.9%	31/37	83.7%
aCL high titers (> 40 MPL)						
	N	%	Mean	Median	Lowest	Highest
2004 sera	7/9	77.8	88.0	86	42	144
2010 sera	6/7	85.7	70.8	58	44	122
Anti-β2GPI high titers (> 40 U/ml)						
	N	%	mean	median	Lowest	Highest
2004 sera	12/37	32.4	177.7	191	45	357
2010 sera	6/31	19.3	254.0	271	102	410

Leu247Val and Trp316Ser polymorphisms may represent genetic risk factors for anti-β2GPI production in multibacilar leprosy patients.¹⁰

In conclusion, our study underscores the diversity of aPL, supporting a different sources and different roles for infection-related and autoimmune-related aPL.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1 Cervera R, Asherson RA. Antiphospholipid syndrome associated with infections: clinical and microbiological characteristics. *Immunobiology* 2005; 210: 735-741.

2 Loizou S, Singh S, Wypkema E, Asherson RA. Anticardiolipin, anti-beta (2)-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies in black South African patients with infectious disease. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1106-1111.

3 Santiago M, Martinelli R, Ko A, *et al.* Anti-beta2 glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in leptospirosis, syphilis and Kalazar. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 425-430.

4 Ribeiro SL, Pereira HL, Silva NP, Souza AW, Sato EI. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies are highly prevalent in a large number of Brazilian leprosy patients. *Acta Rheumatol Port* 2011; 36: 30-37.

5 Arvieux J, Renaudineau Y, Mane I, Perraut R, Krisis SA, Youinou P. Distinguishing features of anti-beta2 glycoprotein I antibodies between patients with leprosy and the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2002; 87: 599-605.

6 Forastiero RR, Martinuzzo ME, de Larrañaga GF. Circulating levels of tissue factor and proinflammatory cytokines in patients with primary antiphospholipid syndrome or leprosy related antiphospholipid antibodies. *Lupus* 2005; 14: 129-136.

7 Dalekos GN, Zachou K, Liascos C. The antiphospholipid syndrome and infection. *Curr Rheumatol Rep* 2001; 3: 277-285.

8 Akerkar SM, Bichile LS. Leprosy and gangrene: a rare association; role of anti-phospholipid antibodies. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 74.

9 Forastiero R, Martinuzzo M, de Larrañaga G, Vega-Osterug M, Pierangeli S. Anti-beta 2 glycoprotein I antibodies from leprosy patients do not show thrombogenic effects in an in vivo animal model. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 859-861.

10 Brochado MJ, Figueiredo JF, Mendes-Junior CT, Louzada-Junior P, Kim OM, Roselino AM. Correlation between beta-2-glycoprotein I gene polymorphism and anti-beta-2 glycoprotein I antibodies in patients with multibacillary leprosy. *Arch Dermatol Res* 2010; 302: 583-591.

ANEXO C

Sandra Lúcia Euzébio Ribeiro <sandraller04@gmail.com>

artigo de revisão de Tese

Scientia Amazonia <scientia@ufam.edu.br>

23 de julho de 2014 09:28

Para: Sandra Euzébio Ribeiro <sandraeuzebio@cemedimagem.com.br>

Cara Professora Sandra Euzébio Ribeiro

Agradecemos o envio de seu artigo de revisão e aproveitamos para informar que brevemente será publicado no setor "artigos no prelo", para que Vossa Senhoria e os demais autores revejam o artigo, antes da publicação definitiva.

Atenciosamente,

Genilson Pereira Santana

Editor Chefe da Revista Eletrônica *Scientia Amazonia*

De: "Sandra Euzébio Ribeiro" <sandraeuzebio@cemedimagem.com.br>**Para:** scientia@ufam.edu.br**Enviadas:** Sexta-feira, 11 de julho de 2014 18:28:06**Assunto:** artigo de revisão de Tese

[Texto das mensagens anteriores oculto]