

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS- GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

VINICIUS MARTINS DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS,
CLÍNICOS E IMUNOPATOLÓGICOS DA REAÇÃO TIPO 1
EM PACIENTES COINFECTADOS PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E O *Mycobacterium leprae***

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em medicina pelo Curso de Pós- Graduação em Medicina Topical do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Dra. Euzenir Nunes Sarno

RIO DE JANEIRO

2013

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

VINICIUS MARTINS DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS,
CLÍNICOS E IMUNOPATOLÓGICOS DA REAÇÃO TIPO 1
EM PACIENTES COINFECTADOS PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E O *Mycobacterium leprae***

Orientadora: Dra. Euzenir Nunes Sarno

Aprovada em: 24/10/ 2013

EXAMINADORES:

Dr. José Augusto da Costa Nery (Presidente da Banca)

Dr. José Henrique da Silva Pilotto

Dr. Paulo Vieira Damasco

Dra. Maria Clara Gutierrez Galhardo

Dra. Roberta Olmo Pinheiro

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M543 Menezes, Vinicius Martins de

Avaliação dos aspectos epidemiológicos, clínicos e imunopatológicos da reação tipo 1 em pacientes coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana e o *Mycobacterium leprae* / Vinicius Martins de Menezes. – Rio de Janeiro, 2013.

xii, 111 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.

Bibliografia: f. 70-79

1. Coinfecção HIV e hanseníase. 2. Geografia da hanseníase. 3. Reação tipo 1. I. Título.

CDD 616.9792

Agradecimentos

Em especial à minha esposa Maria Cristina pelo companheirismo e paciência.
Aos meus pais Marcello e Maria Inez e toda minha família por sempre estarem ao meu lado.

À orientadora da tese Dra. Euzenir Nunes Sarno por todos os ensinamentos.

À Dra. Mariana Hacker pela preciosa colaboração no planejamento e análise dos estudos.

Ao Dr. José Augusto Nery pelos ensinamentos na condução dos pacientes com hanseníase e
pela revisão deste manuscrito e à toda a equipe do Ambulatório Souza Araújo.

Às Dra. Ariane Leite e Dra. Roberta Olmo e toda a equipe do LAHAN pela colaboração nos
ensaios laboratoriais dos estudos.

À Dra. Maria Clara Gutierrez Galhardo pela orientação na dissertação do mestrado que
originou esta tese.

Ao Dr. Francisco Inácio Bastos pela revisão do artigo.

À Dra. Renata Gracie pela colaboração na construção dos mapas.

Ao curso de pós graduação em Medicina Tropical do IOC e à Fundação Oswaldo Cruz.

Resumo

Introdução: Na última década, diversas publicações sobre a associação entre o início de terapia antirretroviral e o desenvolvimento de reação reversa foram publicadas. Entretanto, não está claro se a incidência e a gravidade destas reações são maiores em pacientes coinfectados pelo HIV. Poucos estudos epidemiológicos sobre esta coinfeção foram publicados na literatura.

Objetivo: Avaliar a influência da infecção pelo HIV na epidemiologia, apresentação clínica e mecanismos imunopatológicos envolvidos na reação tipo 1.

Material e método: Estudo I: Estudo de série de casos, onde foi realizada uma descrição das características clínicas e epidemiológicas de todos os pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae* no momento do diagnóstico de hanseníase no ASA entre 1989 e 2011. Uma análise multivariada dos fatores associados à presença de reação reversa foi realizada. Os dados foram coletados pelo banco de registros dos pacientes no ASA e complementados por revisão de prontuários. Mapas temáticos sobre a distribuição geográfica dos pacientes foram construídos através do programa ArcMap. **Estudo II:** estudo de coorte retrospectiva, onde foram incluídos todos os pacientes *borderline tuberculoides*, maiores de 15 anos de idade e atendidos no ASA entre 1997 a 2008. Os pacientes foram comparados de acordo com a sorologia para infecção pelo HIV. Os dados foram coletados através de revisão de prontuários. A densidade de incidência de reação reversa foi calculada para cada grupo. Os fatores de risco para reação reversa foram avaliados através de análise multivariada por regressão de Poisson. Comparou-se as características clínicas da reação. Em soro de pacientes com reação reversa, foi avaliada a expressão de citocinas por Luminex e de proteína C reativa por ELISA. A detecção de IgM anti-PGL1 no diagnóstico de hanseníase foi avaliada através de ELISA

Resultados: Estudo I: Houve um aumento no número de pacientes diagnosticados com hanseníase e HIV nos últimos anos, em um centro de referência. A maioria dos pacientes apresentava a forma paucibacilar da hanseníase e o uso de TARV foi único fator associado ao desenvolvimento de reação. A maioria dos pacientes eram moradores da região metropolitana e da região norte da cidade do Rio de Janeiro. **Estudo II:** A incidência de reação reversa foi significativamente maior entre pacientes coinfectados pelo HIV. A presença de BAAR nas lesões cutâneas, a infecção pelo HIV e o teste de Mitsuda negativo foram fatores de risco para a reação reversa. Uma maior proporção de pacientes coinfectados apresentou lesões cutâneas ulceradas, porém todos os pacientes responderam bem ao tratamento para reação com prednisona. Houve uma maior frequência de citocinas de perfil Th1 em pacientes sem HIV e de perfil Th2 em pacientes coinfectados na reação reversa. Nenhum paciente coinfectado apresentou positividade no exame de ELISA anti- PGL1.

Conclusões: A maioria dos pacientes coinfectados foi proveniente de regiões com grande densidade populacional. A reação reversa é mais frequente em pacientes coinfectados. A infecção pelo HIV, o teste de Mitsuda negativo e a presença de BAAR em lesões cutâneas são fatores de risco para reação reversa. A reação reversa não parece ser mais grave em indivíduos coinfectados pelo HIV.

Palavras-chaves: coinfeção HIV e hanseníase, geografia da hanseníase, reação tipo 1.

Abstract

Introduction: In the last decade, Leprosy and HIV coinfection gained the attention of the scientific community due to the relation of type 1 reaction and the initiation of antiretroviral therapy. However, it is not clear if they are actually more frequent or more severe in HIV positive individuals. Very scant epidemiological and clinical data about this co-infection are available in the peer-reviewed literature.

Objective: To evaluate the interaction of the HIV infection with the epidemiological, clinical and immune pathological features of type 1 reaction.

Subjects and Methods: Study I: A case series description of the geographical distribution and demographic characteristics of HIV/ *M. leprae* co-infected patients at the moment of leprosy diagnosis in a Brazilian Leprosy referral center from 1989 - 2011. A multivariate analysis was performed in order to establish clinical factors associated with type 1 reaction.

Study II: We have conducted a retrospective longitudinal study of all BT leprosy patients aged ≥ 15 years attended at the FIOCRUZ Clinic from 1st January 1997 to 31th December 2008. Data retrieved from patients chart were compared according to the status of HIV infection. The incidence rate of type 1 reaction and recurrent reaction was calculated. Risk factors for type 1 reaction were evaluated by multivariate Poisson regression model. In serum samples from patients under type 1 reaction before prednisone treatment, cytokine levels were analyzed by Luminex and reactive C protein levels by ELISA. The presence of IgM anti-PGL1 was determinate by ELISA at leprosy diagnosis.

Results: Study I: There were an increasing number of patients diagnosed with leprosy and HIV over the last years at a referral center. Most patients presented paucibacillary leprosy clinical form and the use of ART was the only independent factor associated with type 1 reaction. The majority of the patients were living in the metropolitan region and in the north subarea of Rio de Janeiro city. **Study II:** The incidence per 100 person-years of type 1 reaction was significantly greater in the HIV positive group. The presence of AFB in the skin lesion, a negative lepromin test and HIV infection were independent risk factors for type 1 reaction. A greater proportion of coinfecting patients presented ulcerated skin lesion, however all patients had a favorable evolution after treatment with corticosteroid. There was a greater frequency of type 1 cytokines among HIV negative patients and type 2 cytokines among HIV positive patients. No coinfecting patients responded for the detection of anti- PGL1.

Conclusions: Patients living with both HIV and leprosy are likely to live in regions characterized by a high density impoverished population. The incidence rate of type 1 is greater in HIV coinfecting individuals under TARV. The HIV infection, a lepromin negative test and the presence of AFB in the skin lesion are risk factor for type 1 reaction. Type 1 reaction did not seem to be more severe in this group of individuals.

Keywords: Leprosy and HIV co-infection, Social geography of Leprosy, Type 1 reaction.

Sumário

RESUMO.....	v
Abstract.....	vi
Lista de abreviações.....	ix
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
I. Introdução.....	13
I.1. Justificativa.....	13
I.2. Revisão da literatura.....	16
1. Aspectos epidemiológicos da coinfeção pelo HIV/ <i>M. leprae</i>	16
1.1. Aspectos epidemiológicos da hanseníase.....	16
1.2. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HIV.....	17
1.3- Aspectos epidemiológicos da coinfeção pelo HIV/ <i>M. leprae</i>	18
2. Aspectos clínicos e imunopatológicos da coinfeção pelo HIV/ <i>M. leprae</i>	19
2.1. Aspectos clínicos e imunopatológicos da hanseníase.....	19
2.2. Aspectos clínicos e imunológicos da infecção pelo HIV.....	25
2.3. Aspectos clínicos e imunopatológicos da coinfeção pelo HIV/ <i>M. leprae</i>	29
II. Objetivos.....	31
II.1. Objetivo geral.....	31
II.2. Objetivos específicos.....	31
III. Material e métodos.....	32
III.1. Local do estudo.....	32
III.2. Rotina de acompanhamento no ASA.....	32
III.3 Classificações e definições utilizadas.....	35
III.4 Estudo 1: Aspectos clínicos e epidemiológicos de 92 pacientes coinfectados pelo HIV/ <i>M. leprae</i>	36
1. Desenho do estudo.....	36
2. Distribuição geográfica dos pacientes.....	36
3. Análise estatística.....	36
III.5 Estudo 2: Efeitos paradoxais da infecção pelo HIV na hanseníase.....	37
1. Desenho do estudo.....	37
2. Avaliação da incidência de reação tipo 1.....	37
3. Avaliação dos fatores de risco para reação tipo 1.....	37
4. Avaliação das características clínicas dos episódios de reação tipo 1.....	38

5. Avaliação dos níveis de citocinas e PCR nos soros de pacientes em reação tipo 1.....	38
6. Detecção de anticorpos IgM anti PGL-1.....	38
7. Análises estatísticas.....	39
III.6. Considerações éticas.....	39
IV. Resultados.....	40
IV.1. Estudo 1: Aspectos clínicos e epidemiológicos de 92 pacientes coinfetados pelo HIV/ <i>M. leprae</i>	40
1. As características dos pacientes no momento do diagnóstico de hanseníase.....	40
2. Fatores associados à reação tipo 1.....	42
3. A distribuição geográfica dos pacientes.....	43
IV.2 Estudo 2: Efeitos paradoxais da infecção pelo HIV na hanseníase.....	44
1. As características dos grupos no momento do diagnóstico de hanseníase <i>borderline</i> tuberculóide no Ambulatório Souza Araújo.....	44
2. A incidência de reação tipo 1.....	49
3. Fatores de risco para reação tipo 1.....	50
4. A relação entre a contagem de linfócitos TCD4 e a carga viral do HIV com o desenvolvimento de reação tipo 1.....	51
5. Níveis de citocinas e PCR no momento do diagnóstico de reação tipo 1.....	51
6. Descrição dos níveis de linfócitos T CD4, carga viral do HIV e citocinas no momento do diagnóstico de hanseníase e no momento do diagnóstico de reação tipo 1.....	53
7. Detecção de anticorpos anti- PGL1.....	54
8. Características clínicas dos pacientes em reação tipo 1.....	54
V. Discussão.....	56
VI. Conclusões.....	68
VII. Referências bibliográficas.....	70
VIII. Anexos.....	81
VIII.1. Anexo 1: Reversal reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome: Capítulo de livro publicado durante o doutorado em 2011, no livro <i>Recent translational Research In HIV/AIDS</i>	80
VIII.2. Anexo 2: Epidemiological and clinical patterns of 92 HIV and <i>Mycobacterium leprae</i> co-infected patients. Artigo referente ao estudo I da presente tese submetido para publicação para a revista <i>Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene</i>	90
VIII.3. Anexo 3: Paradoxal effect of HIV infection on leprosy disease: artigo em preparação para ser submetido para publicação.....	111

Lista de abreviações

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida
ASA: Ambulatório Souza Araújo
BAAR: Bacilo álcool ácido resistente
BB: *Borderline borderline*
BL: Lepromatosa *borderline*
BSA: albumina sérica bovina
BT: Tuberculóide *borderline*
DO: Densidade óptica
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ENH: Eritema nodoso hanseniano
FIOCRUZ: Fundação Oswaldo cruz
HIV: Vírus da imunodeficiência humana
IB: Índice baciloscópio de esfregaço dérmico
IFN- γ : Interferon gama
IL: Interleucina
IPEC: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
IRIS: síndrome inflamatória de reconstituição imunológica
IOC: Instituto Oswaldo cruz
LAHAN: Laboratório de Hanseníase do IOC/Fiocruz.
LL: Lepromatosa lepromatosa
MHI: Hanseníase indeterminada
MHC II: Complexo Major de Histocompatibilidade
HSH: Homens que fazem sexo com homens
N: Neurite
NP: Neural pura
OMS: Organização Mundial da Saúde
PBS: Tampão fosfato salina
PDN: Prednisona
PPD: Derivativo de proteína purificada
PGL-1: Glicolípido- fenólico 1
PQT: Poliquimioterapia
P: Valor do *P*: Nível de significância
RNA: Ácido ribonucleico
RR: Risco relativo

SES- RJ: Secretaria estadual de saúde- Rio de Janeiro.

SINAN: Sistema de informação de agravos de notificação.

TARV: Terapia antirretroviral

TLR2: Receptores toll- like 2

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TT: tuberculóide tuberculóide.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características demográficas e imunológicas dos pacientes coinfectados pelo HIV/ <i>M. leprae</i> no momento do diagnóstico de hanseníase.....	41
Tabela 2: Descrição da relação entre as formas clínicas da hanseníase no momento do diagnóstico com a contagem de células T CD4, carga viral do HIV, teste de Mitsuda e índice baciloscópico.....	42
Tabela 3: Análise multivariada da influência do gênero, idade, índice baciloscópico, uso de TARV e teste de Mitsuda para o desenvolvimento de reação tipo 1.....	42
Tabela 4: Características clínicas, demográficas e imunopatológicas dos pacientes no momento do diagnóstico de hanseníase.....	48
Tabela 5: Tabela 5: Análises bivariada e multivariada de fatores de risco para reação reversa:.....	51
Tabela 6: Tabela 6: Características clínicas dos episódios reacionais relacionados à gravidade de reação tipo 1.....	54

Lista de Figuras

Figura 1: Número de pacientes coinfetados pelo HIV/ <i>M. leprae</i> por ano de admissão no Ambulatório Souza Araújo/ Fiocruz.....	43
Figura 2: Proporção de pacientes coinfetados pelo HIV/ <i>M. leprae</i> em relação ao total de pacientes com hanseníase admitidos, por ano, no Ambulatório Souza Araújo/ Fiocruz.....	43
Figura 3: Taxa de detecção de novos casos de hanseníase e taxa de incidência de AIDS, por município do estado do Rio de Janeiro: 2001-2005 e 2006-2010.....	45
Figura 4: Distribuição dos pacientes coinfetados pelo HIV/ <i>M. leprae</i> , atendidos no ASA, por município de moradia no estado do Rio de Janeiro, entre 1989-2011.....	46
Figura 5: Distribuição dos pacientes coinfetados pelo HIV/ <i>M. leprae</i> , atendidos no ASA, por bairro de moradia na cidade do Rio de Janeiro, entre 1989-2011.....	47
Figura 6: Densidade de incidência de reação tipo 1 e de reação tipo 1 recorrente.....	50
Figura 7: Nível de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em pacientes em reação reversa.....	52
Figura 8: Níveis de proteína C reativa, durante os episódios reacionais.....	52
Figura 9: Contagem de linfócitos TCD4, carga viral do HIV e níveis de citocinas no momento do diagnóstico de hanseníase borderline tuberculóide e no momento do diagnóstico de reação tipo 1 em 4 pacientes coinfetados pelo HIV/ <i>M. leprae</i>	53
Figura 10: Lesões ulceradas em pacientes coinfetados pelo HIV/ <i>M. leprae</i>	55

I- Introdução

I.1. Justificativa:

Contrariamente às **expectativas** iniciais, em que se esperava que a infecção pelo HIV aumentasse a prevalência de hanseníase, assim como ocorreu com outras micobacterioses, estudos realizados nas duas primeiras décadas da pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) não verificaram uma maior susceptibilidade dos pacientes infectados pelo HIV à hanseníase (Ustianowski et al. 2006). No entanto, recentemente alguns estudos vêm demonstrando que o uso de terapia antirretroviral (TARV) pode estar associado à apresentação de sintomas para hanseníase. Couppié *et al*, em 2009, mostraram que a incidência de hanseníase foi maior entre pacientes em uso de TARV por menos de três meses do que entre aqueles que estavam em uso de TARV por mais de três meses ou sem uso de TARV (Couppie et al. 2009). Em outro estudo, na Índia, também em 2009, observou-se uma alta prevalência de hanseníase em pacientes HIV positivos em uso de TARV (Vinay et al. 2009). Sarno *et al*, em 2008, demonstraram, através de análise multivariada, uma associação entre o início de TARV e o diagnóstico de hanseníase (Sarno et al. 2008).

Desde o início da epidemia da AIDS, a coinfeção com outras doenças tropicais, como a tuberculose, a leishmaniose e a malária tem sido estudada no contexto brasileiro (Morgado 2000; Karp & Auwaerter 2007). Vários estudos demonstraram as complexas relações entre o contexto socioeconômico e a distribuição de doenças infecciosas. Tais relações podem ajudar a explicar a sobreposição de diferentes doenças, incluindo doenças tropicais e AIDS, no contexto de uma pronunciada heterogeneidade socioeconômica e geográfica, como ocorre no Brasil. A imunossupressão causada pelo HIV faz com que os indivíduos sejam mais suscetíveis às doenças oportunistas, bem como à reativação de infecções endógenas.

Poucos estudos avaliaram as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae* (Pereira et al. 2004; Sarno et al. 2008; Talhari et al. 2010), porém, até o momento, nenhum estudo descreveu ou avaliou a distribuição geográfica desses pacientes. Além disso, não há informações governamentais sobre o número de pessoas coinfectadas no Brasil e no mundo. Entretanto, a sobreposição geográfica crescente das duas endemias poderá elevar o número de casos, principalmente na África, Ásia e América latina (Ustianowski et al. 2006; Vinay et al. 2009).

Na última década, a coinfeção HIV/ hanseníase tem sido tema de diversas publicações devido, principalmente, à relação entre o início de TARV e o desenvolvimento de reação tipo 1 (RT1). Desde que a TARV tornou-se disponível para o tratamento da AIDS, mais de 40 casos de RT1 associada à síndrome inflamatória de recuperação imunológica foram publicados na literatura (Pavie et al. 2010). Entretanto, uma vez que os episódios

reacionais afetam grande parte dos pacientes com hanseníase, não está claro se a frequência de reação reversa é realmente maior nos pacientes coinfectados pelo HIV.

Desde a bem-sucedida introdução da poliquimioterapia (PQT) para o tratamento da hanseníase, os estados reacionais da hanseníase tornaram-se os aspectos mais importantes na condução do paciente com hanseníase. A frequência da reação tipo 1 varia amplamente na literatura, dependendo dos diferentes critérios de inclusão adotados, tempo de seguimento dos pacientes e de fatores geográficos e étnicos. Sendo assim, a frequência de reação reversa descrita em estudos previamente publicados varia de 2,6% a 67% (Becx-Bleumink 1993; Bwire& Kawuma 1994; Kahawita 2008; Nery et al. 1998; Ranque 2007). A recorrência dos episódios reacionais pode ocorrer em cerca de 30% dos pacientes com hanseníase (Lockwood et al. 1993). Dentre os vários fatores de risco descritos para reação tipo 1 encontram-se: infecções concomitantes (Motta et al. 2012), imunização (Kahawita 2008), gravidez (Kahawita 2008), acometimento de mais de 3 segmentos corporais afetados (Kumar 2004a) e idade (Ranque 2007). Encontram-se ainda entre os fatores de risco para RT1 a detecção de anticorpos IgM contra o antígeno glicolípido- fenólico 1 (Roche et al. 1991), análise de esfregaço cutâneo positivo para BAAR (Kumar 2004a) e reação de polimerase em cadeia (PCR) positiva em pacientes com lesão cutânea única (Sousa 2007).

É sabido que a infecção pelo HIV e alguns antirretrovirais são causas de neuropatia periférica. Esperava-se, portanto, que os pacientes coinfectados HIV/ *M. leprae* pudessem apresentar um quadro clínico neurológico mais exuberante. Em uma revisão realizada por Menezes *et al* em 2009, dos 41 casos de reação reversa associada a IRIS, 12 (27.3%) apresentaram neurite associada ao estado reacional (Menezes et al. 2009). Entretanto, até o presente momento, nenhum trabalho analítico avaliou a gravidade do acometimento neurológico periférico nesse grupo de pacientes.

A prednisona é a droga de escolha para o tratamento de reação reversa. No contexto da infecção pelo HIV, tem demonstrado ser benéfico para o tratamento de tuberculose associada à IRIS (Galligaro et al. 2011). Entretanto, recomenda-se que o uso de corticosteroide em pacientes infectados pelo HIV deva ser realizado de forma cautelosa, observando potenciais riscos de desenvolvimento de doenças oportunistas e alterações metabólicas comumente encontradas em pacientes em uso de TARV. Nenhum trabalho, até o momento, verificou a segurança e a eficácia do uso de corticosteroide para o tratamento de reação reversa nos pacientes coinfectados HIV/*M. leprae*.

Evidências indicam que a reação reversa está relacionada ao aumento temporário da resposta imune mediada por células e hipersensibilidade tardia aos antígenos de *M. leprae* (Scollard et al. 2006). Durante os episódios reacionais, há uma exacerbação inflamatória local

na qual linfócitos T (principalmente células CD4+), recém- migrados para o sítio de lesão, se encontram associados à macrófagos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas (Sehgal et al. 1988). Há, nas lesões destes pacientes, expressão de interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-12, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), caracterizando uma resposta celular de perfil Th1 (Scollard et al. 2006). Este mecanismo imunológico/inflamatório parece exercer um papel fundamental no processo de eliminação da bactéria e seus constituintes (Sarno et al. 2008). Por outro lado, esta exacerbada produção de citocinas inflamatórias parece estar envolvida no processo do dano tecidual e gravidade da doença (Sarno et al. 2008). Até o momento, entretanto, nenhum estudo avaliou o perfil de citocinas em soro de pacientes em reação tipo 1, no contexto da coinfeção pelo HIV.

I.2. Revisão da Literatura:

1- Aspectos epidemiológicos da coinfeção pelo HIV/ *M. leprae*:

1.1- Aspectos epidemiológicos da hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, bactéria álcool-ácido resistente (BAAR), de multiplicação lenta, intracelular obrigatória, descrita pela primeira vez por Gerhard H. Armauer Hansen em 1873 (Levis& Ernst 2005). Essa moléstia acompanha a humanidade desde as eras mais remotas e nos dias atuais continua a ser um problema de saúde pública, não somente pelo seu caráter marginalizante, mas também pela sua potencialidade de provocar sequelas incapacitantes para o resto da vida.

Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) trabalha com o objetivo da eliminação da doença como problema de saúde pública, definida como uma taxa de prevalência menor que 1 caso por 10.000 habitantes, em níveis nacionais e regionais (WHO 2010). Este conceito representa uma queda na carga da doença, na qual a prevalência da doença não limita a produtividade e o desenvolvimento social.

No Brasil, apesar da queda da taxa de prevalência de 19,5 /10.000 em 1990 para 4,71/10.000 habitantes em 2000, a hanseníase ainda é um problema de saúde coletiva. O país ocupa a segunda posição no ranking de detecção de número de casos novo, atrás somente da Índia (WHO 2013). Em 2012, foram registrados 33.303 novos casos de hanseníase, no Brasil, e a taxa de prevalência foi de 1,51/10.000 habitantes (MS 2013a).

Entretanto, a doença não se distribui de forma homogênea no país e a taxa de prevalência, definida como o número de pessoas em tratamento para hanseníase em 31 de dezembro de cada ano por 10.000 habitantes, sofre grandes variações entre os estados que compõem a união e regionalmente entre os diferentes municípios de cada estado. Sendo assim, estados como Mato Grosso, Tocantins e Maranhão apresentam altas taxa de prevalência (variando entre 5 e 9,99 casos/ 10.000 habitantes), enquanto todos os estados da região sul, Minas gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Norte já atingiram a marca de <1 caso/10.000 habitantes (MS 2013a).

A variação nas taxas de prevalência pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles: diferenças econômicas entre as regiões, com áreas extremamente pobres com dificuldade de acesso aos serviços de saúde e alta densidade populacional local (pessoas vivendo em favelas por exemplo); baixa cobertura de profissionais de atenção básica à saúde, especialmente médicos que asseguram o rápido diagnóstico e tratamento, principalmente em áreas endêmicas; fragilidade no serviço de vigilância epidemiológica com baixa cobertura de contactantes; dificuldades na logística de distribuição dos medicamentos, principalmente nas áreas mais remotas do país; perfil epidemiológicos regionais com altas taxas de detecção de

casos multibacilares e alta detecção de casos novos em menores de 15 anos, indicando alta circulação de *M. leprae*; ausência de apoio político em determinadas regiões do país, associada à ignorância sobre a importância e magnitude da endemia; entre outros.

Outros parâmetros epidemiológicos também apresentaram grandes variações entre os estados brasileiros. Em relação à detecção de novos casos, o Brasil vem demonstrando um decréscimo em todos os estados da nação (MS 2013a). Entretanto, as regiões norte e centro-oeste apresentaram taxas de 42,3 e 40,1 /1000.000 habitantes, respectivamente, o que caracteriza hiperendemia (MS 2013a). A taxa de detecção de novos casos, no Rio de Janeiro, foi de 10,67/100.000 habitantes em 2012 (MS 2013a). Em relação à detecção de novos casos de hanseníase em crianças < 15 anos de idade, o Brasil apresentou uma taxa geral de 4,8/100.000 habitantes, o que é considerada alta para este grupo etário (MS 2013a). Nove estados apresentaram taxas abaixo da média nacional, enquanto 18 as apresentaram acima (MS 2013a). Tocantins, Mato grosso, Pará, Rondônia, Piauí, Maranhão e Pernambuco são considerados hiperendêmicos (MS 2013a). 85,9% dos pacientes foram considerados curados em 2012, porcentagem considerada regular pelos critérios do Ministério da Saúde do Brasil (MS 2013a). O Rio de Janeiro apresentou alta taxa de cura em 2012: 90,6% (MS 2013a). A detecção de novos casos com grau de incapacidade II atingiu 1,15, no Brasil, em 2012 (MS 2013a). Maranhão e Mato Grosso apresentaram os piores indicadores com 3,5 novos casos com grau de incapacidade II/ 100.000 habitantes e nenhuma redução nos últimos anos, enquanto o Rio de Janeiro apresenta uma redução sustentada neste aspecto (MS 2013a).

1.2- Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HIV

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é o estágio clínico e laboratorial mais avançado da infecção pelo HIV. Ela foi inicialmente reconhecida, nos Estados Unidos, em meados do ano de 1981 (Del Rio & Curran 2005). Apenas três anos após o aparecimento dos primeiros casos da doença, o vírus causador da moléstia foi descrito por Luc Montagnier na França, sendo mais tarde, denominado vírus da imunodeficiência humana (Montagnier 2002) e classificado na família Retroviridae. Atualmente a infecção pelo HIV é pandêmica, distribuí-se universalmente e é uma das principais causas de morte em todo o mundo (Merson & Piot 2005).

Como resultado das profundas diferenças geográficas e socioeconômicas, a distribuição dos casos de infecção pelo HIV, no Brasil, é caracterizada por uma ampla heterogeneidade. A propagação da infecção pelo HIV, no País, revela uma epidemia de múltiplas dimensões que vem, ao longo do tempo, sofrendo transformações significativas em seu perfil (de Brito 2000). Na década de 80, a doença era restrita a algumas regiões metropolitanas de grandes cidades,

principalmente São Paulo e Rio de Janeiro, e marcadamente masculina, atingindo principalmente homens que fazem sexo com homens (HSH) e indivíduos hemofílicos (de Brito 2000). Na década de 90, houve um importante processo de *heterossexualização*, resultando em crescimento de casos em mulheres; de *interiorização*, atingindo cidades com menos do que 50.000 habitantes e da *pauperização* da epidemia (de Brito 2000). Os anos 2000 foram marcados pela introdução e disponibilidade da TARV para todos os indivíduos com AIDS no país. Desta forma, houve uma diminuição da mortalidade por AIDS, redução de 25% da incidência da doença em crianças < 5 anos de idade e aumento da sobrevivência dos pacientes. Entretanto, a relação homem: mulher continuou diminuindo, com inversão desta relação na faixa etária entre 13 e 24 anos. Além disso, houve um aumento da incidência entre homens e mulheres > 50 anos de idade (MS 2013b).

Hoje, estima-se que 34 milhões de pessoas vivam com HIV no mundo (UNAIDS 2012). O número de casos novos em todo o planeta declinou de 3 milhões em 2001 para 2,5 milhões em 2011 e o número de óbitos pelo AIDS foi de 1,7 milhão em 2011 (UNAIDS 2012).

No Brasil, uma forte ênfase na prevenção e um programa internacionalmente reconhecido de tratamento dos infectados pelo HIV vêm mantendo a taxa de prevalência estável. Entre 1980 e junho de 2012, 656.701 casos de AIDS foram notificados no país e estima-se 530.000 pessoas vivam com HIV no Brasil (MS 2013b). Em 2011, 38.776 novos casos de AIDS foram notificados no país; sendo que destes, 5.068 no estado do Rio de Janeiro (MS 2013b). Ainda em 2011, houve 12.044 óbitos por AIDS no Brasil; dos quais, 1.700 no Rio de Janeiro (MS 2013b). A taxa de prevalência na população geral do país em 2012 foi de 0,4%, entretanto, esta taxa não se distribuiu de forma homogênea na sociedade brasileira e algumas populações mostram-se mais vulneráveis à infecção (MS 2013b). Neste contexto a taxa de prevalência foi de 0,5% entre indivíduos do sexo masculino, 0,3% entre as mulheres, 10,5% entre homens que fazem sexo com outros homens (HSH), 4,9% entre profissionais do sexo e 5,9% nos indivíduos usuários de drogas ilícitas (MS 2013b).

1.3- Aspectos epidemiológicos da coinfeção pelo HIV/ *M. leprae*.

Desde o início da pandemia do HIV, houve uma grande preocupação em relação à coinfeção pelo HIV/*M. leprae*, uma vez que era observado que indivíduos infectados pelo HIV eram mais susceptíveis à infecção pelo *M. tuberculosis* e outras micobacterioses atípicas, fazendo com que a tuberculose reemergisse como grave problema de saúde pública no mundo. Entretanto, na era pré- TARV, os poucos estudos realizados sobre a infecção concomitante do HIV e da hanseníase encontraram poucas e contraditórias associações entre as duas doenças. Em estudo realizado no Rio de Janeiro, Andrade *et al* encontraram uma

soroprevalência de infecção pelo HIV de 0,3% em 1.016 pacientes com hanseníase, testados entre 1990 a 1992 (Andrade 1997). Em oito estudos de caso controle realizados em diferentes países da África e Ásia, na década de 90 do século passado, não se verificou uma maior prevalência de infecção pelo HIV em pacientes com hanseníase em relação aos controles (Kawuma 1994; Lienhardt 1996; Sekar 1994; Milanga 1999; Leonard 1990; Ponnighaus & Oxborrow 1991; Borgdorff 1993). Três estudos de caso controle realizados na África entre 1989 e 2003, cujos grupos controles eram doadores de sangue (Meeran 1989; Moses 2003; van den Broek 1997) verificaram um pequeno aumento da prevalência de infecção pelo HIV em pacientes com hanseníase. Esses trabalhos, no entanto, mostraram que qualquer aumento na prevalência de HIV em pacientes com hanseníase é pequena e substancialmente menor se comparada com a prevalência de HIV em indivíduos com tuberculose ou infectados com *Micobactérias* do complexo *avium* (Ustianowski 2006). No entanto, como relatado na justificativa desta tese, recentemente alguns estudos vêm demonstrando que o uso de TARV pode estar associado à apresentação de sintomas para hanseníase (Sarno 2008; Vinay 2009; Couppie 2009).

Até o presente momento, não há estudos na literatura e nem documentos governamentais que indiquem o número de pessoas coinfetadas no mundo e no Brasil, assim como sua prevalência e incidência em diferentes países. É importante destacar que relatos de casos e de série de casos, assim como estudos analíticos sobre pacientes coinfetados já foram realizados em diferentes países com destaque para Brasil, Guiana Francesa, Índia e países da África.

2- Aspectos clínicos e imunopatológicos da coinfeção pelo HIV/ *M. leprae*.

2.1- Aspectos clínicos e imunopatológicos da hanseníase.

A maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não desenvolve hanseníase e nos indivíduos que adoecem, a infecção evolui de maneiras diversas, de acordo com a resposta imunológica específica do hospedeiro frente ao bacilo (Gallo 2005).

Sendo assim, a apresentação clínica da hanseníase abrange uma grande variedade de sinais e sintomas, assim como de alterações histopatológicas que podem ser divididas em dois polos distintos de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro: polos tuberculóide e lepromatoso (Ridley & Jopling 1966). Os indivíduos com a forma tuberculóide apresentam um predomínio da resposta celular de perfil Th1 contra o *M. leprae* com expressão de citocinas dos tipos interleucina (IL) IL -2, IL- 12, IL-18; Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF –alfa) e interferon gama (IFN – gama) (Gallo 2005). Por outro lado, os indivíduos do polo lepromatoso apresentam um quadro de anergia específica ao *M. leprae*. As lesões se apresentam com uma relação CD4/CD8 invertida. Há expressão de citocinas predominantemente de perfil Th2 (IL-

4, IL-5 e IL-10), sugerindo suscetibilidade à doença (Gallo 2005). Algumas apresentações clínicas e alterações histopatológicas localizam-se entre esses dois polos e a classificação proposta por Ridley e Jopling em 1966 e modificada em 1971 descreve a doença em seis categorias diferentes (Ridley& Jopling 1966):

Indeterminada (MHI): Lesões maculares hipocrômicas ou áreas de hipoestesia cutânea. Frequentemente, apenas a sensibilidade térmica está alterada com comprometimento apenas de ramos cutâneos nervosos. Caracteriza-se histologicamente por infiltração leve de células mononucleares ao redor de vasos sanguíneos, anexos cutâneos e nervos. BAAR habitualmente não são encontrados.

Tuberculóide (TT): lesões em placas ou máculas eritematosas ou hipocrômicas com bordas bem delimitadas, localizadas, únicas ou em pequenos números, apresentando pouco ou nenhum bacilo e com alteração da sensibilidade, tanto térmica, como dolorosa e tátil. Caracteriza-se histologicamente pela presença de granulomas epitelióides com predomínio de linfócitos T CD4 e produção de interleucina- 2 (IL-2) e interferon- gama (INF- γ). Os granulomas são focais, circundados por zonas espessas de linfócitos, há a presença de células gigantes de Langhans e tocar a camada basal da epiderme. A pesquisa de BAAR geralmente é negativa e, quando presente, encontra-se no interior dos nervos.

Tuberculóide *Borderline* (BT): lesões em máculas ou placas, semelhantes à forma tuberculóide, porém são menores em diâmetro e em maior número. A superfície é menos seca, o crescimento de pelos é menos afetado e os nervos periféricos afetados são mais numerosos. Lesões pequenas, satélites, estão, às vezes, presentes na periferia das lesões maiores. Na histopatologia, existe granuloma de células epitelióides, com menor número de células gigantes. O infiltrado geralmente não toca a zona subepidérmica. Os nervos podem estar moderadamente edemaciados e o índice baciloscópico (IB) varia de 0 a 2⁺ (Ridley& Hilson 1967) (Ridley 1974).

***Borderline Borderline* (BB):** lesões de tamanhos e números intermediários entre as tuberculóides e lepromatosas, a anestesia é de grau moderado e algumas exibem aspecto de “saca-bocado” ou “queijo suíço.” São placas eritematosas com bordas externas não delimitadas e centro oval hipopigmentado e com bordas internas bem definidas. Pequenas lesões satélites também podem ser visualizadas. Histologicamente caracteriza-se pela presença de células epitelióides que se espalham difusamente, nem sempre formando granulomas típicos. As células de Langhans podem estar ausentes. Os nervos podem estar parcialmente acometidos com laminação do perineuro. Os bacilos estão presentes (Ridley& Hilson 1967) (Ridley 1974).

Lepromatosa *Borderline* (BL): lesões clinicamente semelhantes às da forma lepromatosa, porém não tão brilhantes e suculentas. Alguns nódulos são deprimidos no centro e algumas placas podem ter aspecto de “saca-bocado”. São comuns os nervos periféricos espessados. Histologicamente, as lesões podem ser de dois tipos: granuloma composto de células histiocíticas e os linfócitos são raros. Outro tipo de lesão, nesta forma clínica, mostra depósito de lipídios, porém há áreas de denso infiltrado linfocitário. Em ambos os tipos de lesão os bacilos são numerosos. Os nervos perdem a estrutura normal, mas não apresentam aumento de celularidade (Ridley& Hilson 1967) (Ridley 1974).

Lepromatosa (LL): Lesões cutâneas podem, inicialmente, apresentar aspectos variados (máculas, pápulas, tubérculos, nódulos e infiltração), múltiplas, simétricas e de coloração eritematosa. À medida que vão surgindo novas máculas e pápulas, as mais antigas vão se tornando placas e nódulos, respectivamente. Gradativamente, ocorre infiltração difusa da pele, mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos e podendo afetar ainda linfonodos, baço e fígado. Neste grupo, não há lesão neural pura e as lesões iniciais são cutâneas. O comprometimento dos nervos acontece nos pequenos ramos da pele, na inervação vascular e nos troncos nervosos, podendo ocasionar deficiências funcionais e sequelas tardias. Observa-se, na histologia, granuloma formado por histiócitos com variável grau de degeneração gordurosa, formação de células vacuoladas e eventualmente globias; os linfócitos são raros, quando presentes, estão espalhados difusamente. Os nervos podem mostrar alguma alteração estrutural, mas sem infiltração celular. Os bacilos estão presentes em concentração de 5+ a 6+(Ridley 1974; Ridley& Hilson 1967).

Alguns autores descrevem outra classificação clínica da hanseníase, denominada neural pura (NP) (Gallo 2005). Essa forma da doença é caracterizada pelo acometimento dos nervos periféricos, porém sem evidência de lesão dermatológica. Diversos estudos, realizados em diferentes áreas endêmicas, relatam uma incidência de forma neural pura que varia entre 4,2 a 17,7% dos indivíduos com hanseníase, dependendo do local onde o estudo foi realizado(Kumar 2004b).

O comprometimento neurológico nas formas tuberculóides caracteriza-se principalmente por uma mononeuropatia simples ou múltipla. Já nas formas lepromatosas, o envolvimento dos nervos é compatível com uma polineuropatia, com o acometimento inicial de fibras mielínicas de pequeno calibre e fibras amielínicas. Os principais nervos acometidos são ulnar, mediano, femoral, ramo oftálmico, fibular comum e tibial posterior (Waters& Jacobs 1996). A gênese da lesão neural parece estar associada a diversos fatores. Se a ação direta do *M. leprae* nas células de Schwann seria capaz de provocar danos neurais ainda não

está totalmente comprovada, uma vez que bacilos vivos e mortos estão presentes nas lesões. Todavia, alguns estudos observaram que a ligação da bactéria em receptores *toll like 2* (TLR2) nas células de Schwann podem provocar apoptose celular (Scollard 2006). Além disso, Rambukkana *et al* observaram grande desmielinização dos nervos logo após a aderência do *M. leprae* na superfície das células de Schwann e na ausência de resposta imune celular, interpretando como se tal fato ocorresse por um mecanismo contato dependente que se relacionaria com o glicolípido- fenólico 1 (PGL-1). Por outro lado, a resposta imune parece ter uma ação importante no processo do dano neural. A ação destrutiva de granulomas bem formados é bem conhecida na pele e parece ter papel semelhante nos nervos. As células de Schwann infectadas por *M. leprae* expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC II) e se mostraram altamente susceptíveis à destruição por clones de linfócitos T CD4 citotóxicos. Os nervos infectados parecem ser também lesados por episódios inflamatórios recorrentes. Os macrófagos intraneurais são capazes de secretar citocinas e quimiocinas, como por exemplo, TNF- alfa e óxido nítrico, que são deletérias para os nervos. Uma resposta de anticorpos policlonais tem sido verificada em muitos pacientes e a destruição provocada pela interação desses anticorpos com componentes do sistema nervoso periférico tem sido tema de investigação de diversos pesquisadores. Além de mediadores químicos, outro fator decorrente da resposta imunológica e inflamatória parece exercer papel fundamental na patogênese da lesão neural: o edema. Há indícios que a compressão dos nervos pelo aumento da pressão decorrente da formação do edema é uma das causas de dano neurológico.

Além do diagnóstico clínico e histopatológico, alguns exames complementares como a baciloscopia de esfregaço cutâneo, o teste da lepromina (reação de Mitsuda), o teste da histamina, a sorologia com detecção de anticorpos IgM anti- PGL1 e a reação de polimerase em cadeia são importantes para o diagnóstico, classificação e prognóstico da doença.

A baciloscopia de esfregaço cutâneo é uma importante ferramenta diagnóstica. O exame é realizado através da coleta de linfa, por raspagem de tecido dérmico, nos lóbulos das orelhas, dos cotovelos e na lesão suspeita. O material é examinado pela técnica de Ziehl-Neelsen para a identificação de BAAR. A reação de Mitsuda é um teste de aplicação intradérmica de lepromina que determina o grau de reatividade celular apresentado contra o *M. leprae* após 28 dias a contar da aplicação (Gallo 2005).

A reação de polimerase em cadeia para detecção de DNA de *M. leprae* e o teste sorológico ELISA (Enzyme- Linked Immunosorbent Assay) para detecção de anticorpos contra o antígeno específico do *M. leprae*: PGL-1, ainda não são utilizados rotineiramente,

mas são aplicados em caso de dúvida diagnóstica em centros de referência e para estudos epidemiológicos respectivamente (Scollard 2006).

A descoberta da Dapsona na década de quarenta tornou a hanseníase uma doença tratável. A partir da década de oitenta, o tratamento da hanseníase se faz segundo recomendações da OMS, através de um regime de associação de quimioterápicos- poliquimioterapia (PQT)- bacteriostáticos e bactericidas por tempo pré-determinado, de acordo com a classificação da doença, com a finalidade de aumentar o índice de cura e prevenir resistência às drogas (Levis & Ernst 2005). As medicações atualmente disponíveis para o tratamento são: rifampicina, clofazimina, dapsona, ofloxacina e minociclina (Gallo 2005). As três primeiras medicações são consideradas como agentes de primeira linha, enquanto as duas últimas são utilizadas em caso de intolerância ou alergia às outras drogas (Levis & Ernst 2005). A rifampicina é a droga de maior poder bactericida contra a *M. leprae* e é considerada o principal componente da associação dos quimioterápicos (Gallo 2005; Levis & Ernst 2005).

Segundo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil, os pacientes paucibacilares são tratados com 600 mg de rifampicina e 100 mg de dapsona em doses únicas mensalmente sob supervisão dos profissionais de saúde, associadas a 100 mg de dapsona em doses diárias autoadministradas. O tratamento para pacientes paucibacilares deve ser concluído após seis doses supervisionadas em até nove meses. Os pacientes multibacilares são tratados com rifampicina 600mg/ mês, clofazimina 300 mg/ mês e dapsona 100mg/mês em doses únicas mensais e sob supervisão, além de dapsona 100 mg/ dia e clofazimina 50 mg/ dia em doses diárias auto- administradas. O tratamento para pacientes multibacilares deve ser concluído após doze doses supervisionadas em até 18 meses (Gallo 2005).

O curso crônico e lento da hanseníase pode ser interrompido, em alguns pacientes, por episódios inflamatórios imunomediados denominados de reações da hanseníase. Os estados reacionais se caracterizam por serem agudos ou subagudos; com comprometimentos neurológicos, cutâneos e/ ou sistêmicos (Gallo 2005). As reações podem ocorrer antes da introdução da poliquimioterapia, na vigência desta, e após a autoterapêutica (MS 2010). As reações são classificadas em: reação tipo 1 (RT1) ou reação reversa e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH) (Gallo 2005). Nos casos em que esta inflamação aguda se exterioriza unicamente com o comprometimento dos troncos periféricos, utiliza-se a denominação neurite isolada (Naafs 1996). Alguns autores consideram a neurite isolada como um terceiro tipo de reação (Lienhardt & Fine 1994), mas a maioria dos trabalhos a incluem como reação tipo 1.

A RT1 caracteriza-se clinicamente por reativação das lesões pré-existentes ou aparecimento de novas lesões com eritema e edema. Sintomas sistêmicos como edema de

extremidades, febre baixa e mal estar geral podem ocorrer (Gallo et al. 2005). As neurites são frequentes e se caracterizam pelo espessamento dos nervos acometidos com dor e sensibilidade local. Pode haver alterações motoras, sendo os nervos mais acometidos o ulnar, causando “mão em garra”; o nervo poplíteo lateral, provocando “pé caído”; e o nervo facial, produzindo paralisia facial e, conseqüentemente, lagofalmo (Pearson& Ross 1975; Swift& Sabin 1998). A RT1 pode ocorrer no curso da evolução tanto no polo paucibacilar quanto no multibacilar, mas acomete principalmente os pacientes com as formas clínicas BT, BB e BL. Ela ocorre essencialmente nos primeiros seis meses de tratamento com poliquimioterapia (Rose& Waters 1991) e cerca de 33% dos pacientes podem apresentar episódios recorrentes (Lockwood 1993; Vijayakumaran 1994). Imunologicamente verifica-se na RT1 aumento da resposta imune celular com elevação da produção de IFN- gama e TNF- alfa, levando a formação de granulomas e crescimento da atividade microbicida dos macrófagos (Gallo 2005).

A apresentação clínica do ENH caracteriza-se pelo aparecimento súbito de nódulos inflamatórios, que frequentemente, são dolorosos ao toque (Jolliffe 1977). Vesículas e ulcerações podem, eventualmente, ocorrer em reações graves (Rea 1989). A síndrome da resposta inflamatória sistêmica está usualmente presente e, em alguns casos, o quadro reacional evolui com neurite, orquite, epididimite, irite, iridociclite, artrite, linfadenite e danos hepáticos e renais. A reação tipo 2 geralmente ocorre após o primeiro ano de tratamento com PQT (Scollard et al. 1994) e recorrências são comuns. O ENH acomete os indivíduos com as formas clínicas BL e LL e não ocorre em pacientes do polo tuberculóide. A reação tipo 2 está associada à exacerbação das respostas imunológicas humoral e celular com aumento da produção de citocinas como: TNF- alfa, IL-1, IL- 2, IL-6 e IL- 8. Nas lesões, predominam o infiltrado linfoplasmocitário com neutrófilos e vasculite (Gallo et al. 2005).

O manuseio dos estados reacionais com a utilização de drogas específicas, em nosso país, segue protocolos determinados pelo Ministério da Saúde (MS 2010). A droga de escolha para a reação tipo 1 e/ou neurite é a prednisona na dosagem de 1 a 2mg/kg/dia, de acordo com a avaliação clínica. As doses são reduzidas em intervalos fixos pré- determinados. A dose calculada deve ser mantida até haver regressão clínica do quadro reacional. A metilprednisolona venosa é utilizada para tratamento dos casos em que há exuberante acometimento cutâneo, neurite grave ou quando há falha terapêutica com o uso de prednisona.

Na reação tipo 2, utilizam- se preferencialmente drogas não esteroidais inibidoras do TNF- alfa como a talidomida, exceto quando há contra indicação (em mulheres em idade fértil utiliza-se a pentoxifilina). A dose da talidomida é de 100 a 400 mg por dia, conforme a gravidade do quadro(Araújo 2003; Nery 1999; Nery 2006).

2.2- Aspectos clínicos e imunológicos da infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV é um processo dinâmico em que a contínua replicação viral causa um declínio e uma disfunção da resposta imune celular. As manifestações clínicas da infecção pelo HIV estão intimamente relacionadas à progressiva depleção e disfunção qualitativa dos linfócitos T *auxiliares* que expressam receptores CD4. Dessa forma, didaticamente, o espectro clínico da infecção pelo HIV inclui a síndrome retroviral aguda, infecção assintomática, infecção sintomática precoce e AIDS (Sterling& Chisson 2005).

A síndrome retroviral aguda corresponde à infecção primária pelo HIV e caracteriza-se por apresentar alta viremia plasmática e queda súbita da contagem de linfócitos T CD4 (Fauci et al. 1996). Parte dos indivíduos com infecção aguda pelo HIV apresenta sintomatologia. As manifestações iniciam-se, geralmente, entre 1 a 6 semanas após a exposição ao vírus e se caracterizam, na maioria das vezes, por uma síndrome mononucleose-símile, porém casos graves como síndrome de Guillain-Barré e de infecções oportunistas podem ocorrer (Sterling& Chisson 2005).

Um dos principais fatores relacionados à cronicidade e à progressão da doença é o estado de hiperativação imune causada pelo HIV. As células TCD4 efectoras e de memórias são os principais alvos de infecção do HIV e oferecem as condições ideais para a replicação viral, melhora do que as células T CD4 *naive*. Descobertas recentes indicam que durante a fase aguda da infecção há uma vasta destruição de linfócitos T de memória CCR5+ CD4+ na mucosa intestinal, tanto por mecanismos citopáticos como por apoptose (Cadogan& Dalglish 2008). Tal fato pode estar relacionado à ativação celular ao causar uma ruptura da homeostase do sistema imune que ao tentar repor as perdas iniciais promove um cenário de hiperatividade crônica (Picker& Watkins 2005). Outra hipótese relaciona-se a uma possível translocação de bactérias intestinais com liberação de antígenos de lipopolissacarídeos na corrente sanguínea levando à ativação imune (Brenchley 2006).

Em cerca de 6 a 12 semanas após a infecção inicial, há uma queda da viremia plasmática do HIV consequente ao aparecimento de anticorpos contra o vírus e a recuperação parcial da resposta imune celular (Fauci 1996).

Entretanto, a despeito da resposta imune o HIV consegue sobreviver e continua e quase nunca é eliminado por completo do organismo. A infecção pelo HIV apresenta então, uma fase de latência clínica, algumas vezes totalmente assintomática ou, em cerca 50 a 70% dos casos, com a presença de um quadro de linfadenomegalia generalizada persistente (Sterling& Chisson 2005). Nesse espaço de tempo, apesar da escassez de sintomas, o estado de ativação imune se mantém caracterizado pela hiperativação de células B, levando a hipergamaglobulinemia; aumento do “turnover” de linfócito; ativação de monócitos;

expressão de marcadores de ativação de células T CD4 + e CD8 + ; aumento da apoptose celular; hiperplasia dos linfonodos, particularmente nos períodos iniciais da doença; aumento da secreção de citocinas pro- inflamatórias, especialmente a IL-6; aumento dos níveis elevados de proteína C reativa, fibrinogênio, neopterin, receptores solúveis de IL-2 ; e fenômenos autoimunes (Fauci 2008). Sendo assim, o vírus continua seu processo de replicação principalmente nos órgãos linfoides, a contagem de células CD4 cai gradualmente no decorrer dos anos e uma série de sinais e sintomas pode aparecer, dependendo do grau de imunossupressão, da exposição aos patógenos e do subtipo do HIV(Hogan& Hammer 2001).

A AIDS é a manifestação mais grave do espectro clínico da infecção pelo HIV(Del Rio& Curran 2005). A síndrome é definida pelo desenvolvimento de infecções oportunistas ou neoplasias, resultantes da progressiva imunossupressão causada pelo vírus ou quando o indivíduo apresenta uma contagem de linfócitos T CD4 < 200 células/mm³(Sterling& Chisson 2005).

Além de processos neoplásicos e infecções oportunistas, uma série de disfunções orgânicas pode ocorrer no curso clínico da infecção pelo HIV como, por exemplo, alterações metabólicas, oculares, renais, cardíacas e hematológicas, tanto por ação citopática do vírus como por fenômenos imunológicos(Sterling& Chisson 2005).

Sintomas de neuropatia periférica são comumente encontrados na infecção pelo HIV. Estima-se que cerca de 35% dos pacientes HIV positivos apresentem sinais e sintomas de neuropatia periférica. A forma mais comum de doença neurológica periférica relatada em pacientes infectados pelo HIV é a polineuropatia simétrica distal e acomete principalmente os membros inferiores. Outros tipos de neuropatia também podem ocorrer como: polirradiculopatia, mononeurite múltipla e síndrome linfocitária infiltrativa difusa. A patogenia do acometimento neurológico periférico em pacientes HIV positivos parece estar relacionada à ação direta do vírus; o mal estado nutricional dos pacientes, a deficiência de vitaminas- principalmente as do complexo B, com B12 e B1 e o uso de medicações neurotóxicas como a estavudina, didanosina, vincristina e isoniazida (Sterling& Chisson 2005).

A infecção pelo HIV/AIDS não somente se caracteriza pela susceptibilidade à infecções oportunistas que normalmente não infectam indivíduos imunocompetentes mas ela também pode agravar as manifestações de infecções por outros patógenos. A tuberculose, por exemplo, causa mais frequentemente doenças ativas e extrapulmonares em pessoas infectadas pelo HIV e as infecções pelos vírus da hepatite B ou hepatite C progredem mais rapidamente nos indivíduos coinfectados pelo HIV.

A terapia antirretroviral, realizada atualmente como a combinação de três ou mais drogas antirretrovirais, de pelo menos duas classes distintas é a base da terapêutica da AIDS. Após o advento da TARV, verificou-se uma queda significativa na morbidade e na mortalidade determinadas pela doença (Hanna & Hirsch 2005). Existem, atualmente, diversos medicamentos antirretrovirais de sete classes distintas disponíveis para tratamento. As sete classes são: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos, inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos, inibidores da integrase, inibidores da protease, inibidores de fusão e inibidores de CCR5. A indicação de início da terapia anti-retroviral depende de parâmetros clínicos e laboratoriais (Hanna & Hirsch 2005).

O tratamento da AIDS com a TARV aparentemente restaura rapidamente a resposta imunológica dos pacientes. Isso pode ser indiretamente confirmado pela diminuição na incidência de doenças oportunistas após o advento da TARV e pela possibilidade de suspensão das quimioprofilaxias para infecções oportunistas, após o aumento de células T CD4 subsequente ao tratamento antirretroviral (French et al. 2004). Entretanto, em alguns pacientes pode haver manifestações atípicas de doenças oportunistas ou doenças inflamatórias, após o início de TARV, apesar da queda da viremia do HIV. Este fenômeno inflamatório é denominado de síndrome inflamatória de recuperação imunológica (IRIS), síndrome de recuperação imune (SRI), doença de restauração imune (IRD) ou reação paradoxal. Embora já tenha sido descrita, desde 1955, relacionada ao início de anti-tuberculostático em pessoa soronegativas para HIV com tuberculose pulmonar, a IRIS tornou-se frequente com o advento da TARV. O primeiro relato de caso deste fenômeno associado à infecção pelo HIV foi descrito em 1992 por French *et al*, e aborda um caso de um paciente que apresentou quadro clínico atípico de infecção por MAC, após ter iniciado monoterapia com Zidovudina (French et al. 2004). Desde então, diversos relatos de casos e séries de casos foram descritos associando a IRIS principalmente à tuberculose e micobacteriose atípica, assim como às infecções por citomegalovírus, vírus herpes simplex, vírus herpes-zoster, vírus das hepatites B e C, *Cryptococcus neoformans* e processos não infecciosos como sarcoidose, lupus eritematoso sistêmico, polimiosite, artrite reumatóide e doença de Graves (French et al. 2004).

A IRIS é caracterizada pela piora paradoxal de parâmetros clínicos e laboratoriais de infecções ou processos não infecciosos subclínicos ou latentes subsequentes ao início de HAART, apesar da melhora dos marcadores imunológicos contra a infecção pelo HIV. Não existe consenso sobre a definição de infecção relacionada a IRIS, no entanto, em 2004, French *et al* propuseram uma série de critérios de diagnóstico que são amplamente utilizados pela

literatura científica. De acordo com essa proposta, o diagnóstico de infecção relacionada a IRIS deve incluir dois critérios maiores ou um critério maior associado a dois menores. Os critérios maiores e menores são (French et al. 2004):

- Critérios maiores:
 - A. Apresentação atípica de doenças oportunistas ou tumores em pacientes com boa resposta ao tratamento antirretroviral. Considera-se apresentação atípica: doença localizada; resposta inflamatória exagerada e progressão de disfunção de órgão previamente afetado e aumento de lesões pré-existentes após melhora com o tratamento patógeno- específico.
 - B. Diminuição de carga viral do HIV $> 1 \log_{10}$ cópias/ ml.
- Critérios menores:
 - C. Aumento de linfócitos T CD4 após o início de HAART.
 - D. Aumento da resposta imune específica a determinante patógeno. Ex.: positividade da prova tuberculínica em paciente previamente negativo.
 - E. Resolução espontânea da doença sem utilização de antimicrobiano específico ou quimioterapia para neoplasia, em uso contínuo de HAART.

Poucos trabalhos estudaram a patogenias da IRIS. Na revisão de French *et al*, em 2004, a IRIS é classificada em dois tipos: precoce e tardia. A síndrome inflamatória de recuperação imune precoce teria como mecanismo patogênico uma resposta imune contra infecções subclínicas, o que ocorreria nos primeiros três meses de TARV. Micobacteriose atípica e tuberculose como manifestações de IRIS seriam dois típicos exemplos dessa resposta precoce. A IRIS tardia parece resultar de uma resposta imune contra antígenos de patógenos oportunistas e ocorrem após três meses de terapia anti-retroviral. Dois exemplos desse tipo de resposta seria uveíte por citomegalovírus e linfadenite por *Criptococcus neoformans*(French et al. 2004). French *et al* sugerem, ainda, que o substrato imunopatológico da IRIS está relacionado aos diferentes patógenos. A IRIS desencadeada por infecções fúngica e de micobactérias parecem ser o resultado de uma resposta de hipersensibilidade tardia, enquanto nas infecções virais estariam relacionadas a uma resposta de linfócitos citotóxicos T CD8 (French et al. 2004). Bourgarit *et al*, em 2006, ao analisar a produção *in vitro* de 25 citocinas inflamatórias e imunomodulatórias, quimiocinas e receptores solúveis de citocinas em sobrenadante de células mononucleares antígeno- estimuladas coletadas de sangue periférico de quatro pacientes (três em curso de IRIS e um sem IRIS), mostraram que nos pacientes com IRIS há uma maior produção de citocinas/ quimiocinas de perfil Th1 [IFN- gama, IL-2, IL-12, proteína 10 induzida por IFN-gama (IP-10) e monocina induzida por IFN-gama], citocinas/ quimiocinas inflamatória [TNF- alfa, IL-6, IL1 β e proteína 1 quimioatrativa de monócito

(MCP-1)] e citocina de perfil Th2 (IL-10) (Bourgarit et al. 2006). A sarcoidose relacionada a IRIS está associada com intensa infiltração de linfócitos T CD4 nos granulomas e alveolite por infiltração de células T CD4 (French et al. 2004).

Alguns autores avaliaram os fatores de risco para o desenvolvimento de IRIS. Shelburne *et al*, em 2005, verificaram que a diminuição da carga viral em 2 Log₁₀ em pacientes que iniciam uso de antirretroviral pela primeira vez e o começo precoce da TARV em relação à terapia específica da doença oportunista são fatores independentes de risco para IRIS (Shelburne et al. 2005). Murdoch *et al*, em 2008, mostraram que a única variável independente que se relacionou ao desenvolvimento de IRIS foi contagem de células T CD4 < 100/mm³ antes da introdução da TARV (Murdoch et al. 2008). Já Manabe *et al*, em 2007, verificaram que o desenvolvimento de IRIS estaria independentemente relacionado ao uso de inibidores de protease associados ao ritonavir, contagem de CD4 < 100/mm³ antes do início de TARV e redução de 2,5 Log₁₀ de carga viral do HIV (Manabe et al. 2007). Lawn *et al*, em 2007, observaram que a contagem de células T CD4 < 50/mm³ e início precoce de TARV em relação ao início de anti-tuberculostático seriam fatores independentes de risco para IRIS (Lawn et al. 2007).

2.3- Aspectos clínicos e imunopatológicos da coinfeção pelo HIV/ *M. leprae*.

A partir do momento que a infecção pelo HIV afeta a imunidade celular, acreditou-se que os pacientes coinfectados apresentariam as formas lepromatosas da doença. Cinco estudos mostraram que o HIV não afeta a frequência das formas tuberculóides nem das lepromatosas (Frommel 1994; Gebre 2000; Munyao 1994; Orege 1993; van den Broek 1997). Dois estudos evidenciaram proporções significativamente maiores de pacientes multibacilares do que paucibacilares (Borgdorff 1993; Lienhardt 1996).

As alterações histopatológicas das lesões de pacientes coinfectados são semelhantes às dos pacientes sem HIV, como já foi demonstrado em vários relatos de casos ou séries de casos (Arora & Johri 1994; Arunthathi 1998; Belliappa 2002; Blum 1993; Bwire & Kawuma 1993a, 1993b; de Almeida 1994; Detsky 2013; Goodless 1994; Graf von Ballestrem 1992; Inamadar 2003; Jacob 1996; Jayasheela 1994; Kennedy 1990; Lamfers 1987; Lanjewar 2002; Mendiratta 2001; Moran 1995; Moreno-Gimenez 2000; Olivares 1994; Pereira 2004; Rath & Kar 2003; Sampaio 1995; Sayal 1997; Thappa 1996; Vreeburg 1992).

Alguns estudos avaliaram a resposta imunológica em pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae*. Carvalho *et al*, em 2012, verificaram uma frequência menor de células natural killer no sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV em relação aos controles saudáveis. (Carvalho 2012). Giacoia- Gripp *et al*, em 2011, observaram aumento de expressão de CD38

em linfócitos TCD8 em pacientes apresentando RT1 associada à IRIS (Giacchia-Gripp 2011). Em outros estudo de Carvalho *et al*, em 2008, especulou-se que a infecção pelo *M. leprae* pode exacerbar a imunopatogênese da infecção pelo HIV através de uma maior ativação de linfócitos T CD8, aumento da relação Vδ1: Vδ2 e diminuição de células dendríticas plasmocitoides (Carvalho 2008). De Oliveira *et al*, em 2013, indicaram que o aumento de expressão de células TCD8 efetoras de memória e da produção de porfina/ granzima B estão relacionado à RT1 em pacientes coinfectados (de Oliveira 2013).

Algumas evidências sugerem que a frequência e o tipo de reação se alteram na coinfeção. Um estudo realizado na Etiópia com pacientes multibacilares mostrou um maior risco de evolução para reação tipo 2 [risco relativo (RR): 5,2] e recorrência de reação reversa (RR: 2,2) entre os pacientes co- infectados (Gebre 2000). Entretanto, o referido estudo baseou-se em um número pequeno de pacientes (apenas três pacientes coinfectados tiveram ENH e reação reversa recorrente) (Ustianowski 2006). Já em outro estudo realizado em Uganda, em 1994, foi demonstrado que pacientes com hanseníase multibacilar e HIV têm maior chance de apresentarem reação reversa e neurite associadas (Bwire & Kawuma 1994).

O primeiro caso que associou o uso de TARV com o desenvolvimento de estado reacional da hanseníase foi publicado por Opromolla *et al* em 2000 ao descreverem o caso de uma paciente, com hanseníase dimorfa, que evoluiu com reação reversa um mês após a troca da TARV (Opromolla 2000). Nessa publicação, os autores não associaram os parâmetros virológicos do HIV para a definição de IRIS, o que fez com que, para a literatura mundial, o primeiro caso de reação reversa como manifestação de IRIS fosse registrado como sendo o descrito por Lawn *et al* em 2002. Eles descreverem o caso de uma paciente de Uganda que apresentou RT1 um mês após a introdução de TARV em vigência de declínio da carga viral do HIV e aumento de células T CD4 (Lawn 2003). Desde então, mais de 40 casos de estado reacional como manifestação de síndrome inflamatória de recuperação imune do HIV foram descritos na literatura (Menezes 2009). Uma revisão sobre os casos de reação tipo 1 associados à IRIS, assim como a descrição dos casos de RT1/IRIS do ASA encontra-se no anexo 1 da presente tese. Esta revisão foi escrita pelo autor desta tese e colaboradores e publicada como capítulo do livro em 2011 (Menezes 2011).

II- Objetivos:

II.1. Objetivo Principal:

1. Avaliação da influência da infecção pelo HIV na epidemiologia, apresentação clínica e mecanismos imunopatológicos envolvidos na reação tipo 1 em pacientes coinfectados pelo HIV.

II.2. Objetivos específicos:

1. Descrição das características clínicas, epidemiológicas e demográficas da coorte de pacientes coinfectados pelo *M. leprae*/HIV, do Ambulatório Souza Araújo/ IOC, no momento do diagnóstico de hanseníase.
2. Descrição da distribuição geográfica da coorte de pacientes coinfectados pelo *M. leprae*/HIV, do Ambulatório Souza Araújo/ IOC.
3. Avaliar fatores clínicos e epidemiológicos relacionados à apresentação de reação tipo 1, no momento do diagnóstico de hanseníase.
4. Avaliar a incidência de reação tipo 1 em pacientes com hanseníase paucibacilar coinfectados pelo HIV.
5. Avaliar fatores de risco para reação reversa em pacientes paucibacilares.
6. Avaliar as características clínicas da reação tipo 1 em pacientes com hanseníase paucibacilar coinfectados pelo HIV.
7. Avaliar o perfil de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em pacientes com reação reversa coinfectados pelo HIV.
8. Avaliar a expressão de proteína C reativa nos episódios de reação reversa em pacientes coinfectados pelo HIV.
9. Avaliar a resposta dos pacientes ao teste para detecção de anticorpos IgM anti-PGL1 em pacientes coinfectados pelo HIV.
10. Avaliar a resposta ao teste de Mitsuda em pacientes coinfectados pelo HIV
11. Correlacionar a contagem de linfócitos T CD4 e carga viral do HIV com a frequência de reação tipo 1.

III- Material e Métodos

III.1. Local do estudo

A cidade do Rio de Janeiro é a maior e mais importante cidade do estado do Rio de Janeiro com uma população de cerca de 6.320.446 pessoas, em 2010 (IBGE 2011). Apesar de ser a segunda cidade mais rica do Brasil, atrás apenas de São Paulo, o município do Rio de Janeiro é caracterizado por uma acentuada desigualdade sócio- econômica, com uma grande parte de sua população ainda vivendo em condições precárias (Cavallieri F 2008). A cidade comporta 160 bairros e, historicamente, é dividida em 4 regiões, conhecidas como: zona sul, zona, norte, zona oeste e centro.

De acordo com o último censo brasileiro realizado em 2010, o estado do Rio de Janeiro apresenta uma população de 15.989.929 pessoas, com a vasta maioria delas (96,7%) vivendo em regiões urbanas, principalmente na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro (IBGE 2011). O estado do Rio de Janeiro é dividido em 5 regiões, denominadas: metropolitana, sul, norte, noroeste e central.

O Ambulatório Souza Araújo (ASA) / Laboratório de Hanseníase (LAHAN) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/ Fiocruz é um centro de referência para o diagnóstico, tratamento e pesquisa sobre a hanseníase e seus contactantes no Brasil. Sob a supervisão do Ministério da Saúde do Brasil, o ASA/ LAHAN apresenta uma estrutura ambulatorial e laboratorial que desde 1989 vem prestando atendimento e paralelamente desenvolvendo pesquisas em pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae*. Como um centro de referência, a cobertura assistencial do ASA não se limita a uma área geográfica específica. Os pacientes podem ser referenciados ao ASA por qualquer serviço de saúde (público ou privado) do país, podem procurar atendimento por demanda espontânea ou podem ser diagnosticados no ambulatório de contactantes.

O Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) / Fiocruz tem a finalidade principal de realizar pesquisa clínica envolvendo diagnóstico, terapêutica e epidemiologia das doenças infecciosas e parasitárias. Desde 1986, O IPEC realiza atendimento a indivíduos infectados pelo HIV por intermédio de uma equipe multidisciplinar que faz parte de uma estrutura ambulatorial, hospital- dia e de hospitalização. Desde a década de 90 formou-se um grupo de pesquisa entre o IPEC e o ASA para o acompanhamento de uma coorte de pacientes coinfectados pelo HIV/ hanseníase.

III.2. Rotina de atendimento no ASA

Os pacientes incluídos nos estudos aqui relatados foram acompanhados no ASA / Fiocruz e foram submetidos aos seguintes procedimentos de rotina:

- **Exame clínico :** realizado por médico dermatologista durante a consulta de admissão ao serviço, assim como nas consultas subsequentes durante o tratamento específico e durante os episódios reacionais, sendo os registros da história clínica e do exame físico, padronizados.
- **Exame histopatológico:** as biópsias de pele são obtidos de lesões e submetidas ao exame histopatológico. Os tecidos são fixados em formol tamponado a 10% e processados para corte de parafina. Secções de 5 micra de espessura são coradas pela hematoxilina-eosina(H>E) e wade para visualização dos bacilos. As lâminas são avaliadas por patologista e na confirmação diagnóstica de hanseníase adota-se a classificação de Ridley e Jopling.
- **Índice baciloscópico (IB)** realizado no material de esfregaço dérmico, coletado por técnica padronizada pelo OMS em 4 sítios (lóbulos auriculares, cotovelos , e/ou lesão cutânea), corado pela técnica de Zielh Nielsen e classificados em graduação em cruces segundo a escala logarítmica de Ridley , que varia de 0 a 6+, correspondendo a carga bacilar do paciente. Esta quantifica os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) encontrados em cada campo examinado.
- **Teste de Mitsuda:** o teste da lepromina foi realizado através da aplicação de 0,1ml de lepromina no antebraço esquerdo ou direito, com leitura 28 dias após a aplicação, utilizando-se como antígeno a mitsudina A, derivada de tatu. Considerou-se reação de Mitsuda positiva, quando o endurecido foi ≥ 5 mm.
- **Exame neurológico:** realizado por médico neurologista no diagnóstico ou em qualquer momento do acompanhamento quando o indivíduo apresenta sinais ou sintomas neurológicos. O exame neurológico é completo e direcionado aos nervos periféricos .Os nervos também são examinados através da palpação , com especial atenção dada à consistência e presença de nódulos e a presença de dor à compressão. As superfícies palmares e plantares são examinadas para verificar presença de cianose ou eritrodermia. A sensibilidade tátil é testada usando monofilamentos de cinco diferentes aplicações de força (filamentos sSemmes- Weinstein). A avaliação da sensibilidade dolorosa é testada através de material pontiagudo, sendo então obtido um escore padronizado. A sensibilidade térmica é testada utilizando-se um metal resfriado, sendo fornecido o mesmo escore anteriormente citado. São avaliadas diferente áreas, somando um total de 13 regiões, e um total de 26 , quando somados os lados direito e esquerdo. Os nervos examinados são : ulnar (avaliação dos músculos abductor curto do mínimo e primeiro interósseo dorsal), mediano (avaliação dos

músculos abdutor curto polegar e oponente do polegar) e fibular (avaliação dos músculos tibial anterior e extensor curto dos dedos).

- **Grau de incapacidade (GI):** é determinado pela avaliação fisioterápica realizada profissional experiente. O exame é realizado no momento do diagnóstico, na alta terapêutica e nos episódios reacionais definidos pelo dermatologista. Na face são examinados os olhos e a força de oclusão palpebral. Nas extremidades é avaliada a sensibilidade tátil pela técnica dos filamentos Semmes-Weinstein, a presença de espessamento e/ou dor nos nervos periféricos, avaliação do trofismo e da força. De acordo com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil (AIDS 2007), considerou-se grau de incapacidade zero quando o paciente não apresentava nenhuma alteração nos olhos, mãos e pés e grau de incapacidade > 1 quando havia alterações de sensibilidade e/ou motora nas mesmas áreas corporais acima descritas.
- **PCR para detecção de DNA de *Mycobacterium leprae*:** para fins de diagnóstico, as amostras biológicas de indivíduos com suspeita clínica de hanseníase, porém, com baciloscopia negativa serão coletadas conforme recomendação oficial e armazenadas em freezer -70°C até seu processamento. Para a extração de DNA, biópsias de pele (metade de um punch de 6 mm³) e de nervo (2mm³) ou amostras de muco-nasal, sangue total ou esfregaço cutâneo de linfa são fragmentadas, digeridas, homogeneizadas e precipitadas. O precipitado de DNA é ressuspensão em H₂O e o ensaio de detecção de DNA de *M. leprae* utilizando PCR em tempo real é realizado para determinar a presença e o número de bactérias relativo.
- **Teste imunológicos:** No momento do diagnóstico dos estados reacionais é coletado sangue periférico para testes imunológicos, tais como: dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias no soro.

Todos os pacientes foram tratados para hanseníase com poliquimioterapia específica, segundo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil, de acordo com a classificação da doença.

Em relação ao HIV, todos os indivíduos foram acompanhados em ambulatórios especializados para o tratamento da infecção pelo HIV, sendo a vasta maioria dos pacientes acompanhada no IPEC. O diagnóstico de infecção pelo HIV foi estabelecido por dois exames sorológicos ELISA e teste confirmatório através de Western blot ou imunofluorescência Indireta em duas amostras distintas de sangue periférico. Os pacientes receberam tratamento com antirretrovirais segundo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil à época. Os antirretrovirais foram iniciados em pacientes com sintomas de imunodeficiência pelo HIV, em

pacientes assintomáticos com contagem de linfócitos T CD4 < 200 células/mm³ e em alguns casos de pacientes assintomáticos com contagem de linfócitos T CD4 entre 200 e 350 células/mm³.

III.3- Classificações e definições utilizadas:

Em relação às datas dos diagnósticos de hanseníase e do HIV, considerou-se que a hanseníase e a infecção pelo HIV foram diagnosticadas simultaneamente quando o período entre os diagnósticos foi ≤ 3 meses.

Designou-se lesão cutânea atípica as lesões de pele com presença de úlcera e/ou vesículas.

A classificação da forma clínica da hanseníase foi realizada no início do acompanhamento do paciente no ASA, através de critérios clínicos, laboratoriais e histopatológicos, segundo os critérios propostos por Ridley e Jopling.

Os quadros de reação tipo 1 foram caracterizados de acordo com critérios clínicos histopatológicos. Critérios clínicos de reação tipo 1:

- Reativação das lesões pré-existentes com sinais de inflamação aguda tais como eritema, edema e hipersensibilidade.
- Aparecimento de lesões novas com características semelhantes às anteriores.
- Edema de extremidade uni ou bilateral.
- Espessamento de nervos periféricos, acompanhado de dor espontânea ou decorrente de compressão (Neurite).
- Distúrbios sistêmicos como, por exemplo: mal estar geral e eventualmente febre.

Características histopatológicas dos quadros de reação tipo 1:

A reação tipo 1 se caracterizou histologicamente pelo aparecimento de granulomas formados por abundantes células epitelióides e algumas células gigantes multinucleadas, raramente do tipo Langhans. Esses granulomas foram acompanhados de edema dérmico moderado, quantidade variável de linfócitos e de hiperplasia da epiderme na maior parte dos casos. Os filetes nervosos quando encontrados nas biópsias exibiram granulomas intraneurais, edema e permeação por células inflamatórias mononucleares.

O diagnóstico de neurite caracterizou-se pelo aparecimento de dor espontânea ou decorrente de compressão em nervos periféricos, acompanhada de espessamento do nervo periférico. Para efeito de classificação, os casos que apresentaram apenas sintomas neurais, sem manifestações cutâneas de reação reversa, foram denominados neurite isolada.

Definiu-se como reação recorrente quando o paciente apresentou os critérios clínicos e histopatológicos acima referidos após pelo menos três meses, a contar da interrupção do tratamento com corticosteroide devido à melhora do episódio reacional prévio.

A fim de se obter as conclusões dos objetivos da tese, dois estudos foram conduzidos. O artigo referente ao Estudo 1 foi submetido para publicação na revista- Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene- e encontra-se no anexo 2 da presente tese. O artigo referente ao estudo 2 está em fase de finalização para submissão para publicação e encontra-se no anexo 3 da presente tese.

III.4. Estudo 1: Aspectos clínicos e epidemiológicos de 92 pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae*.

1- Desenho do estudo:

Estudo de série de casos onde foi realizada uma análise dos fatores sócio-demográficos, clínicos e geográficos de todos os pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae* admitidos no ASA entre 1989 e 2011. As informações dos pacientes foram sistematicamente coletadas no momento do diagnóstico de hanseníase da Fiocruz e foram mantidos em um banco de dados específico, ao longo do tempo. Dados de todos os pacientes coinfectados incluídos no presente estudo foram, então, obtidos deste banco de dados.

2- Distribuição geográfica dos pacientes

Dados sobre os endereços dos locais de moradia dos pacientes foram georreferenciados para a construção de mapas temáticos, mostrando a distribuição geográfica dos casos de coinfeção de HIV e hanseníase, incluídos no estudo, nas cidades do estado do Rio de Janeiro e nos bairros da cidade do Rio de Janeiro. Considerando-se as diferenças do tamanho da população e do número de casos de cada doença, taxas de incidência média de AIDS e hanseníase foram calculadas através do Sistema Nacional de Notificação (SINAN-hanseníase e SINAN-AIDS respectivamente) (DATASUS 2011).

Uma vez que os casos notificados no SINAN somente estão disponíveis para acesso a partir de 2001, os mapas foram construídos respectivamente de acordo com as taxas de incidência de AIDS e hanseníase para cada município do estado do Rio de Janeiro, em dois períodos: 2001-2005 e 2006-2010.

Para a visualização da distribuição geográfica dos pacientes, mapas de densidade de ponto foram construídos considerando o local de moradia de cada paciente, utilizando-se o programa ArcMap. Cada ponto representa um caso distribuído aleatoriamente dentro da cidade correspondente ao local de moradia do paciente no estado do Rio de Janeiro e em cada bairro na cidade do Rio de Janeiro.

3- Análise estatística

Análise bivariada foi realizada a fim de se verificar diferenças clínicas e epidemiológicas entre os pacientes em reação reversa e aqueles sem reação reversa. Realizou-

se, também, uma análise multivariada para a avaliação de fatores relacionados ao desenvolvimento de reação reversa, através do modelo de regressão logística. Consideraram-se, para esta análise fatores clínicos, epidemiológicos e imunológicos relevantes ao desenvolvimento de reação. Foi adotado um nível de significância estatística de 5%.

III.5. Estudo 2: Efeitos paradoxais da infecção pelo HIV na hanseníase

1- Desenho do estudo:

Estudo de coorte retrospectivo, onde foram incluídos todos os pacientes paucibacilares acima de 14 anos de idade, com pelo menos 1 lesão de pele (excluindo a forma clínica Neural Pura), admitidos no ASA/Fiocruz entre 1 de janeiro de 1997 e 31 de dezembro de 2008. Os pacientes foram classificados como paucibacilares de acordo com a classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (OMS), quando o esfregaço cutâneo de linfa foi negativo (IB= 0). Não foram incluídos pacientes classificados com as formas tuberculóide tuberculóide (TT) e indeterminadas pelo baixo risco de desenvolverem reação tipo 1. Foram excluídos pacientes que não completaram um ano de acompanhamento após tratamento específico da hanseníase com PQT.

Um total de 344 pacientes preencheram os critérios de inclusão e foram selecionados para o estudo. Todos os pacientes foram acompanhados mensalmente durante o tratamento para hanseníase com PQT e anualmente após o término da PQT. Os pacientes foram aconselhados a procurar atendimento médico, no ASA, imediatamente, em qualquer momento em que apresentassem sinais de inflamação de lesões cutâneas e/ou nervo. Os dados dos pacientes foram obtidos pela revisão dos prontuários no ASA e no local de acompanhamento da infecção pelo HIV.

Dos 344 incluídos no estudo: 43 (12,5%) foram sorologicamente confirmados HIV positivos e constituíram o grupo, então, denominado: grupo HIV +. Os dados destes pacientes foram comparados com os dados dos demais 301 (87,8%) pacientes que constituíram o grupo controle (grupo HIV-). Destes 301 pacientes, 36 (11,9%) foram confirmados, através de exame sorológico, serem negativos para infecção pelo HIV. Os demais 265 pacientes apresentavam sorologia para infecção pelo HIV desconhecida. Entretanto foram incluídos no grupo controle devido à remota probabilidade de serem HIV positivos.

2- Avaliação da incidência de reação tipo 1.

Comparou-se as frequências de reação reversa, assim como as taxas de incidência de reação tipo 1 e reação reversa recorrente por 100- pessoas/ano, entre os grupos estudados.

3- Avaliação dos fatores de risco para reação tipo 1.

Para a avaliação dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de reação tipo 1, incluiu-se somente os pacientes que não estavam em reação reversa no momento do diagnóstico de hanseníase. Portanto, para esta parte do estudo, foram incluídos 24 pacientes do grupo HIV positivo e 256 do grupo HIV negativo. As variáveis explanatórias para avaliação dos fatores de risco referem-se aos dados obtidos no momento da entrada do paciente no ASA, ou seja, no momento do diagnóstico da hanseníase e que relacionam-se ao desenvolvimento de reação reversa, como demonstrado em outros estudos publicados na literatura (Sousa AL 2007; Motta et al. 2012; Kahawita IP 2008; Ranque B 2007). As variáveis escolhidas foram: sexo masculino, média de idade, teste de Mitsuda positivo e presença de BAAR em amostras de lesões cutâneas.

4- Avaliação das características clínicas dos episódios de reação tipo 1:

As variáveis consideradas para a análise das características clínicas dos pacientes em reação reversa foram: número de leões, número de segmentos corporais afetados, presença de lesões cutâneas ulceradas, presença de neurite, necessidade de internação hospitalar e tempo de uso de corticóide.

5- Avaliação dos níveis de citocinas e de proteína C reativa nos soros dos pacientes em reação tipo 1

Dos 344 pacientes incluídos no estudo, foi possível selecionar 25 amostras de soros de pacientes em reação tipo 1: 15 do grupo HIV positivo e 10 do grupo HIV negativo. Amostras de sangue total foram coletadas no momento do diagnóstico de reação reversa e antes do início do tratamento anti-inflamatório com prednisona. As amostras foram centrifugadas imediatamente após a coleta e alíquotas contendo os soros dos pacientes foram armazenadas adequadamente em freezers antes da realização dos ensaios.

Os níveis de citocina nos soros foram mensurados através da plataforma Luminex. Mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-8); citocinas do tipo 1 (IL-2, IFN γ , TNF α , IL12p40, IL12p70, IL17) e citocinas do tipo 2 (IL-10, IL4, IL13) foram avaliados. O método MilliPlex foi realizado segundo as recomendações do fabricante do kit (Millipore's MilliPlex Human Cytokine Th1-Th2[®], Billerica, Estados Unidos da América).

Para 4 pacientes coinfectados foi possível selecionar amostras de soro no momento do diagnóstico de hanseníase e depois no momento do diagnóstico de reação tipo 1. As amostras foram coletadas, armazenadas e analisadas da mesma forma como descrito acima.

Os níveis de proteína C reativa foram também avaliadas no soro de 15 pacientes do grupo HIV positivo e 10 do grupo HIV negativo por ELISA.

6- Detecção de anticorpos IgM anti PGL-1

O ELISA para a detecção de anticorpos IgM contra o PGL-I do *Mycobacterium leprae* foi realizado em soros de pacientes coinfectados no momento do diagnóstico de hanseníase. Dissacarídeo natural ligado à albumina sérica bovina (DBSA) foi utilizado como o análogo semissintético do PGL-I. Esse antígeno foi diluído em solução carbonada tamponada (pH 9,6) em uma concentração de açúcar de 0,023µg/ml. Como controle, 0,1µg/ml de BSA foram utilizados. Placas foram cobertas com 50µl/poço de antígeno ou controle. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C em câmara úmida. As placas foram bloqueadas por 60 minutos com 100µl de BSA 1% (w/v) em tampão fosfato salina (PBS). Em seguida, 50µl do sangue diluído foram adicionados a cada poço. Após incubação a 37° durante 60 minutos as placas foram lavadas quatro vezes em PBS Tween. O anticorpo IgM conjugado à peroxidase foi adicionado (50µl/poço) em diluição de 1:2000 em PBS Tween. Após incubação a 37°C por 60 minutos, o procedimento de lavagem foi repetido e 50µl de substrato líquido (Sigma Aldrich®, Saint Louis, Estados Unidos da América) 3,3',5,5'- tetrametila-benzidina (TMB) foi colocado em cada poço. Para controlar a variação diária e entre placas, um soro positivo de referência foi incluído em quadruplicata em cada placa. As reações da placa inteira foram paradas com 50µl 2.5N H₂SO₄ quando em 450nm a leitura da densidade óptica (DO) do controle de referência chegou a 0,6. Todos os soros foram testados em duplicata e os resultados do ELISA expressos como a absorbância média entre as duplicatas. O valor final de DO de cada amostra de soro foi calculado pela subtração do valor DO das paredes revestidas com BSA do valor DO das paredes revestidas com ND-O-BSA. O valor de corte usado para positividade foi de DO=0,250; qualquer critério para positividade é arbitrário visto que a concentração de anticorpos tem distribuição unimodal.

7- Análise estatística:

Os fatores de risco para reação tipo 1 foram analisados através da regressão logística de Poisson. As diferenças clínicas dos episódios reacionais foram comparadas utilizando-se os testes de X^2 ou Fisher's exact para variáveis categóricas e T de Student para variáveis contínuas. As diferenças entre as médias dos níveis de citocinas foram comparadas entre os dois grupos pelo teste não paramétrico de Mann-whitney.

Foi adotado um nível de significância estatística de 5%, em todas as análises.

Todas as análises, com exceção da comparação dos níveis de citocinas dos pacientes em reação reversa, foram realizadas utilizando-se o programa Stata (versão 9.0). Para a avaliação das diferenças das médias de citocinas utilizou-se o programa GraphPad Prism 4.

III.6. Considerações éticas

Ambos os estudos foram aprovados pelo CEP do IPEC (número 0038.0.009.000-07).

IV- Resultados

IV.1- Estudo 1: Aspectos clínicos e epidemiológicos de 92 pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae*.

1- Características dos pacientes no momento do diagnóstico de hanseníase

De Janeiro de 1989 até dezembro de 2011, 92 pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae* foram referenciados ao ASA/ Fiocruz. Um pouco mais da metade (56,5%) dos pacientes era do sexo masculino. A média de idade foi de 32,3 anos (18-72 anos) e uma maior proporção dos pacientes (70,7%) apresentavam idade entre 30 e 59 anos. Em relação à cor da pele: 47,8% dos indivíduos eram brancos e 52,2% eram pardos ou negros. A maioria dos pacientes (81,5%) era solteira ou separada. A maior parte dos indivíduos (76,8%) tinha de 1 a 8 anos de escolaridade, enquanto 20,9% apresentavam mais do que oito anos de escolaridade e 2,3% nunca haviam frequentado a escola.

Em relação ao teste da lepromina, 44,4% dos pacientes apresentaram o teste de Mitsuda negativo. Uma maior proporção de pacientes (69%) apresentou grau de incapacidade inicial igual à zero, enquanto para 21% foi igual a um e para 10%, dois. A maioria dos casos incluídos (59,8%) apresentavam cicatriz de BCG na admissão no ASA.

Dos 92 pacientes incluídos no estudo, 33 (35,5%) pacientes estavam em reação no momento do diagnóstico de hanseníase. Destes, 32 (97%) apresentaram reação tipo 1 e apenas um paciente apresentou reação tipo 2. Dos 32 pacientes apresentando reação reversa, 9 (28,1%) pacientes preencheram os critérios de síndrome inflamatória de recuperação imunológica.

A Tabela 1 mostra as características dos pacientes, assim como a comparação entre aqueles em reação reversa e os pacientes sem reação. O paciente em reação tipo 2 não foi incluído na análise bivariada e na Tabela 1.

Tabela 1: Características demográficas e imunológicas dos pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae* no momento do diagnóstico de hanseníase:

Características	RT1(n=32)	Sem RT1(n=59)	P- Valor
Sexo masculino	22(68, 7%)	29(49, 1%)	0,07
Média de idade (min.-max)	38,9 (22-72)	38,1(18-67)	0,77
IB>0	9 (28, 1%)	11 (18, 6%)	0,29
Em uso de TARV	28 (87, 5%)	37 (62, 1%)	0,01
Mitsuda negativo	14 (45, 1%)	26 (44, 0%)	0,92
Média de contagem de linfócitos T CD4	288 (24-635)	425 (37-1409)	0,02

IB: Índice baciloscópico de esfregaço cutâneo; RT1= reação tipo 1; TARV: Terapia antirretroviral; n= número de pacientes avaliados.

Os critérios de Ridley & Jopling foram utilizados para classificar os pacientes que não estavam em reação no momento do diagnóstico de hanseníase, como a seguir: 2 (3,4%) foram classificados como TT; 33 (55,9%), como BT; 4 (6,8%), como BB; 5 (8,5%), como BL; 2 (3,4%), como LL; 11 (18,6%), como indeterminado, e 2 (3,4%) com a forma clínica neural pura.

Setenta e sete por cento dos pacientes incluídos estavam em uso de TARV no momento da admissão no ASA. Foi possível obter a contagem de linfócitos T CD4 de 62 (67,4%) pacientes no momento do diagnóstico de hanseníase e a contagem média foi de 371,3 células/mm³. A carga viral do HIV somente estava disponível para 32 (34,8%) pacientes no momento do diagnóstico da hanseníase. Destes, 13 (40,6%) apresentavam carga viral indetectável e 19 (59,4%) apresentavam-na detectável. A tabela 2 mostra a relação entre as formas clínicas classificadas pelos critérios de Ridley & Jopling e a contagem de linfócitos T CD4, carga viral e teste de Mitsuda.

Tabela 2: Descrição da relação entre as formas clínicas da hanseníase no momento do diagnóstico com a contagem de células T CD4, carga viral do HIV e o teste de Mitsuda.

Forma clínica	Linfócitos (média)	TCD4 (detectável)	Carga viral do HIV (negativo)	Teste do Mitsuda (negativo)
I	657,2 (n=3)	2 (66,6%) (n=3)	6 (60%) (n=10)	
NP	37 (n=1)	ND	0 (n= 2)	
TT	302 (n=1)	ND	1 (50%) (n=2)	
BT	371,3 (n=22)	7(70%) (n=10)	9 (27,3%) (n=33)	
BB	365 (n=1)	ND	3 (75%)(n=4)	
BL	215 (n=2)	ND	5 (100%) (n=5)	
LL	722 (n=1)	1 (100%) (n=1)	2 (100%) (n=2)	

I= indeterminada; NP= Neural pura; BT= Tuberculóide *borderline*; BB= Borderline *borderline*; BL= Lepromatoso *borderline*; LL= lepromatoso lepromatoso; ND:não disponível; n= número de pacientes avaliados.

2- Fatores associados à reação tipo 1

Como mostrado na Tabela 1, na análise bivariada, uma contagem baixa de células TCD4 e o uso de TARV foram associadas ao desenvolvimento de reação tipo 1. Esses achados foram confirmados pela análise multivariada como demonstrado na Tabela 3. O uso de TARV permaneceu como único fator independente relacionado à reação reversa (odds ratio= 4,79; $p= 0,01$). A grande quantidade de pacientes sem a definição da contagem de linfócitos TCD4, no momento do diagnóstico de hanseníase, impossibilitou sua avaliação através da análise multivariada.

Tabela 3: Análise multivariada da influência do gênero, idade, índice baciloscópico, uso de TARV e teste de Mitsuda para o desenvolvimento de reação tipo1.

Características	OR	95% IC	P- valor
Sexo masculino	1,85	0,71-4,83	0,20
Idade (contínua)	0,99	0,95-1,03	0,73
IB>0	1,66	0,49-5,57	0,41
Em uso de TARV	4,79	1,31-17,53	0,01
Mitsuda negativo	1,25	0,43-3,57	0,68

IB: índice baciloscópico, TARV: terapia antirretroviral, 95% IC: 95% intervalo de confiança, OR: Odds ratio

3- A distribuição geográfica dos pacientes

Entre 1989 e 2011, um total de 2394 pacientes foi diagnosticado com hanseníase na Fiocruz. Sendo assim, os 92 pacientes coinfetados pelo HIV/ *M. leprae* representam uma porcentagem de 3,8% do total de pacientes referenciados. Entretanto, observou-se que o número absoluto de pacientes coinfetados pelo HIV/ *M. leprae* admitidos no ASA aumentou nos últimos anos como mostra a Figura 1, enquanto o número de pacientes atendidos no ASA com diagnóstico de hanseníase e sorologia para HIV desconhecida diminuiu ao longo dos anos. Portanto, houve um aumento da proporção de pacientes coinfetados sobre o total de pacientes admitidos como demonstrado na Figura 2.

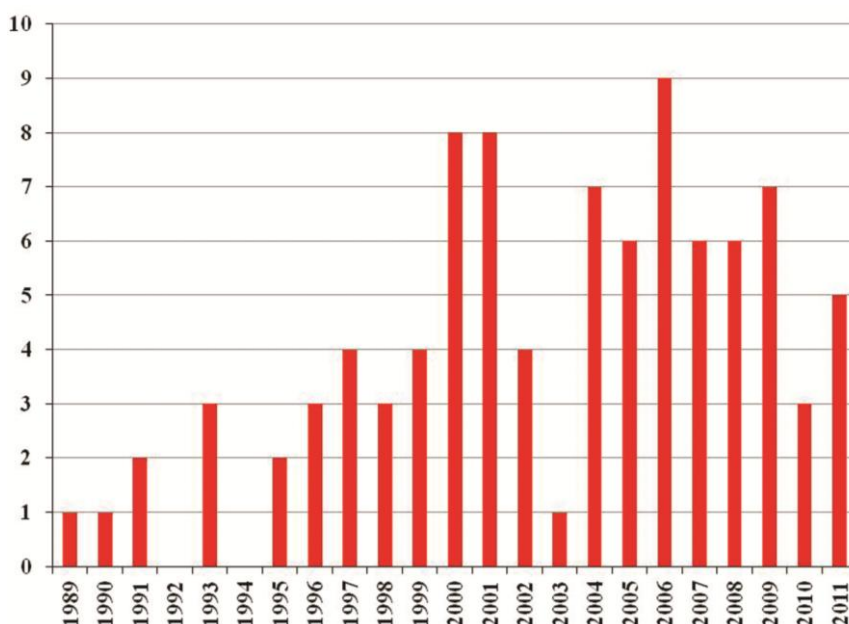


Figura 1: Número de pacientes coinfetados pelo HIV/ *M. leprae* por ano de admissão no Ambulatório Souza Araújo/ Fiocruz.

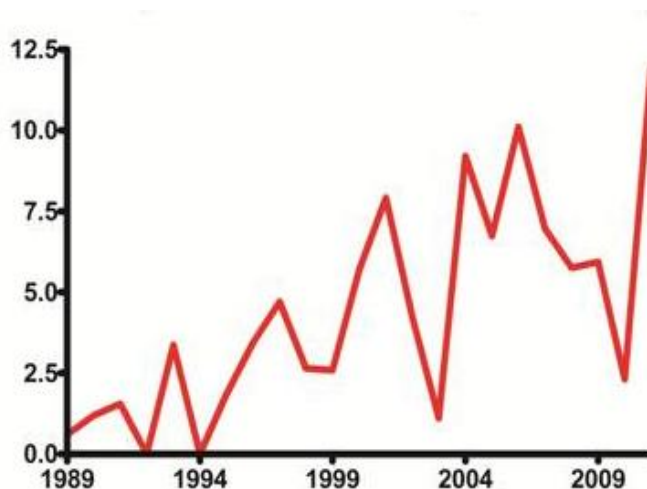


Figura 2: Proporção de pacientes coinfetados pelo HIV/ *M. leprae* em relação ao total de pacientes com hanseníase admitidos, por ano, no Ambulatório Souza Araújo/ Fiocruz.

Houve uma maior proporção de pacientes (88,2%) referidos ao ASA originalmente de serviços públicos de saúde, enquanto 4,3% foram provenientes de serviços privados, 3,2% compareceram ao ASA pela primeira vez por demanda espontânea, 1,1% foram diagnosticados pela triagem de contactantes de hanseníase e 3,2% através de outras formas de encaminhamento ao ASA.

A maioria dos pacientes (77,4%) nasceu no estado do Rio de Janeiro, 16,1% migraram para o estado do Rio de Janeiro da região nordeste e 6,5% foram provenientes de outras regiões brasileiras.

A redução das taxas de incidência de hanseníase e AIDS, por município e nos períodos analisados, pode ser visualizada na Figura 3. As taxas de hanseníase e AIDS foram maiores em algumas regiões do estado do Rio de Janeiro, principalmente, nas regiões metropolitana, norte e alguns municípios do sul do estado (Figura 3). O mapa da taxa de incidência de AIDS entre 2006 e 2011 mostra uma endemia mais homogênea com redução de casos na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, sem relevantes variações em outros municípios do estado Figura 3.

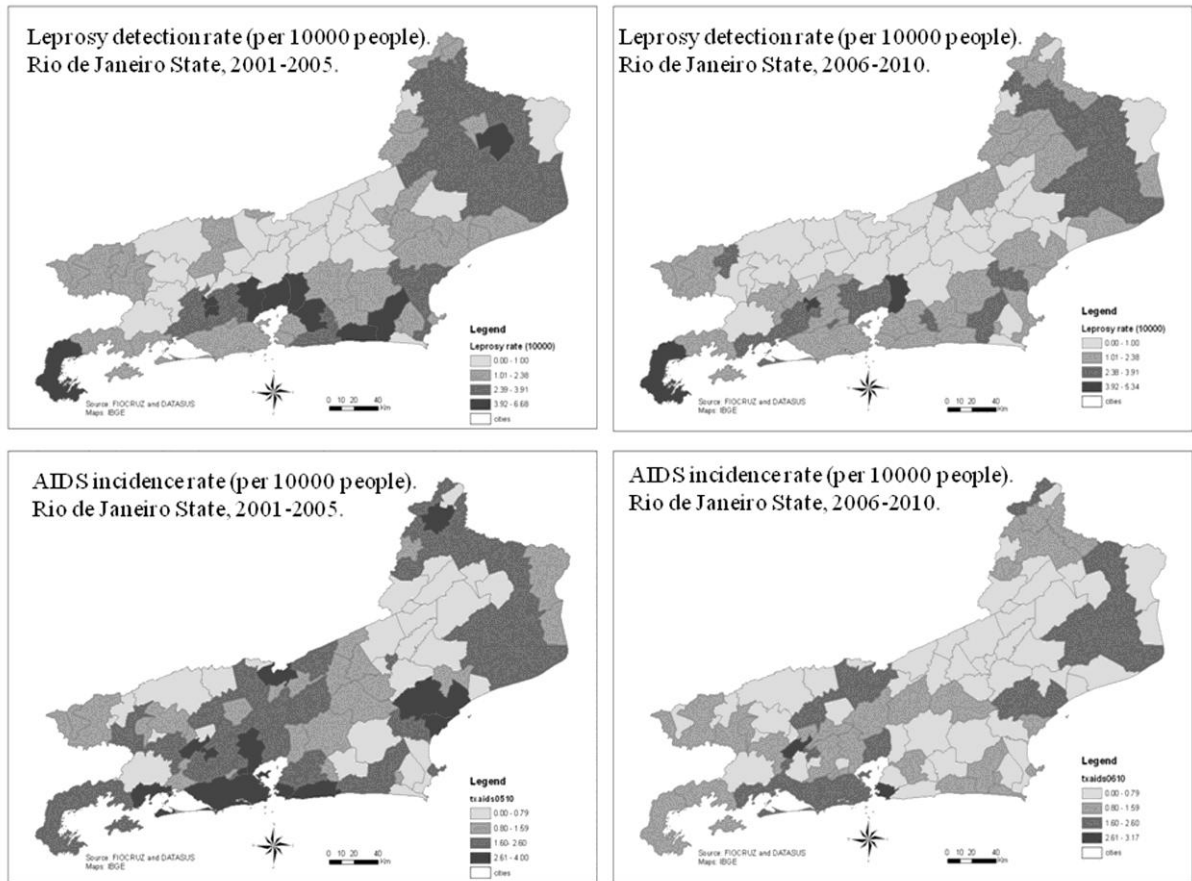


Figura 3: Taxa de detecção de novos casos de hanseníase e taxa de incidência de AIDS, por município do estado do Rio de Janeiro: 2001-2005 e 2006-2010.

A vasta maioria dos pacientes incluídos no estudo vivia na cidade do Rio de Janeiro e sua região metropolitana Figura 4. Especificamente, 49,5% dos casos viviam na cidade do Rio de Janeiro, 45,1% moravam em outras cidades da região metropolitana e apenas 5,4% foram referenciados à Fiocruz de outras cidades do estado do Rio de Janeiro, fora da região metropolitana Figura 4.

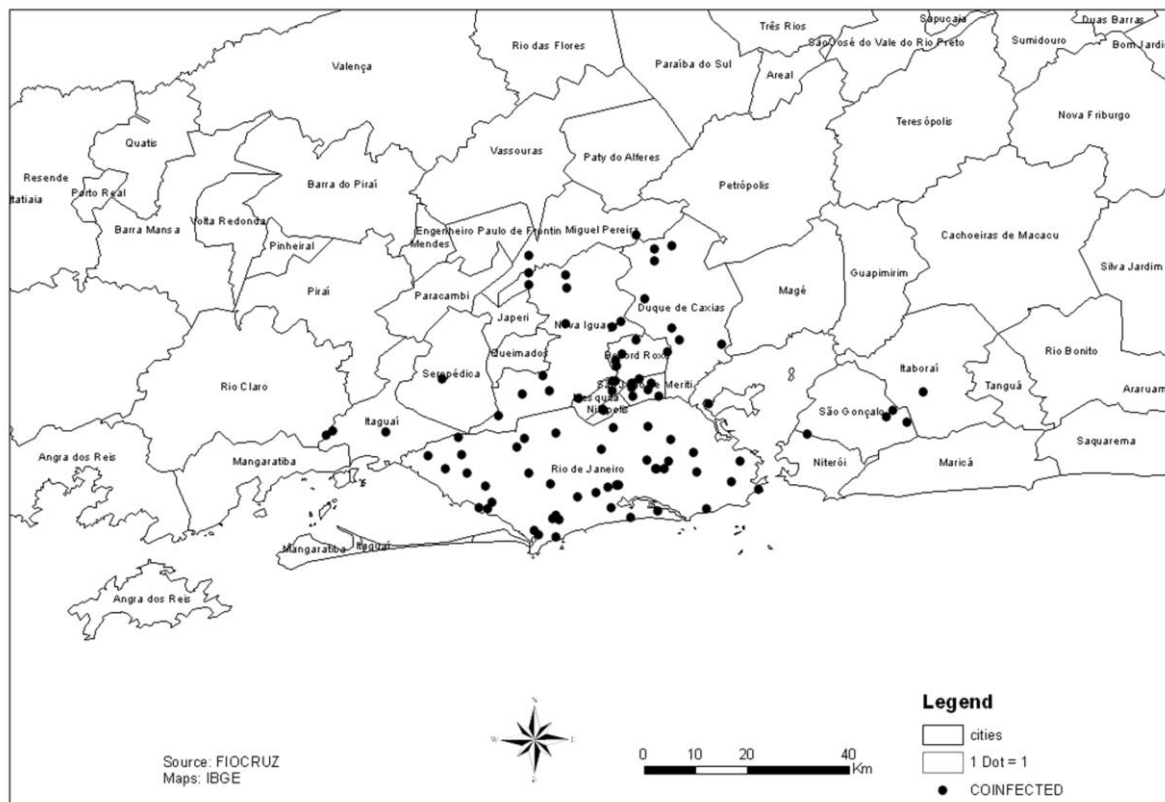


Figura 4: Distribuição dos pacientes coinfetados pelo HIV/ *M. leprae*, atendidos no ASA, por município de moradia no estado do Rio de Janeiro, entre 1989-2011. Legenda: 1 ponto= 01 paciente.

Entre os pacientes vivendo na cidade do Rio de Janeiro, 20 (43,5%) eram da zona norte ; 11 (23,9%), da zona oeste; 5, do centro e 2, da região sul da cidade do Rio de Janeiro (Figura5).

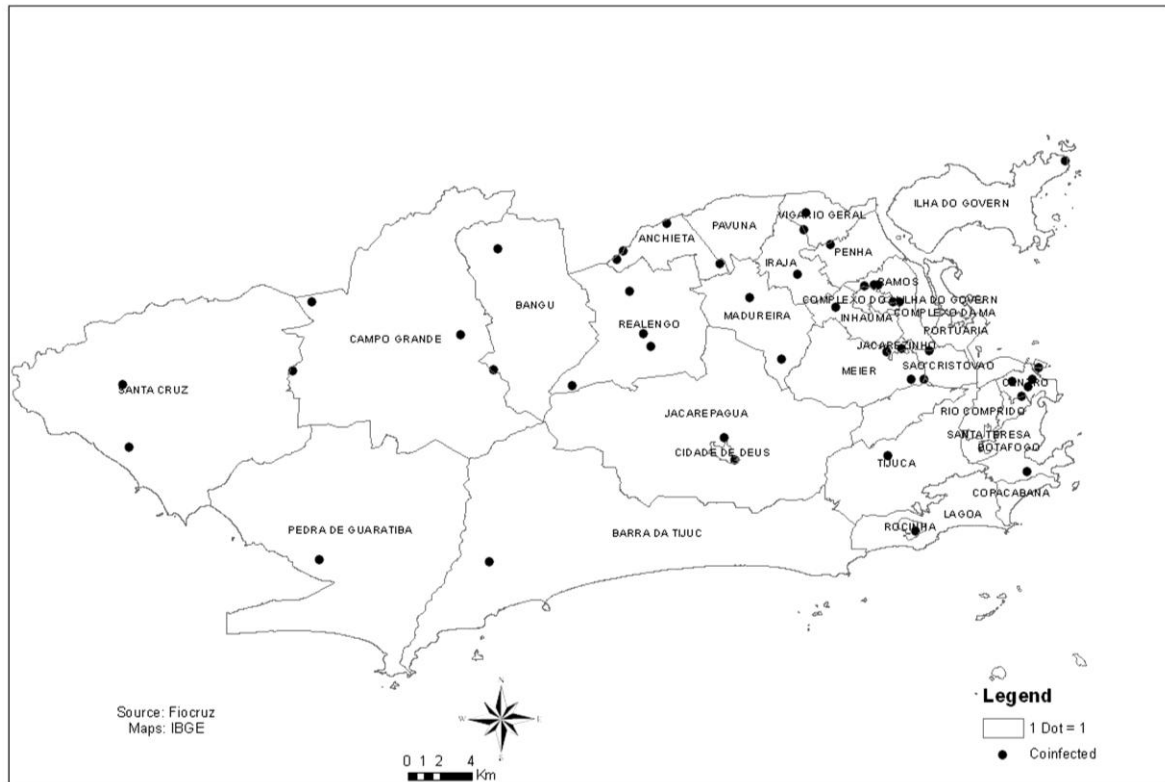


Figura 5: Distribuição dos pacientes coinfetados pelo HIV/ *M. leprae*, atendidos no ASA, por bairro de moradia na cidade do Rio de Janeiro, entre 1989-2011. Legenda: 1 ponto= 01 paciente.

IV.2. Estudo 2: Efeitos paradoxais da infecção pelo HIV na hanseníase

1- As características dos grupos no momento do diagnóstico de hanseníase *borderline* tuberculóide no Ambulatório Souza Araújo

As características dos 344 pacientes, incluídos no estudo, no momento da admissão no ASA estão detalhadas na Tabela 4. Houve um significativo predomínio de homens no grupo HIV positivo em relação ao controle ($p=0,04$) e a média de idade dos pacientes infectados pelo HIV (40,2 anos) foi significativamente menor do que dos pacientes do grupo HIV negativo (44,1 anos) ($p=0,04$). Uma maior proporção de pacientes (44,1%) do grupo HIV positivo estava apresentando reação tipo 1 no momento do diagnóstico de hanseníase quando comparados ao grupo controle (14,9%) ($p < 0,01$). A maioria dos pacientes, em ambos os grupos (80,5% no grupo HIV positivo e 85,5% no grupo HIV negativo, $p=0,53$), apresentou índice de incapacidade inicial igual à zero.

A porcentagem de pacientes com o teste de Mitsuda positivo foi maior no grupo HIV positivo (73,1%) do que no grupo HIV negativo (58,4%), com uma tendência à significância estatística ($p=0,07$) (Tabela 4). Pela análise histopatológica, verificou-se que em uma maior proporção de pacientes coinfectados (25,5%) havia a presença de BAAR nas amostras de biópsia de pele do que no grupo controle (9,6%) ($p < 0,01$) (Tabela 4).

Tabela 4: Características clínicas, demográficas e imunopatológicas dos pacientes no momento do diagnóstico de hanseníase.

Características	HIV+ (n=43)	HIV- (n=301)	P-valor
Razão homem/ mulher	1,26/1	0,63/1	0,04
Media de idade	40,2	44,1	0,04
Proporção de pacientes com teste de Mitsuda positivo	30 (73.1%)	167 (58.4%)	0,07
Proporção de pacientes com presença de BAAR em amostras de lesão de pele	11(25,5%)	29 (9,6%)	<0,01
Proporção de pacientes em RT1	19 (44,1%)	45 (14,9%)	<0,01
Proporção de pacientes com GII=0	33 (80,5%)	175 (85,5%)	0,53

BAAR: bacilos álcool ácido resistentes; GII= grau de incapacidade inicial; RT1= reação tipo 1; HIV+= grupo HIV positivo; HIV-= grupo HIV negativo.

Dos 43 pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae* incluídos no estudo, 32 (74,5%) tiveram o diagnóstico de infecção pelo HIV estabelecido antes do diagnóstico de hanseníase;

para nove (20,9%) pacientes, os diagnósticos foram feitos simultaneamente e 2 (4,6%) foram diagnosticados inicialmente com hanseníase.

Quarenta e um pacientes (95,3%) estavam em uso de TARV, no momento do diagnóstico de hanseníase. De uma forma geral a média da contagem de linfócitos T CD4, no momento do diagnóstico de hanseníase, foi de 325,6 (34-1019) células/ mm³. Entretanto, entre os indivíduos apresentando reação reversa no diagnóstico de hanseníase, a média da contagem de células T CD4 foi 278 (34-635) células/ mm³ e; entre aqueles sem reação tipo 1, foi de 373,3 (129-1019) células/mm³(p= 0,16). Dos 38 pacientes com informação sobre a carga viral do HIV no momento do diagnóstico de hanseníase, 20 (52,6%) pacientes apresentavam- a indetectável. Exatamente 50% dos pacientes em reação reversa no diagnóstico de hanseníase e 50% dos pacientes sem RT1 na admissão no ASA apresentavam a carga viral do HIV negativa (p= 1,00).

Dezesseis (37,2%) pacientes coinfetados apresentaram alguma doença oportunista antes do diagnóstico de hanseníase, 20 (46,5%) nunca haviam apresentado doenças oportunistas e, em 7(16,3%), não foi possível avaliar pela ausência de dados nos prontuários. Dos 33 pacientes coinfetados com informação sobre tuberculose descrita nos prontuários, 10 (31,2%) pacientes haviam apresentado tuberculose antes do diagnóstico de hanseníase e 23 (68,8%) não haviam tido diagnóstico de tuberculose.

Quando relacionamos, a presença de tuberculose prévia com os resultados dos testes de Mitsuda, verificamos que dos 10 pacientes com diagnóstico de tuberculose prévia, 8 (80%) tiveram o teste da lepromina positiva. Enquanto, dos 23 pacientes sem diagnóstico de tuberculose prévia, 13 (56,5%) apresentaram o teste de Mitsuda positivo. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,22).

2- A incidência de reação tipo 1

Durante o período do estudo, 27 (62,8%) pacientes coinfetados e 84 (27,8%) pacientes HIV negativos desenvolveram reação tipo 1 (p<0.01). Como demonstra a figura 6 a densidade de incidência foi maior no grupo HIV positivo (30,2/100 pessoas-ano) do que no grupo HIV negativo (6,5/ 100 pessoas- ano; p<0,01) (Figura 6).

Houve uma maior incidência de reação tipo 1 recorrente no grupo HIV positivo (1/ 100 pessoas-ano) do que no grupo controle (0,3/ 100 pessoas-ano), porém sem significância estatística (p= 0,2)(Figura 6).

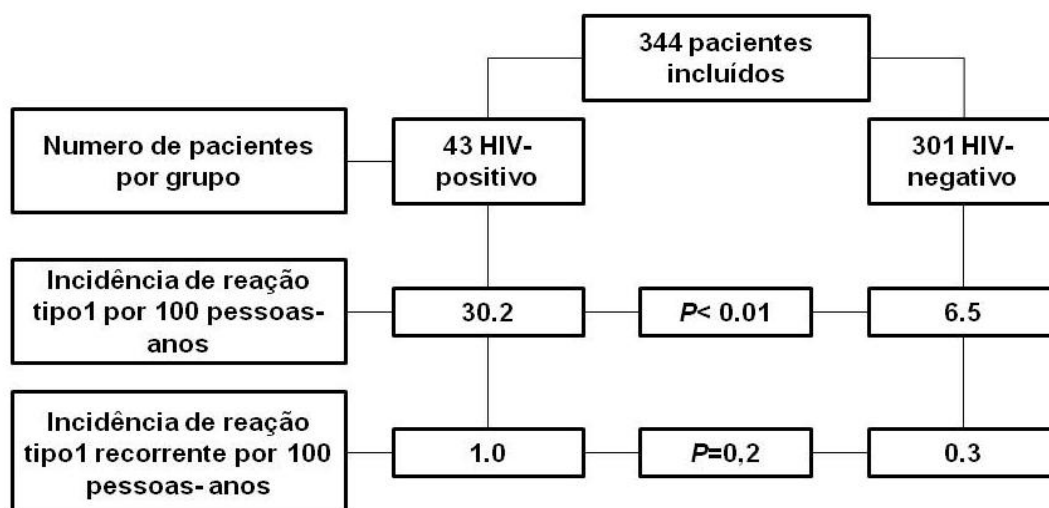


Figura 6: Densidade de incidência de reação tipo 1 e de reação tipo 1 recorrente.

A maioria dos pacientes, em ambos os grupos (44,1% no grupo HIV positivo e 14,9% no grupo HIV negativo), desenvolveu reação tipo 1 antes do início de poliquimioterapia específica para hanseníase (Tabela 4); 4 (14,8%) pacientes coinfectados e 16 (19%) do grupo controle, durante a PQT; e 14,8% do grupo HIV positivo e 28,5% do grupo HIV negativos desenvolveram-na após o término da PQT.

3- Fatores de risco para reação tipo 1

Como demonstrado na Tabela 5, a infecção pelo HIV, o teste de Mitsuda negativo e a presença de BAAR nas amostras de lesão de pele foram fatores de risco para reação tipo 1, estatisticamente significantes. Não houve relação entre sexo masculino e media de idade e reação reversa Tabela 5.

A análise multivariada identificou três fatores de risco para reação tipo 1. O principal fator de risco independente foi a presença de BAAR nas lesões cutâneas (RR= 8,26). A infecção pelo HIV (RR=3,13) e o teste de Mitsuda negativo (RR= 3,70) também permaneceram como fatores de riscos independentes pela análise multivariada (Tabela 5).

Tabela 5: Análises bivariada e multivariada de fatores de risco para reação reversa:

Fatores de risco	Bivariada			Multivariada		
	RR	P	IC 95%	RR	P	IC 95%
-						
Infecção pelo HIV	2,85	<0.01	1.33-6.08	3.13	0.01	1.30-7.51
Presença de BAAR em biópsia de lesões cutâneas	11,23	<0.01	6.10-20.68	8.26	<0.01	4.37- 15.64
Reação de Mitsuda negativa	3,44	<0.01	1,93-6,25	3,70	<0.01	1,92-7,14
Média de idade	0,92	0.69	0.63- 1.34	-	-	-
Sexo masculino	0,91	0.76	0.50- 1.63	-	-	-

BAAR= Bacilo álcool-ácido resistente; RR= Risco relativo; IC95%= Intervalo de confiança 95%.

4- A relação entre a contagem de linfócitos TCD4 e a carga viral do HIV com o desenvolvimento de reação tipo 1.

Dos 27 pacientes coinfectados que apresentaram reação tipo 1 durante o período de estudo, 25 apresentavam informações sobre a contagem de linfócitos TCD4 e de carga viral do HIV no momento do diagnóstico de RT1. A média da contagem de linfócitos T CD4, no momento do diagnóstico de reação reversa, foi de 313 células/ mm³ e 14 (56%) pacientes apresentaram reação com carga viral do HIV indetectável. Em 15 pacientes coinfectados, foi possível acessar a contagem de células T CD4 e de carga viral do HIV antes e durante o episódio reacional. Destes, 14 (93,3%) apresentaram RT1 em vigência de aumento de contagem de células T CD4 e 10 (66,6%) evoluíram com reação em vigência de queda da carga viral do HIV >1log₁₀. Dois pacientes (7,4%) apresentaram RT1 durante tratamento para infecção oportunista, precisamente neurotoxoplasmose. Nove (33.3%) pacientes coinfectados desenvolveram reação reversa como consequência de IRIS e seus dados estão descritos, juntamente com mais 3 pacientes multibacilares que desenvolveram RT1 como consequência de IRIS, no anexo 1 da presente tese.

5- Níveis de citocinas e PCR no momento do diagnóstico de reação tipo 1

A figura 7 mostra as diferenças das médias dos níveis de citocina, entre os grupos, no momento do diagnóstico de reação reversa. Houve um predomínio significativo das citocinas inflamatórias (IL1β- e IL12p70) no grupo HIV negativo. Em relação às outras citocinas pró-inflamatórias, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Entre as

citocinas anti-inflamatórias, por outro lado, verificou-se que as citocinas IL4 e IL13 estavam significativamente mais altas no grupo de pacientes coinfetados. Apesar de a citocina IL10 estar relativamente mais alta no grupo HIV positivo, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação aos níveis de proteína C reativa durante os episódios reacionais, houve um nível mais elevado nos pacientes coinfetados em relação aos controles, porém sem significância estatística (Figura 8).

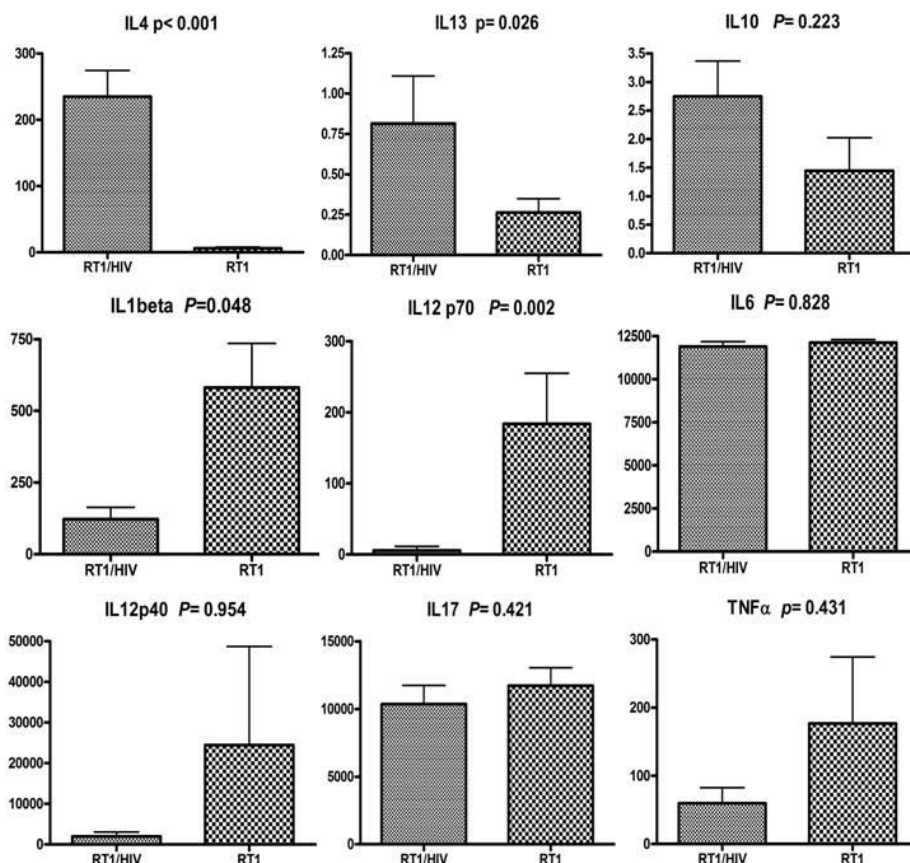


Figura 7: Nível de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em pacientes em reação tipo 1. N= RT1/HIV:15 pacientes e RT1: 10 pacientes.

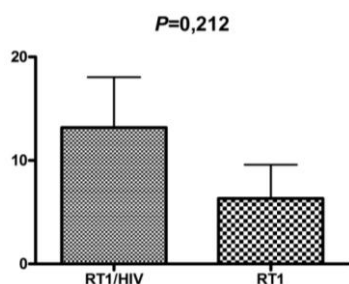


Figura 8: Nível de proteína C reativa, durante os episódios reacionais. N= RT1/HIV:15 pacientes e RT1: 10 pacientes.

6- Descrição dos níveis de linfócitos T CD4, carga viral do HIV e citocinas no momento do diagnóstico de hanseníase e no momento do diagnóstico de reação tipo 1

Como mostrado na Figura 9, houve um aumento na contagem absoluta de linfócitos T CD4 em 3 dos 4 pacientes avaliados entre o momento do diagnóstico de hanseníase BT e o momento em que eles apresentaram reação tipo 1. Por outro lado, todos os pacientes apresentaram uma diminuição na carga viral do HIV no mesmo período de tempo.

Na análise de citocinas, houve um aumento dos níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-12p70, IL-4 e IL-10 entre o diagnóstico da hanseníase BT e o início da reação tipo 1. As análises de IL-1 β , IL-17, IL-12p40 e IL-13 foram realizadas, porém não produziu qualquer valor e suas figuras, então, não foram mostradas.

Apesar das diferenças observadas nas análises das médias de contagem de células TCD4, carga viral do HIV e das citocinas entre os dois períodos avaliados, estas não tiveram significância estatística.

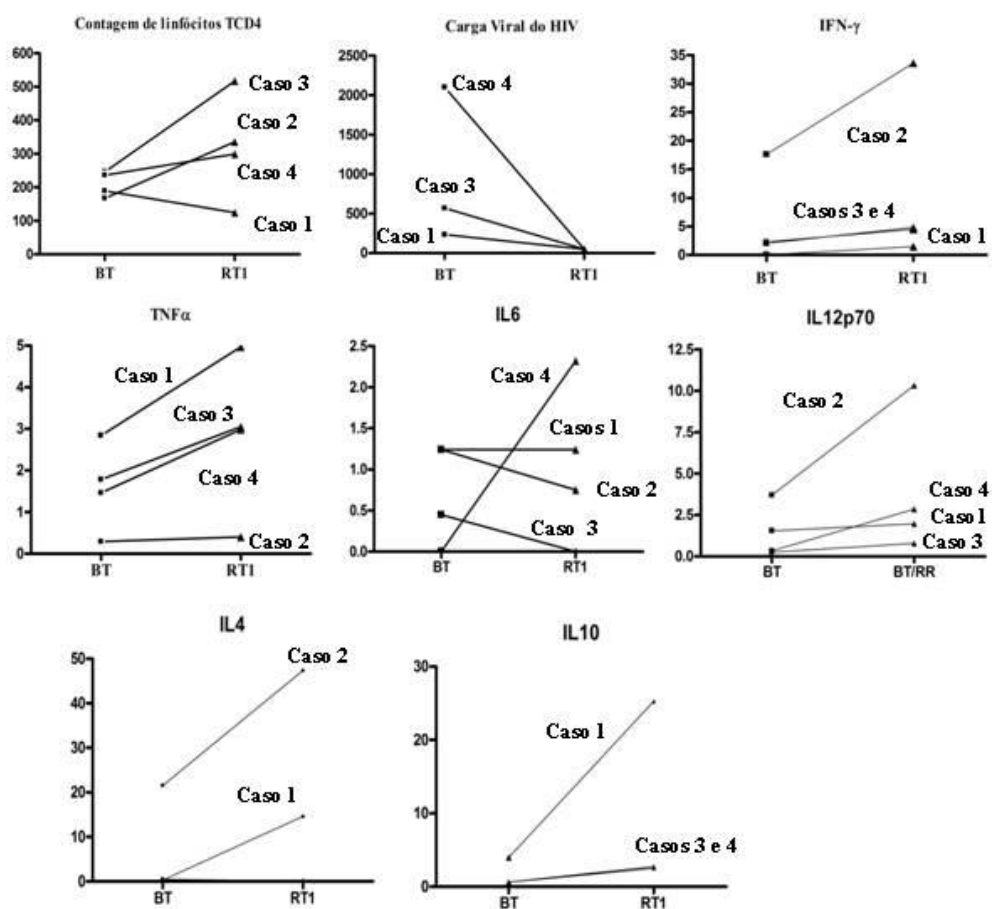


Figura 9: Contagem de linfócitos TCD4, carga viral do HIV e níveis de citocinas no momento do diagnóstico de hanseníase borderline tuberculóide e no momento do diagnóstico de reação tipo 1 em 4 pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae*.

7- Detecção de anticorpos IgM anti PGL-1

Foi possível realizar o ELISA para detecção de IgM anti- PGL1 no soro de 13 pacientes no momento do diagnóstico de hanseníase. Quatro (30,7%) destes estavam em reação tipo 1. Nenhum paciente apresentou positividade ao teste.

8- Características clínicas dos pacientes em reação tipo 1

Para avaliar as características clínicas da reação tipo 1, a frequência de determinados eventos relacionados à gravidade dos episódios de reação reversa foram analisados (Tabela 6). Não houve diferenças entre os grupos, em relação à frequência de neurite aguda (29,6% no grupo HIV positivo e 35,3% no grupo HIV negativo, $p=0,75$); necessidade de internação hospitalar (11,1% no grupo HIV positivo e 4,7% no grupo HIV negativo, $p=0,22$); média do número de lesões cutâneas (8,1 no grupo HIV positivo e 9,6 no grupo HIV negativo, $p=0,37$) e média de segmentos corporais afetados (3,4 no grupo HIV positivo e 3,8 no grupo HIV negativo, $p=0,49$) (Tabela 6). Entretanto, uma maior proporção de pacientes do grupo HIV positivo (9,3%) apresentou lesões cutâneas ulceradas e nenhum paciente do grupo controle apresentou ($p < 0,01$) (Tabela 6). O tempo médio do uso de corticóide para o tratamento da reação reversa foi de 8,4 meses no grupo HIV positivo e de 11,7 no grupo controle, porém não houve significância estatística ($p= 0,12$).

Tabela 6: Características clínicas dos episódios reacionais relacionados à gravidade de reação tipo 1

Características	HIV+ (n=27)	HIV- (n=84)	P
Média do número de lesões cutâneas	8,1	9,6	0,37
Média do número de segmentos corporais afetados	3,4	3,8	0,49
Presença de lesão cutânea ulcerada	4(9,3%)	0	<0,01
Presença de neurite aguda	8 (29,6%)	30 (35,3%)	0,75
Necessidade de internação hospitalar	3 (11,1%)	4(4,7%)	0,22
Média do tempo de uso de corticóide	8,4	11,7	0,12

HIV+= grupo HIV positive; HIV -= grupo HIV negativo; n= número de pacientes avaliados.

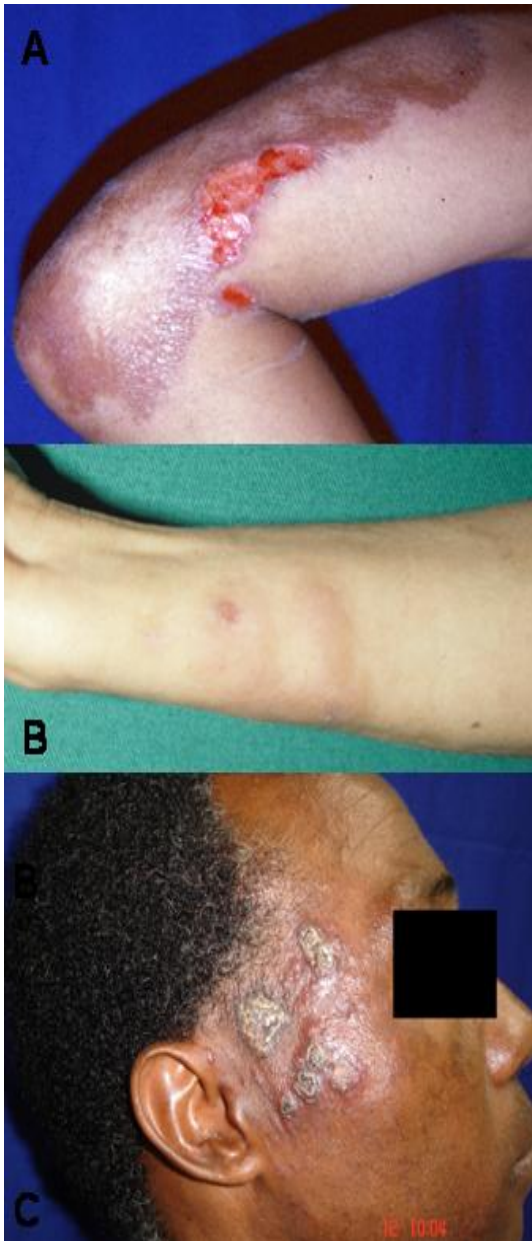


Figura 10: Lesões ulceradas em pacientes coinfetados pelo HIV/ *M. leprae*.

A: extensa ulcera em borda de lesão em placa na região posterior de braço esquerdo.

B: Lesão em placa eritematosa com ulceração central em braço esquerdo.

C: Lesão em placa eritematosa com presença de úlceras e crostas em hemiface direita.

V- Discussão:

A coorte de 92 casos de pacientes coinfectados pelo HIV/*M. leprae*, acompanhados no ASA entre 1989 e 2011, compõe a maior casuística de pacientes coinfectados descrita na literatura, até o momento. Isso se deve aos fatos de as duas doenças serem endêmicas no Rio de Janeiro e do Ambulatório Souza Araújo ser um centro de referência para o atendimento dos pacientes com hanseníase e HIV. A alta porcentagem de pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae* (3,8%) que foram atendidos no ASA/ Fiocruz no período de 1989 à 2011 provavelmente não reflete a real prevalência, neste mesmo período, de infecção pelo HIV entre os pacientes com hanseníase no estado do Rio de Janeiro. Em um estudo prévio realizado no Rio de Janeiro, Andrade *et al*, em 1997, encontraram uma soroprevalência de infecção pelo HIV de 0,3% entre 1.016 pacientes com hanseníase, testados entre 1990 a 1992 (Andrade 1997).

Entretanto, o presente estudo demonstra que houve um aumento do número de pacientes coinfectados no ASA nos últimos anos. Contraditoriamente, as taxas de prevalência e incidência de hanseníase decresceram no mesmo período de tempo, no Rio de Janeiro, como reportado pelo SINAN: 24,9/10.000 e 21,8/100.000 habitantes em 1990, respectivamente, contra 0,9/10.000 e 10,6 /100,000 habitantes em 2012 (MS 2013). No entanto, é importante notar, que esse aumento de pacientes coinfectados no ASA foi mais importante a partir do final da década de 90. Uma possibilidade para este aumento pode ser a disponibilização de TARV para todos os pacientes com AIDS, no Brasil, a partir de 1997. Como descrito na introdução desta tese, alguns autores sugerem que o uso de TARV está associado a um aumento da susceptibilidade à hanseníase (Couppie 2009; Sarno 2008; Vinay 2009).

As características demográficas dos pacientes apresentados na presente tese são semelhantes ao perfil de pacientes coinfectados descritos em estudos prévios. Em um estudo realizado, em Goiânia- GO, em que se realizou uma avaliação do perfil demográfico dos pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae*, Pereira *et al*, em 2004, também verificaram uma maior proporção de pacientes do sexo masculino sobre o sexo feminino (Pereira 2004). Da mesma forma, em outro estudo, onde 25 pacientes coinfectados foram acompanhados em Manaus-AM, Talhari *et al*, em 2010, observaram uma relação homem/ mulher de 1,5/1 (Talhari 2010). Neste mesmo estudo, a média de idade dos pacientes foi de 37,04 (20-59 anos de idade) (Talhari 2010), compatíveis com o resultado apresentado na presente tese. Sarno *et al* em 2008, em um estudo que se comparou os dados de parte dos pacientes descritos na presente tese com os dados de pacientes com hanseníase e sorologia para HIV desconhecida atendidos no ASA, também observaram um predomínio do sexo masculino e uma média de idade de 39,8 anos entre os coinfectados, similares ao grupo controle (Sarno 2008).

Estes resultados compartilham semelhanças com os dados epidemiológicos nacionais, tanto sobre a hanseníase quanto referentes à AIDS, que mostram um predomínio de pacientes do sexo masculino e na categoria de idade entre 30 a 59 anos, como observado no presente estudo (MS 2013). Entretanto, diferentemente dos dados nacionais, nenhum paciente menor de 15 anos de idade foi admitido no Ambulatório Souza Araújo, ainda que esta categoria de idade represente 2,7% de todos os novos casos de hanseníase no estado do Rio de Janeiro em 2013 (MS 2013). Talvez, a coinfeção HIV/ *M. leprae* em pacientes menores de 15 anos seja um evento raro e, por esta razão, o presente estudo (limitado pelos pacientes que são referenciados ao ASA) não tenha conseguido avaliar. Outra possível hipótese, para ser avaliada em futuros estudos, é que tal coinfeção em menores de 15 anos de idade possa ser subdiagnosticada e, desta forma, não referenciada à Fiocruz.

A maioria dos pacientes admitidos na Fiocruz nasceu e ainda vive no estado do Rio de Janeiro. Esta informação é de particular interesse, porque ela sugere que a hanseníase e a infecção pelo HIV são, na maioria das vezes, originalmente adquiridas e transmitidas dentro do estado do Rio de Janeiro, e não são doenças importadas de outras áreas do país, como se poderia esperar.

No presente estudo, houve uma preponderância de pacientes solteiros ou divorciados em relação aos casados. Apesar de não ter sido possível identificar os padrões de transmissão de HIV nos pacientes estudados pelos limites intrínsecos do desenho do estudo, é importante ressaltar que a principal forma de transmissão do HIV é pela via sexual e comportamento de risco, tal como múltiplos parceiros sexuais, relaciona-se a uma maior chance de adquirir a doença.

A maioria dos pacientes incluídos apresentava de 1 a 8 anos de escolaridade. Doenças negligenciadas como a hanseníase são mais comuns em populações pobres e marginalizadas com pouco acesso à educação formal. A associação entre hanseníase e baixos padrões socioeconômicos parece evidente pela própria distribuição mundial da doença, afetando países de um modo geral com índices elevados de pobreza, mas, sobretudo, com má distribuição da riqueza, como a Índia e o Brasil. Esta associação começou a ser observada pelo virtual desaparecimento da hanseníase das regiões do norte da Europa, no século passado, acompanhado por uma elevação geral das condições de vida desta área (van Beers 1996). Alguns trabalhos procuraram estabelecer uma relação entre a doença e variáveis socioeconômicas. Destes, destacam-se uma associação entre desnutrição infantil e adoecimento, na Índia (Sommerfelt 1985), e nível de escolaridade e risco aumentado de hanseníase, na África (Ponnighaus 1994). Outros possíveis fatores socioeconômicos envolvidos poderiam estar associados a uma alta densidade populacional em locais com

menores índices de desenvolvimento humano, com uma grande porcentagem de pessoas vivendo em aglomerados como as favelas brasileiras e os bairros de lata da Índia. Além disso, o microambiente da casa, como a relação entre o número de pessoas por cômodo, pode estar relacionado a uma maior transmissão da doença.

Outros estudos avaliaram a distribuição espacial da hanseníase no Brasil. Imbiriba *et al.*, em 2009, mostraram, através de mapas temáticos, que áreas com altas concentrações de hanseníase na cidade de Manaus estão diretamente relacionadas às características sócio-demográficas da cidade (Imbiriba 2009). De acordo com Magalhães *et al.* em 2007, altas taxas de detecção de hanseníase no Brasil estão relacionadas à pobreza e fatores sociais (Magalhães 2007). Em um estudo Kerr-Pontes *et al* em 2006 no Ceará, todas as variáveis independentes que se relacionaram com a incidência de hanseníase estavam relacionadas à pobreza como baixa escolaridade; a experiência prévia de falta de comida; frequente contato com água de açudes, lagos e rios para recreação ou uso doméstico; e infrequente uso de roupas de cama (Kerr-Pontes 2006). Em outro estudo realizado por Souza *et al* em Recife em 2001, evidenciou que as áreas com maior incidência de hanseníase eram as regiões de maior densidade populacional da cidade (Souza 2001).

Sendo assim, como observado nos mapas apresentados na figura 3, dentro do estado do Rio de Janeiro há diferenças de taxas de incidência de hanseníase e AIDS por município, com predomínio de casos das duas doenças na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro. Apesar de não ter sido possível relacionar, diretamente, a distribuição dos casos incluídos com as taxas de incidência de AIDS e hanseníase no estado, também houve, no presente estudo, um predomínio de pacientes residentes na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. Dados não publicados referentes à distribuição do total de casos de hanseníase diagnosticados no ASA, no mesmo período de tempo, mostram uma preponderância de pacientes provenientes da cidade do Rio de Janeiro e cidades vizinhas. Portanto, em relação ao total de pacientes atendidos na Fiocruz, parece não haver um perfil distinto de distribuição dos pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae*. Entretanto, poucos pacientes coinfectados vieram de outras áreas do Estado, apesar da alta incidência de AIDS e taxas de detecção de hanseníase. Alguns fatores podem ter contribuído para isso, tais como: pequeno número de pacientes coinfectados nestas regiões, dificuldades de transporte, qualidade dos serviços de saúde locais, entre outros.

Igualmente, não foi possível, devido à limitação do desenho do estudo, relacionar a distribuição dos pacientes na cidade do Rio de Janeiro com as taxas de prevalência de hanseníase e AIDS em cada subárea da cidade, uma vez que não há dados epidemiológicos, na literatura, sobre a coinfeção HIV e hanseníase especificamente para cada subárea. No

entanto, como mostrado na Figura 4, a maioria dos pacientes vive na zona norte da cidade, seguida de pela zona oeste. Da mesma forma como na distribuição dos pacientes pelos municípios fluminenses, dados não publicados da distribuição de todos os pacientes admitidos no ASA, no mesmo período de tempo, na cidade do Rio de Janeiro, mostram uma distribuição de casos, similar à encontrada no presente estudo, com predomínio nas regiões norte e oeste da cidade.

É importante ressaltar que a localização da Fiocruz na região norte da cidade do Rio de Janeiro produz um viés de seleção para o estudo I devido à facilidade de encaminhamento dos serviços de saúde mais próximos ao ASA e por receber a demanda espontânea da região. Entretanto, regiões como a área metropolitana da cidade e as subáreas norte e oeste da cidade do Rio de Janeiro são caracterizadas por apresentarem um grande número de pessoas vivendo em favelas caracterizadas por uma alta densidade populacional o que contribui para a transmissão da hanseníase. Além disso, estas regiões, contrariamente à zona sul da cidade do Rio de Janeiro, apresentam uma população mais pobre com menor acesso à informação e à educação formal, contribuindo para uma maior prevalência de infecção pelo *M. leprae* e pelo HIV.

Uma vez que o HIV afeta a imunidade celular especulou-se que o paciente infectado pelo HIV poderia ter uma deficiência na formação de granuloma. Sendo assim, os pacientes coinfectados HIV/ *M. leprae* poderiam ter uma resposta deficiente frente ao teste de Mitsuda da mesma forma que ocorre com os pacientes coinfectados HIV/ *M. tuberculosis* em relação ao teste de PPD. Pereira Junior *et al*, em 1992, avaliaram a resposta ao teste de Mitsuda em 22 pacientes HIV positivos e 20 indivíduos saudáveis e mostraram que no grupo HIV positivo houve uma reatividade diminuída com 77% dos testes de Mitsuda < 3mm, 13% entre 3 e 4 mm e 9% > 4mm, enquanto no grupo controle, 80% dos indivíduos apresentaram teste de Mitsuda > 4mm (Pereira Jr 1992). Sampaio *et al*, em 1995, também verificaram uma diferença em relação à resposta ao teste da lepromina, onde apenas 2 (25%) de 8 pacientes infectados pelo HIV e com hanseníase BT apresentaram reação ≥ 3 mm, enquanto entre os pacientes com hanseníase BT sem HIV, 91,7% apresentaram reação ≥ 3 mm (Sampaio et al. 1995). Alguns relatos de casos na literatura, por outro lado, descreveram pacientes HIV positivos com resposta positiva ao teste de Mitsuda (Girão RJS 2005). Nenhum estudo analítico de grande porte, no entanto, foi realizado para verificar a hipótese da deficiência de resposta ao teste de lepromina em pacientes coinfectados.

Na presente tese, no estudo II, quando incluiu-se apenas os pacientes borderline tuberculóide, houve uma maior proporção de pacientes com reação positiva à lepromina do que no grupo HIV negativo. Vale ressaltar, entretanto, que no grupo HIV positivo houve uma

maior proporção de pacientes em reação tipo 1 o que pode justificar a maior positividade ao teste de Mitsuda. Além disso, a maioria dos pacientes HIV positivos incluídos estava em uso de TARV e com CD4 >200 células/ mm³ no momento do diagnóstico da hanseníase, diferentemente do estudo de Sampaio *et al*, em 1995, em que a maioria dos pacientes apresentava grave imunossupressão de linfócitos T CD4. Uma outra possibilidade para explicar a maior proporção de pacientes com o teste de Mitsuda positivo entre os pacientes coinfectados em relação ao grupo controle, seria uma maior incidência de tuberculose prévia ao diagnóstico de hanseníase no grupo HIV positivo, uma vez que é sabido que a infecção pelo HIV aumenta a susceptibilidade à tuberculose. Especula-se que estes pacientes poderiam apresentar uma hiper-reatividade aos antígenos da micobactéria da mesma forma como já se demonstrou uma reatividade gigante ao teste do PPD em pacientes com hanseníase LL (Sampaio *et al*. 1993). Entretanto, apesar de uma maior porcentagem de pacientes com tuberculose prévia no grupo HIV positivo ter apresentado positividade ao teste da lepromina, esta não foi estatisticamente significativa.

Neste mesmo contexto, apesar das expectativas iniciais de que a infecção pelo HIV, ao afetar a imunidade celular, provocaria um aumento do número de pacientes multibacilares, o estudo I mostra que os pacientes coinfectados HIV/ *M. leprae* podem apresentar todas as formas clínicas da hanseníase. Interessantemente, a presente tese mostra uma preponderância das formas paucibacilares em relação às multibacilares. Tais achados são compatíveis com os encontrados na literatura. Pereira *et al*, em 2004, descreveram que 70,8% dos pacientes coinfectados apresentavam a forma paucibacilar no momento do diagnóstico de hanseníase (Pereira *et al*. 2004). Da mesma forma, Talhari *et al*, em 2010, encontraram uma frequência de 72% de formas paucibacilares (Talhari 2010). Sarno *et al*, em 2008, também verificaram uma proporção estatisticamente significativa de formas paucibacilares em pacientes coinfectados em relação aos pacientes com sorologia para HIV desconhecida (Sarno 2008). Esses dados diferem dos dados epidemiológicos do Rio de Janeiro, onde houve um predomínio de formas multibacilares (56,9%), em 2012 (MS 2013a).

Mais uma vez, é importante destacar que a maioria dos pacientes incluídos no estudo I estava em uso de TARV e apresentavam média de contagem de linfócitos TCD4 > 200 células/ mm³. Desta forma, é possível especular que a presença do estímulo antigênico provocado pelo *M. leprae* associada à melhora imunológica causada pelo uso de TARV podem estar associados com a formação do granuloma e, os subsequentes, aparecimento de lesões tuberculoide neurais e cutâneas. Ainda nesta hipótese, pode-se considerar que a magnitude deste incremento na resposta celular pode estar relacionado com as presenças das

formas borderline tuberculóide ou reação tipo 1, exatamente as duas formas mais apresentadas pelos pacientes, incluídos, no momento do diagnóstico da hanseníase.

A importância do uso de TARV no desenvolvimento de reação tipo 1 está demonstrada, no estudo I, através da análise multivariada dos fatores clínicos relacionados à presença de reação reversa. A terapia antirretroviral foi o único fator independente relacionado à RT1. É antecipado afirmar que a alta incidência de reação reversa no momento do diagnóstico de hanseníase, apresentado na presente tese, é uma consequência, exclusiva, da utilização de TARV. No entanto, sabe-se que o início de TARV está associado com a ativação de infecções subclínicas de *M. leprae*. Neste contexto, 28,1% dos pacientes incluídos apresentaram reação reversa em decorrência de IRIS. A patogênese da IRIS permanece especulativa. As teorias atuais envolvem a combinação da presença de estímulo antigênico subjacente, o grau de restauração imune, bem como a susceptibilidade genética do hospedeiro (Price 2001). De acordo com Murdoch, o estímulo antigênico pode ser um organismo intacto, "clínicamente silencioso" ou morto (Murdoch 2007). Igualmente, a patogênese da reação tipo 1 não está completamente entendida. Durante os episódios reacionais, altas quantidades de citocinas inflamatórias são produzidas, refletindo reativação imunológica/ inflamatória das lesões de pele com padrão tuberculóide (Sampaio 1995; Krutzik 2005).

O estudo II demonstra, pela primeira vez na literatura, através de um desenho de estudo longitudinal e analítico, que a frequência de reação tipo 1 é maior entre pacientes coinfectados pelo HIV. É difícil comparar a taxa de incidência encontrada na presente tese com dados de outros estudos devido às diferenças nos critérios de definição de reação reversa (por exemplo, incluindo ou excluindo neurite isolada), métodos de diagnóstico (por exemplo, clínica e/ou histopatológico), complexidade do atendimento (por exemplo, hospital, centro de referência, atenção primária), fatores étnicos e variações geográficas.

A taxa de incidência encontrada no grupo HIV negativo, no entanto, é consistente com a maioria das taxas de incidência previamente publicadas. Entre os pacientes coinfectados, entretanto, demonstrou-se haver uma taxa de incidência maior. É improvável que se superestimou as taxas de incidência de reação, uma vez que todos os episódios foram diagnosticados por profissionais experientes no tratamento da hanseníase e a maioria (96,3% no grupo HIV e 66,3% no grupo HIV negativo) foi confirmada por análise histopatológica e/ou eletroneuromiografia e histopatologia de nervos nos casos de neurite isolada.

A baixa prevalência de infecção pelo HIV em pacientes com hanseníase relatada por Andrade *et al* (0,3%), em 1997, e o fato de que 43 (12,5%) pacientes do grupo controle terem apresentado sorologia negativa para infecção pelo HIV no grupo HIV negativo do estudo II

reforçam a convicção de que quase todos ou senão todos os pacientes do grupo controle eram verdadeiramente HIV negativos.

Pela literatura, a maioria dos casos de estados reacionais ocorre nos primeiros seis à dose meses de tratamento poliquimioterápico para hanseníase (Kumar 2004a). Entretanto, em nosso estudo, verificamos que 44,1% dos pacientes do grupo HIV positivo e 14,9% dos pacientes do grupo controle apresentaram reação no momento do diagnóstico de hanseníase. Deve-se levar em conta que o ASA é um centro de referência para o atendimento da hanseníase e, por isso, recebe mais frequentemente pacientes com apresentações clínicas graves, incluindo reação reversa, configurando assim um viés de seleção para o estudo. Outros trabalhos baseados em centros de referências para o tratamento de hanseníase também verificaram grande incidência de estados reacionais como primeira manifestação da doença. Kumar *et al*, em 2004, observaram que 20,6% dos pacientes paucibacilares apresentaram reação reversa como primeira manifestação de hanseníase (Kumar 2004a), já Lockwood *et al* observaram uma incidência de 47,5% de casos de estados reacionais no momento da chegada dos pacientes no Dhoolpet Leprosy Research Center, na Índia (Lockwood 1993). No entanto, é importante ressaltar a grande proporção de pacientes HIV positivos que apresentaram estado reacional como primeira manifestação de hanseníase verificada em nosso estudo. Isso sugere que nos pacientes coinfectados a hanseníase pode ter uma evolução clínica diferente.

Apesar de uma maior incidência de reação tipo 1 no grupo HIV positivo não houve diferenças entre os grupos em relação à reação reversa recorrente. Os estados reacionais recorrentes são um importante fenômeno clínico que resulta em danos neurais mais graves, e consequentemente, aumenta a possibilidade de sequelas. No presente estudo verificamos uma incidência de episódios reacionais recorrentes de 1/100 pessoas-ano no grupo HIV positivo e 0,3/100 pessoas-ano no grupo HIV negativo, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Este resultado é menor do que o encontrado publicado na literatura. Kumar *et al*, em 2004, em uma casuística de pacientes com sorologia para HIV desconhecida, verificaram que 9,7% dos pacientes apresentaram reação reversa recorrente (Kumar 2004a), já em outros estudo baseado em hospital de referência, em 1993, houve uma incidência de 33% de reações reversas recorrente (Lockwood 1993). Um único estudo que avaliou pacientes coinfectados HIV/ *M. leprae*, realizado na Etiópia, com um número limitado de pacientes multibacilares, também verificou uma maior incidência de reação reversa recorrente entre os pacientes HIV positivos (Gebre 2000). Uma das possibilidades para a menor frequência de recorrência dos episódios reacionais encontrada no estudo II em relação à literatura seria que aqui avaliou-se somente pacientes paucibacilares, enquanto nos outros trabalhos foram incluídos também pacientes multibacilares.

A influência da infecção pelo HIV no desenvolvimento de reação reversa foi confirmada pela análise dos fatores de risco para reação tipo 1. Nesta análise, a infecção pelo HIV permaneceu como fator de risco independente para RT1. A infecção pelo HIV compreende um amplo espectro de manifestações clínicas e muitos aspectos, tais como infecções oportunistas, medicamentos profiláticos e TARV podem interferir na sua história natural. Não foi possível identificar quais aspectos específicos da infecção pelo HIV estão associados ao desenvolvimento de reação reversa, mas, como discutido anteriormente, publicações prévias indicam que o uso de TARV está relacionado à ativação de infecções subclínicas. No presente estudo, a grande maioria dos pacientes estava em uso de TARV.

Alguns estudos avaliaram os fatores de riscos envolvidos com o desenvolvimento de reação reversa. Kumar *et al*, em 2004, observaram que gênero feminino, doença disseminada (caracterizada nesse estudo como manifestação da hanseníase em três ou mais áreas do corpo) ou esfregaço cutâneo positivo como fatores de risco para o desenvolvimento de reação reversa (Kumar 2004a). Ranque *et al*, em 2007, verificaram que pacientes acima de 15 anos de idade, a forma clínica BT, esfregaço cutâneo positivo ou > 5 lesões cutâneas apresentavam maior chance de evoluir com RR em pacientes vietnamitas (Ranque 2007). Van Brakel *et al*, em 1994, verificaram que doença disseminada (3 de 9 áreas corporais com manifestação de hanseníase) e forma clínica BT estavam associadas com desenvolvimento de reação reversa (Van Brakel 1994). Souza *et al*, em 2007, observaram que idade acima de 40 anos e PCR positivo para *M. leprae* em lesões únicas eram fatores de risco isolados para o desenvolvimento de RR (Sousa 2007). Reação reversa é vista frequentemente também em gestantes e puérperas (Lockwood 1999). Através do estudo II, incluímos entre os fatores de risco para reação tipo I a infecção pelo HIV, presença de BAAR nas amostras de lesão cutânea e o teste de Mitsuda negativo em pacientes BT.

O mais importante fator de risco independente identificado pela análise multivariada foi a presença da BAAR em biópsias de lesão de pele. As formas borderline são consideradas mais instáveis, em que a capacidade imunológica do paciente para conter a infecção é apenas parcial. A forma clínica BT da hanseníase assemelha-se à forma TT, mas o número de lesões de pele é geralmente maior e o granuloma, na análise a histopatológica, difere do granuloma da forma clínica TT porque n naquela o granuloma não se estende até a camada basal da epiderme e os números de bacilos nas lesões variam de indetectável a 1 em cada 10 a 100 campos microscópicos (Hastings1988).

Em uma hipótese sobre a patogênese da reação reversa, Opromolla *et al*, em 1998, sugere que o desenvolvimento de reação tipo 1 estaria relacionado um estímulo antigênico contínuo decorrente da multiplicação dos bacilos (Opomolla 1998). É interessante notar que

não é possível por análise histopatológica distinguir entre bacilos viáveis dos inviáveis ou fragmentados. No entanto, a presença de um estímulo antigênico parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento da reação tipo 1. Estudos prévios documentaram que pacientes multibacilares e pacientes paucibacilares com presença de PCR para *M. leprae* positiva em lesão cutânea única estão em um risco maior para o desenvolvimento da reação tipo 1 (Kahawita 2008).

Curiosamente, apesar de todos os pacientes apresentarem BI negativo, granuloma bem formado em lesão de pele o que define a forma BT e a maioria dos pacientes no grupo HIV positivo reação positiva ao teste da lepromina, havia uma proporção maior de pacientes HIV positivos com BAAR nas amostras de lesão de pele. É considerável especular que apesar do granuloma bem organizado, os possíveis mecanismos de *clearance* dos bacilos das lesões possam estar parcialmente prejudicados nos pacientes coinfectados. Sendo assim, os constituintes bacterianos provocando um estímulo antigênico associado com a restauração da resposta imune após a iniciação do TARV podem desencadear um processo de reação tipo 1.

No estudo II, 93,3% apresentaram RT1 em aumento de contagem de células T CD4 e 61,6% evoluíram com reação em vigência de queda da carga viral do HIV. Neste mesmo contexto, a figura 9 ilustra a reação tipo 1 ocorrendo em vigência de diminuição de carga viral, aumento de linfócitos T CD4 e aumento dos níveis de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias. Tais dados mostram que a reação reversa parece ser um fenômeno de recuperação imunológica e não de imunossupressão e, por isso, os trabalhos realizados antes do advento do TARV não encontravam associação entre HIV e reação reversa. A associação de reação tipo 1 já foi demonstrada nos diversos estudos sobre a reação reversa como consequência de IRIS. Em estudo recente, realizado com parte dos pacientes incluídos na presente tese, Giacoia- Gripp *et al* observaram aumento de expressão de CD38 em linfócitos TCD8 em pacientes apresentando RT1 associada à IRIS (Giacoia-Gripp 2011). Estes achados foram confirmados também pelo trabalho de De Oliveira *et al* também com parte da população de pacientes incluídos na presente tese (de Oliveira 2013). Já foi demonstrado que CD38+, um marcador de ativação de linfócitos T CD8, está associado à supressão da carga viral do HIV. Especula-se, portanto, que estas células possam estar relacionadas à gênese da reação reversa em pacientes coinfectados pelo HIV (de Oliveira 2013) (Giacoia-Gripp 2011).

Como mostrado na Figura 7, houve uma clara diferença entre os perfis de citocinas entre os grupos, com um maior nível de citocinas de perfil Th2 entre os pacientes HIV positivos e de perfil Th1 entre os pacientes HIV negativos. É sabido que a infecção crônica pelo HIV é, também, caracterizada pela diminuição da produção de IL-2 e, como consequência, há uma menor diferenciação de fenótipo de linfócitos que permanecem como Th0, com produção

tanto de citocinas do tipo Th1 como de Th2 (Hanna& Hirsch 2005). Entretanto, evidências substanciais, na literatura, indicam que a TARV restaura o sistema imunológico e o aumento da produção de citocinas inflamatórias é observado nos soros dos pacientes em uso de antirretroviral. Sendo assim, pode-se considerar que de uma forma geral em pacientes coinfectados pelo HIV há um aumento de citocinas inflamatórias na reação tipo 1 como verificado em todos os casos de reação reversa. Entretanto, no microambiente imunológico da infecção crônica pelo HIV, mesmo subsequente ao uso de TARV, este aumento pode não ser tão significativo como em pacientes sem infecção pelo HIV. Outra possibilidade é que, no presente estudo, havia uma proporção maior de pacientes no grupo HIV positivo com BAAR em amostras de lesão de pele. Alguns estudos mostraram que a presença do antígeno espécie-específico PGL-1 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias de forma seletiva. Pode-se especular, portanto, que o perfil de citocinas Th2 mais proeminente encontrado entre os pacientes infectados pelo HIV pode estar associado a uma maior presença de PGL-1 nas lesões cutâneas. Já foi demonstrado que a infecção pelo HIV altera o equilíbrio Th1/Th2 em pacientes com leishmaniose visceral coinfectados pelo HIV, resultando em aumento de citocinas Th2 e diminuição de IL-2 e IL-18 (Wolday et al. 2000). Em um estudo recente, publicado em 2009, demonstrou-se que o aumento de IL6 e CXCL10 estão associados à presença de reação tipo 1 em pacientes sem HIV (Stefani et al. 2009). Na presente tese não se avaliou os níveis de CXCL-10 e não houve diferença significativa entre os grupos em relação à IL-6. Entretanto, estudos contemplando grupos controles de pacientes sem reação reversa e pacientes saudáveis devem ser realizados no contexto da coinfecção pelo HIV para se melhor avaliar o perfil de citocinas durante os episódios reacionais nos pacientes coinfectados.

A proteína C reativa é um marcador inflamatório que no contexto da infecção pelo HIV se associa ao estado de hiperativação imunológica (Fauci 2008). Podia-se esperar que os pacientes coinfectados apresentassem maiores níveis de PCR durante os episódios reacionais em relação aos pacientes HIV negativos. De fato, no presente estudo, apesar de não ter havido significância estatística, os pacientes do grupo HIV positivo apresentaram em média maiores níveis de PCR. Entretanto, estudos com maior número de pacientes e com grupos controles devem ser realizados para a dinâmica da PCR antes e durante os estados reacionais no contexto da coinfecção pelo HIV.

No estudo II, nenhum paciente apresentou positividade para o exame de anti- PGL1. Pela literatura, a sensibilidade do teste de ELISA para se detectar IgM anti- PGL1 é de cerca de 30% em pacientes paucibacilares sem HIV (Bührer-Sékula2003). Entretanto, uma vez que houve uma maior proporção de pacientes com BAAR nas biópsias de lesão de pele no grupo HIV positivo, era possível considerar que, neste grupo de indivíduos, poderia se ter uma

maior positividade no exame. Além disso, especula-se que a TARV possa recuperar a resposta imune específica para determinados patógenos, por exemplo, para tuberculose (com resposta positiva para o PPD) ou para hepatite B (com soroconversão para o anti-Hbs) (French et al. 2004). Desta forma, os pacientes com hanseníase BT em uso de TARV poderiam apresentar o anti- PGL1 positivo. Entretanto, os resultados desta tese são compatíveis com os resultados de um único trabalho publicado na literatura em que também não se encontrou qualquer positividade em pacientes paucibacilares coinfectados pelo HIV(Pereira et al. 2004).

Interessante, entretanto, é a diferença da proporção de pacientes que apresentaram lesões atípicas no dois grupos. No estudo II, 4 pacientes HIV positivos apresentaram lesões ulceradas contra nenhum paciente do grupo HIV negativo. Lesões cutâneas ulceradas não são comuns na hanseníase paucibacilar em reação reversa, mas já foram descritas na literatura(Girão RJS 2005). Esse tipo de manifestação recebeu a atenção de pesquisadores na década de 30 do século passado como Ryrie que descreveu vários casos desta natureza e Rodrigues e Wade e Cochrane também fizeram referências a esse fenômeno(Opomolla 1998). Pfalzgraff e Ramu, em 1994, relataram que lesões ulceradas são manifestações infrequentes em pacientes do polo tuberculóide e que seriam resultados de hipersensibilidade exagerada nas reações tipo 1 (Opomolla 1998). Opomolla *et al* analisaram 15 casos de estado reacional tipo 1 que apresentaram lesões ulceradas e foram atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima em Bauru, São Paulo, em um período de 40 anos (1958-1998). Na casuística de Opomolla *et al*, a incidência de episódios reacionais com lesão ulcerada, durante o período do estudo, foi de 6,3% ;13 pacientes foram classificados com a forma clínica tuberculóide e 2 com a forma clínica dimorfa; a grande maioria dos pacientes apresentou lesão ulcerada em um segundo episódio de reação e todos os pacientes, exceto um, apresentaram reação ao teste de Mitsuda positiva. Opomolla *et al* sugerem dois mecanismos que podem estar envolvidos na patogênese da lesão ulcerada: na primeira, os autores especulam que um estímulo antigênico contínuo decorrente da multiplicação dos bacilos poderiam causar dano tecidual pelo aumento da produção de TNF- α por macrófagos ativados (Opomolla 1998). Na outra hipótese, os autores sugerem que os pacientes que apresentaram lesões ulceradas seriam uma população selecionada geneticamente que apresentariam homozigose para o alelo TNFB₂, o qual se relaciona em pesquisas prévias, com indivíduos que apresentam concentrações plasmáticas mais altas de TNF- α (Opomolla 1998). No entanto, em outro estudo de Opomolla *et al* com um número limitado de pacientes, os autores não verificaram qualquer tipo de associação entre os antígenos HLA e estado reacional da hanseníase tipo 1 com presença de úlceras cutâneas.

Mais que 95% dos pacientes que apresentaram reação foram tratados com corticóide, sendo que 6 indivíduos necessitaram de internação hospitalar. As internações foram necessárias para a realização de pulsoterapia com corticóide devido aos quadros de doença disseminada ou por neurite que não responderam ao uso de corticóide oral. Os pacientes de ambos os grupos necessitaram em média de um período mais prolongado de uso de prednisona do que o período de 6 meses estabelecido pelo Ministério da Saúde (MS 2010). A ocorrência desse período mais prolongado de uso de corticóide pode estar relacionada ao fato do ASA ser um centro de referência para os casos de neurite e os casos mais graves de reação reversa. É importante ressaltar que apesar de um período médio mais prolongado de prednisona, os pacientes apresentaram uma evolução clínica favorável em ambos os grupos, evidenciando a eficácia da corticoterapia para o tratamento dos estados reacionais, inclusive entre os pacientes HIV positivos.

VI- Conclusões:

1. Houve um aumento do número absoluto e proporcional de pacientes coinfectados pelo HIV em um centro de referência para o tratamento da hanseníase, no Rio de Janeiro, a partir do final da década de 90.
2. Não parece haver um perfil epidemiológico característicos dos pacientes coinfectados atendidos no ASA em relação ao perfil epidemiológico dos pacientes com hanseníase ou HIV diagnosticados no Brasil.
3. A maioria dos pacientes atendidos no ASA vive na zona norte da cidade do Rio de Janeiro, seguida de pela zona oeste e na outras cidades que compõem a região do Rio de Janeiro. Estas regiões são caracterizadas por uma alta densidade populacional e por um menor índice de desenvolvimento social, o que favorece uma maior incidência de hanseníase e AIDS nestes locais. Entretanto, outros estudos multicêntricos e analíticos devem ser realizados a fim de se avaliar a distribuição geográfica dos pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae* e sua correlação com fatores socioeconômicos e culturais.
4. O presente estudo mostra que pacientes coinfectados podem apresentar todas as formas clínicas da hanseníase, porém, paradoxalmente, houve predomínio de formas paucibacilares o que não se relaciona com os indicadores clínicos da hanseníase no Rio de Janeiro.
5. O uso de TARV foi o único fator associado ao desenvolvimento de reação reversa no momento do diagnóstico de hanseníase entre os pacientes coinfectados pelo HIV/ *M. leprae*.
6. O presente estudo mostra, pela primeira vez na literatura, que a frequência de reação reversa é maior em pacientes coinfectados pelo HIV e a influência desta infecção no desenvolvimento de reação reversa foi confirmada pela avaliação multivariada dos fatores de riscos para reação.
7. A presença de BAAR em amostras de lesão de pele, pelo exame histopatológico, foi o principal fator de risco relacionado ao desenvolvimento de reação reversa e o teste de Mitsuda negativo também permaneceu como fator de risco para RT1, na análise multivariada.
8. A maioria dos pacientes coinfectados apresentaram RT1 em vigência de declínio da carga viral do HIV e aumento da contagem de linfócitos T CD4.
9. Em pacientes em reação tipo 1 houve um predomínio de citocinas inflamatórias no grupo HIV negativo e de citocinas anti-inflamatórias no grupo HIV positivo, porém

estudos com grupos controles devem ser realizados para melhor avaliar a dinâmica destas citocinas na RT1 em pacientes coinfectados

10. O exame de ELISA para detecção de IgM anti- PGL1 não parece ter uma sensibilidade razoável em pacientes BT coinfectados pelo HIV, entretanto estudos comparativos com grupos controles e com maior número de pacientes devem ser realizados a fim de se avaliar este desfecho.
11. Apesar da maior frequência de lesões ulceradas no grupo HIV positivo, a reação reversa não parece ser mais grave nos pacientes coinfectados uma vez que não houve diferenças entre os grupos em relação às outras variáveis avaliadas e todos os pacientes tiveram resposta favorável ao tratamento com a prednisona.

VII- Referências:

- Andrade VL, Moreira Alves T, Regazzi Avelleira JC, Bayona M 1997. Prevalence of HIV 1 in leprosy patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Leprol*, 10, 159-163.
- Araújo M 2003. Hanseníase no Brasil. *REv Soc Bras Med Trop*, 36, 373-382.
- Arora VK, Johri A 1994. Reactivation of tuberculosis and leprosy in an HIV-positive case. *Tuber Lung Dis*, 75, 237-238.
- Arunthathi S, Ebenezer L, Kumuda C 1998. Reversal reaction, nerve damage and steroid therapy in three multibacillary HIV positive patients. *Lepr Rev*, 69, 173-177.
- Becx-Bleumink M 1993. Priorities for the future and prospects for leprosy control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 61, 82-101.
- Belliappa AD, Bhat RM, Martis J 2002. Leprosy in type I reaction and diabetes mellitus in a patient with HIV infection. *Int J Dermatol*, 41, 694-695.
- Blum L, Flageul B, Sow S, Launois P, Vignon-Pennamen MD, Coll A, Millan J 1993. Leprosy reversal reaction in HIV-positive patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 61, 214-217.
- Borgdorff MW, van den Broek J, Chum HJ, Klokke AH, Graf P, Barongo LR, Newell JN 1993. HIV-1 infection as a risk factor for leprosy; a case-control study in Tanzania. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 61, 556-562.
- Bourgarit A, Carcelain G, Martinez V, Lascoux C, Delcey V, Gicquel B, Vicaut E, Lagrange PH, Sereni D, Autran B 2006. Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. *Aids*, 20, F1-7.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*, 12, 1365-1371.
- Britton WJ, Lockwood DN 2004. Leprosy. *Lancet*, 363, 1209-1219.
- Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L 2003. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 41: 1991-1995.
- Bwire R, Kawuma HJ 1993a. Human immunodeficiency virus and leprosy--type 1 reactions, nerve damage and steroid therapy: 'a case report'. *Lepr Rev*, 64, 267-269.
- 1993b. Leprosy, Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome in two African patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87, 559.

- 1994. Type 1 reactions in leprosy, neuritis and steroid therapy: the impact of the human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88, 315-316.
- Cadogan M, Dalglish AG 2008. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention. *Lancet Infect Dis*, 8, 675-684.
- Carvalho KI, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Maeda SM, Tomimori J, Xavier MB, Haslett PA, Nixon DF, Kallas EG 2012. Lower numbers of natural killer T cells in HIV-1 and *Mycobacterium leprae* co-infected patients. *Immunology*, 136, 96-102.
- Carvalho KI, Maeda S, Marti L, Yamashita J, Haslett PA, Kallas EG 2008. Immune cellular parameters of leprosy and human immunodeficiency virus-1 co-infected subjects. *Immunology*, 124, 206-214.
- Cavallieri F LG 2008. Índice de Desenvolvimento Socia- IDS: comparando as realidades microurbanas da cidade do Rio de Janeiro. In PMdRd Janeiro, Rio de Janeiro.
- Couppie P, Domergue V, Clyti E, El Guedj M, Vaz T, Sainte-Marie D, Marty C, Nacher M 2009. Increased incidence of leprosy following HAART initiation: a manifestation of the immune reconstitution disease. *AIDS*, 23, 1599-1600.
- de Almeida AM, Roselino AM, Foss NT 1994. Leprosy and HIV infection. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 62, 133-135.
- DATASUS- Brazilian National System of Disease Notification 2011. [accessed 29 April 2011]. Available from: www.datasus.gov.br.
- de Brito AMdC, E.A.; Szwarcwald, C.L. 2000. AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34, 207-217.
- de Oliveira AL, Amadeu TP, de Franca Gomes AC, Menezes VM, da Costa Nery JA, Pinheiro RO, Sarno EN 2013. Role of CD8(+) T cells in triggering reversal reaction in HIV/leprosy patients. *Immunology*, 140, 47-60.
- Del Rio C, Curran JW 2005. Epidemiology and Prevention of Acquired immunodeficiency syndrome and Human immunodeficiency Virus infection. In G Mandell, R Douglas, J Bennet, R Dolin, *Principles and practice of Infectious Disease*, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, p. 1477-1505.
- Deps P, Lucas S, Porro AM, Maeda SM, Tomimori J, Guidella C, Reuter T, Oliveira NS, Madureira BP, Souza VA, Loureiro RM, Alves BL, Bellone A, Lockwood DN 2013. Clinical and histological features of leprosy and human immunodeficiency virus co-infection in Brazil. *Clin Exp Dermatol*, 38, 470-477.
- Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D 1996. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med*, 124, 654-663.

- Fauci ASL, H. C. 2008. Human Immunodeficiency Virus Disease: AIDS and Related Disorders. In *Harrison's principles of internal medicine*, The McGraw-Hill Companies, p. 1137-1204.
- French MA, Price P, Stone SF 2004. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS*, 18, 1615-1627.
- Frommel D, Tekle-Haimanot R, Verdier M, Negesse Y, Bulto T, Denis F 1994. HIV infection and leprosy: a four-year survey in Ethiopia. *Lancet*, 344, 165-166.
- Galligaro G, Meintjes G, Mendelson M 2011. Pulmonary manifestations of the immune reconstitution inflammatory syndrome. *Current opinion in pulmonary medicine*, 17, 180-188.
- Gallo MEN, Sampaio E, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SL, Pessolani MCV, Sarno EN 2005. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. In JR Coura, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 1ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1383- 1394
- Gebre S, Saunderson P, Messele T, Byass P 2000. The effect of HIV status on the clinical picture of leprosy: a prospective study in Ethiopia. *Lepr Rev*, 71, 338-343.
- Giacoaia-Gripp CB, Sales AM, Nery JA, Santos-Oliveira JR, de Oliveira AL, Sarno EN, Morgado MG 2011. Evaluation of cellular phenotypes implicated in immunopathogenesis and monitoring immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV/leprosy cases. *PLoS One*, 6, e28735.
- Girão RJS US, Daolio A, Fleury RN, Opromolla DVA 2005. Tuberculoid Leprosy in AIDS patient. *An Bras Dermatol*, S360-363.
- Goodless DR, Viciano AL, Pardo RJ, Ruiz P 1994. Borderline tuberculoid Hansen's disease in AIDS. *J Am Acad Dermatol*, 30, 866-869.
- Graf von Ballestrem W, Alvarenga A, Namiki M 1992. Leprosy in HIV-positive and syphilitic young Paraguayan man. *Acta Leprol*, 8, 103-104.
- Hanna GJ, Hirsch MS 2005. Antiretroviral Therapy for Human Immunodeficiency Virus Infection. In G Mandell, R Douglas, J Bennet, R Dolin, *Principles and practice of Infectious Disease*. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, p. 1655- 1678.
- Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Franzblau SG 1988. Leprosy. *Clin Microbiol Rev*, 1, 330-348.
- Hogan CM, Hammer SM 2001. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med*, 134, 761-776.
- IBGE- Brazilian Institut of Geography and Estatistics 2010. 2010 population census. [accessed 29 April 2011]. Avaiable from: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/resultados>.

Imbiriba EN, Silva Neto AL, Souza WV, Pedrosa V, Cunha Mda G, Garnelo L 2009. Social inequality, urban growth and leprosy in Manaus: a spatial approach. *Rev Saude Publica*, 43, 656-665.

Inamadar AC, Palit A, Athanikar SB, Sampagavi VV, Deshmukh NS 2003. Generalized anetoderma in a patient with HIV and dual mycobacterial infection. *Lepr Rev*, 74, 275-278.

Jacob M, George S, Pulimood S, Nathan N 1996. Short-term follow up of patients with multibacillary leprosy and HIV infection. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 64, 392-395.

Jayasheela M, Sharma RN, Sekar B, Thyagarajan SP 1994. HIV infection amongst leprosy patients in south India. *Indian J Lepr*, 66, 429-433.

Jolliffe DS 1977. Leprosy reactional states and their treatment. *Br J Dermatol*, 97, 345-352.

Kahawita IP WS, Lockwood DN 2008. Leprosy type 1 reaction and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol*, 1, 75-82.

Karp CL, Auwaerter PG 2007. Coinfection with HIV and tropical infectious diseases. II. Helminthic, fungal, bacterial, and viral pathogens. *Clin Infect Dis*, 45, 1214-1220.

Kawuma HJ, Bwire R, Adatu-Engwau F 1994. Leprosy and infection with the human immunodeficiency virus in Uganda; a case-control study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 62, 521-526.

Kennedy C, Lien RA, Stolz E, van Joost T, Naafs B 1990. Leprosy and human immunodeficiency virus infection. A closer look at the lesions. *Int J Dermatol*, 29, 139-140.

Kerr-Pontes LR, Barreto ML, Evangelista CM, Rodrigues LC, Heukelbach J, Feldmeier H 2006. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. *Int J Epidemiol*, 35, 994-1000.

Kumar B DS, Kaur I 2004a. Epidemiological Characteristics of leprosy reaction: 15 years of experience from north India. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 2, 125-133.

Kumar B KI, Dogra S, Kumaran MS 2004b. Pure neuritic leprosy in India: an appraisal. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 3, 284-290.

Lamfers EJ, Bastiaans AH, Mravunac M 1987. Leprosy in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*, 11-12.

Lanjewar DN, Bhosale A, Iyer A 2002. Spectrum of dermatopathologic lesions associated with HIV/AIDS in India. *Indian J Pathol Microbiol*, 45, 293-298.

Lawn SD, Myer L, Bekker LG, Wood R 2007. Tuberculosis-associated immune reconstitution disease: incidence, risk factors and impact in an antiretroviral treatment service in South Africa. *Aids*, 21, 335-341.

- Lawn SD, Wood C, Lockwood DN 2003. Borderline tuberculoid leprosy: an immune reconstitution phenomenon in a human immunodeficiency virus-infected person. *Clin Infect Dis*, 36, e5-6.
- Leonard G, Sangare A, Verdier M, Sassou-Guesseau E, Petit G, Milan J, M'Boup S, Rey JL, Dumas JL, Hugon J, et al. 1990. Prevalence of HIV infection among patients with leprosy in African countries and Yemen. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 3, 1109-1113.
- Levis WR, Ernst JD 2005. *Mycobacterium leprae* (Leprosy, Hansen's Disease). In G Mandell, R Douglas, J Bennet, R Dolin, *Principles and practice of Infectious Disease* Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia. p. 2886-2896.
- Lienhardt C, Fine PE 1994. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? *Lepr Rev*, 65, 9-33.
- Lienhardt C, Kamate B, Jamet P, Tounkara A, Faye OC, Sow SO, Bobin P 1996. Effect of HIV infection on leprosy: a three-year survey in Bamako, Mali. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 64, 383-391.
- Lockwood D SH 1999. Pregnancy and leprosy: a comprehensive literature review. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1, 6-12.
- Lockwood DN, Vinayakumar S, Stanley JN, McAdam KP, Colston MJ 1993. Clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad, India. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 61, 8-15.
- Magalhães MCCR, L. I. 2007. Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil. *Epidemiol Serv Saude*, 16, 75-84.
- Manabe YC, Campbell JD, Sydnor E, Moore RD 2007. Immune reconstitution inflammatory syndrome: risk factors and treatment implications. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 46, 456-462.
- Meeran K 1989. Prevalence of HIV infection among patients with leprosy and tuberculosis in rural Zambia. *Bmj*, 298, 364-365.
- Mendiratta VR, Sharma RC, Sardana K, Koranne RV 2001. Smear positive leprosy with HIV infection, silent neuritis and extensive tinea corporis and tinea unguium in an Indian male. *Indian J Lepr*, 73, 349-352.
- Menezes VM, Sales AM, Illarramendi X, Miranda A, Goncalves Morgado M, Gutierrez-Galhardo MC, Nunes Sarno E, da Costa Nery JA 2009. Leprosy reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome: a case series of a Brazilian cohort. *AIDS*, 23, 641-643.
- Menezes VM, Sales AM, da Costa Nery JA, Illarramendi X, Miranda A, Gutierrez-Galhardo MC, Nunes Sarno E 2011. Reversal reaction as a manifestation of immune reconstitution

inflammatory syndrome. In Y-W Tang, *Recent translational research in HIV/AIDS*, In Tech, Rijeka, Croatia, p. 161-176.

Merson MH, Piot P 2005. Global perspectives on Human Immunodeficiency Virus Infection and acquired Immunodeficiency syndrome. In G Mandell, R Douglas, J Bennet, R Dolin, *Principles and practice of Infectious Disease*, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, p. 1465- 1476.

Milanga M, Kashala LO, Mbayo I, Yajima M, Yamada N, Mbowa KR, Asano G 1999. Brief survey of leprosy situation in Congo: sero-epidemiologic profile in correlation with some emerging viral infections. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*, 68, 109-116.

Montagnier L 2002. Historical Essay:A History of HIV Discovery. *Science*, 298, 1727-1728.

Moran CA, Nelson AM, Tuur SM, Luengu M, Fonseca L, Meyers WM 1995. Leprosy in five human immunodeficiency virus-infected patients. *Mod Pathol*, 8, 662-664.

Moreno-Gimenez IC, Valverde F, Rios JI, Logrono C, Rubio FL 2000. Lepromatous leprosy in an HIV-positive patient in Spain. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 14, 290-292.

Morgado MG, Barcellos C, Pina Mde F, Bastos FI 2000. Human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome and tropical diseases: a Brazilian perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95 Suppl 1, 145-151.

Moses AE, Adelowo KA, Ajayi BB 2003. Prevalence of HIV-1 infection among patients with leprosy and pulmonary tuberculosis in a semi-arid region, Nigeria. *J R Soc Health*, 123, 117-119.

Motta AC, Pereira KJ, Tarquinio DC, Vieira MB, Miyake K, Foss NT 2012. Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. *Clinics (Sao Paulo)*, 67, 1145-1148.

Munyao TM, Bwayo JJ, Owili DM, Ndinya-Achola JO, Kwasa TO, Kreiss JK 1994. Human immunodeficiency virus- 1 in leprosy patients attending Kenyatta National Hospital, Nairobi. *East Afr Med J*, 71, 490-492.

MS- Ministério da Saúde do Brasil 2013a. Registro ativo: número e percentual, Casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2012. [Cited 2013 oct 4]. Available from: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jul/16/tab_indicadores_epid_operacionais_2012.pdf

MS- Ministério da Saúde 2013b. Boletim Epidemiológico AIDS/DST. Ano I, N° 01, Dezembro 2012. [Cited 2013 oct 4]. Available from: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/52654/boletim_2012_final_pdf_14028.pdf

- MS- Ministério da Saúde do Brasil 2010. Orientações para uso de corticosteroides em hanseníase. [Cited 2013 oct 4]. Available from: <http://www.saude.gov.br/bvs>.
- Murdoch DM, Venter WD, Feldman C, Van Rie A 2008. Incidence and risk factors for the immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV patients in South Africa: a prospective study. *Aids*, 22, 601-610.
- Murdoch DM, Venter WD, Van Rie A, Feldman C 2007. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): review of common infectious manifestations and treatment options. *AIDS Res Ther*, 4, 9.
- Naafs B 1996. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Treatment of reactions and nerve damage. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 64, S21-28.
- Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN 1998. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 40, 363-370.
- Nery JAC, Garcia CC, Wanzeller SHO, Sales AM, Gallo MEN, Vieira L 1999. Características clínico-histopatológicas dos estados reacionais na hanseníase em pacientes submetidos a poliquimioterapia. *An. Bras. Dermatol*, 74, 27-33.
- Nery JAC, Salles AM, Illarramendi X, Duppre NC, Jardim MR, Miranda A 2006. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais: Uma abordagem prática. *An. Bras. Dermatol*, 81, 367-375.
- Olivares LM, Pizzariello GE, Benetucci J, Farina MH, Kien C, Btsh A 1994. Lepromatous leprosy and HIV infection. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 62, 295-296.
- Opmolla DV US, Fleury RN, Daher FC, Pagung R 1998. Reação hansênica tipo 1 ulcerada. *Hansen int*, 1, 5-13.
- Opmolla DVA, Tonello CJS, Fleury RN 2000. Hanseníase dimorfa e infecção pelo HIV (AIDS). *Hansen int*, 25, 54-59.
- Orege PA, Fine PE, Lucas SB, Obura M, Okelo C, Okuku P, Were M 1993. A case control study on human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection as a risk factor for tuberculosis and leprosy in western Kenya. *Tuber Lung Dis*, 74, 377-381.
- Pavie J, De Castro N, Molina JM, Flageul B 2010. Severe peripheral neuropathy following HAART initiation in an HIV-infected patient with leprosy. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*, 9, 232-235.
- Pearson JM, Ross WF 1975. Nerve involvement in leprosy--pathology, differential diagnosis and principles of management. *Lepr Rev*, 46, 199-212.
- Pereira GA, Stefani MM, Araujo Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1

subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am J Trop Med Hyg*, 71, 679-684.

Pereira Jr AC CJ, Azulay MM, Trope BM, Avé BRC, Carneiro SCS, et al 1992. O estudo da resposta imune em pacientes com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em relação ao antígeno de Mitsuda. *An Bras Dermatol*, 3, 97-102.

Picker LJ, Watkins DI 2005. HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol*, 6, 430-432.

Ponnighaus JM, Fine PE, Sterne JA, Malema SS, Bliss L, Wilson RJ 1994. Extended schooling and good housing conditions are associated with reduced risk of leprosy in rural Malawi. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 62, 345-352.

Ponnighaus JM, Oxborrow SM 1991. Counseling HIV positive leprosy patients. *Lepr Rev*, 62, 105.

Price P, Mathiot N, Krueger R, Stone S, Keane NM, French MA 2001. Immune dysfunction and immune restoration disease in HIV patients given highly active antiretroviral therapy. *J Clin Virol*, 22, 279-287.

Ranque B NV, Vu HT, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, et al 2007. Age is an important factor for onset and sequelae of reversal reaction in vietnamese patients with leprosy. *Clin Infect Dis*, 1, 33-40.

Rath N, Kar HK 2003. Leprosy in HIV infection: a study of three cases. *Indian J Lepr*, 75, 355-359.

Rea TH 1989. An overview of reactional states in Hansen's disease. *Star*, 49, 1-6.

Ridley DS 1974. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ*, 51, 451-465.

Ridley DS, Hilson GR 1967. A logarithmic index of bacilli in biopsies. I. Method. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 35, 184-186.

Ridley DS, Jopling WH 1966. Classification of Leprosy according to immunity. A five group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 34, 255-273.

Roche PW, Theuvenet WJ, Britton WJ 1991. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. *Lancet*, 338, 654-657.

Rose P, Waters MF 1991. Reversal reactions in leprosy and their management. *Lepr Rev*, 62, 113-121.

Sampaio EP, Caneshi JR, Nery JA, Duppre NC, Pereira GM, Vieira LM, Moreira AL, Kaplan G, Sarno EN 1995. Cellular immune response to Mycobacterium leprae infection in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infect Immun*, 63, 1848-1854.

- Sampaio EP, Duppre NC, Nery JA, Moreira AL, Sarno EN 1993. Development of giant reaction in response to PPD skin test in lepromatous leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 61, 205-213.
- Sarno EN, Illarramendi X, Nery JA, Sales AM, Gutierrez-Galhardo MC, Penna ML, Sampaio EP, Kaplan G 2008. HIV-M. leprae interaction: can HAART modify the course of leprosy? *Public Health Rep*, 123, 206-212.
- Sayal SK, Das AL, Gupta CM 1997. Concurrent leprosy and HIV infection: a report of three cases. *Indian J Lepr*, 69, 261-265.
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*, 19, 338-381.
- Scollard DM, Smith T, Bhoopat L, Theetranont C, Rangdaeng S, Morens DM 1994. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 62, 559-567.
- Sehgal VN, Srivastava G, Sundharam JA 1988. Immunology of reactions in leprosy. Current status. *Int J Dermatol*, 27, 157-162.
- Sekar B, Jayasheela M, Chattopadhyaya D, Anandan D, Rathinavel L, Vasanthi B, Subramanian M, Rao PS 1994. Prevalence of HIV infection and high-risk characteristics among leprosy patients of south India; a case-control study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 62, 527-531.
- Shelburne SA, Visnegarwala F, Darcourt J, Graviss EA, Giordano TP, White AC, Jr., Hamill RJ 2005. Incidence and risk factors for immune reconstitution inflammatory syndrome during highly active antiretroviral therapy. *Aids*, 19, 399-406.
- Sommerfelt H, Irgens LM, Christian M 1985. Geographical variations in the occurrence of leprosy: possible roles played by nutrition and some other environmental factors. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 53, 524-532.
- Sousa AL SM, Pereira GA, Costa MB, Rebello PF, Gomes MK, et al 2007. Mycobacterium leprae DNA associated with type 1 reaction in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampicin, ofloxacin and minocycline. *Am J Trop Med Hyg*, 5, 828-833.
- Souza WV, Barcellos CC, Brito AM, Carvalho MS, Cruz OG, Albuquerque MF, Alves KR, Lapa TM 2001. [Empirical bayesian model applied to the spatial analysis of leprosy occurrence]. *Rev Saude Publica*, 35, 474-480.
- Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, Martelli CT, Scollard DM 2009. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis*, 9, 75.
- Sterling TR, Chisson RE 2005. General clinical manifestation of Human Immunodeficiency Virus Infection (including the acute retroviral syndrome and Oral, Cutaneous, renal,

Ocular and cardiac Diseases). In G Mandell, R Douglas, J Bennet, R Dolin, *Principles and practice of Infectious Disease*, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, p. 1546-1566.

Swift TR, Sabin TD 1998. Neurological manifestations of leprosy. *The Neurologist* 21-30.

Talhari C, Mira MT, Massone C, Braga A, Chrusciak-Talhari A, et al 2010. Leprosy and HIV coinfection: a clinical, pathological, immunological, and therapeutic study of a cohort from a Brazilian referral center for infectious diseases. *J Infect Dis.*, 202, 345-354.

Thappa DM, Garg BR, Rao MV, Gharami R 1996. Impact of HIV infection on leprosy. *Indian J Lepr*, 68, 255-256.

UNAIDS- Joint United Nations Program on HIV/AIDS 2012. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012. [Cited 2013 oct 4]. Available from: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_with_annexes_en.pdf

Ustianowski AP, Lawn SD, Lockwood DN 2006. Interactions between HIV infection and leprosy: a paradox. *Lancet Infect Dis*, 6, 350-360.

van Beers SM, de Wit MY, Klatser PR 1996. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. *FEMS Microbiol Lett*, 136, 221-230.

Van Brakel WH KI, Lucas SB 1994. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west nepal. *Lepr Rev*, 3, 190-203.

van den Broek J, Chum HJ, Swai R, O'Brien RJ 1997. Association between leprosy and HIV infection in Tanzania. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 65, 203-210.

Vijayakumaran P, Manimozhi N, Jesudasan K 1994. Incidence of late lepra reaction among multibacillary leprosy patients after MDT. *Int. J. Lepr.*, 63, 18-22.

Vinay K, Smita J, Nikhil G, Neeta G 2009. Human immunodeficiency virus and leprosy coinfection in Pune, India. *J Clin Microbiol*, 47, 2998-2999.

Vreeburg AE 1992. Clinical observations on leprosy patients with HIV1-infection in Zambia. *Lepr Rev*, 63, 134-140.

Waters MF, Jacobs JM 1996. Leprous neuropathies. *Baillieres Clin Neurol*, 5, 171-197.

WHO- World Health Organization 2010. Global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy: plan period: 2011-2015, Geneva.

WHO- World Health Organization 2013. *Wkly Epidemiol Rec* 35: 365-380.

Wolday D, Berhe N, Britton S, Akuffo H 2000. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS*, 14, 921-929.

VIII- Anexos:

VIII.1. Reversal reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome: Capítulo de livro publicado no segundo ano de doutorado em pós graduação em Medicina tropical do IOC, em 2011, no livro Recent translational Research In HIV/AIDS (Menezes et al. 2011).

8

Reversal reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome

Vinicius Menezes, Anna Maria Sales, José Augusto Nery, Ximena Illarramendi, Alice Miranda, Maria Clara Galhardo & Euzenir Sarno
*Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation
Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation
Brazil*

1- Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease cause by the *Mycobacterium leprae*. The disease is found worldwide, especially, in countries situated in tropical and subtropical regions. According to the reports of the World Health Organization (WHO) the global registered prevalence of leprosy at the beginning of 2010 stood at 211,903 cases, whereas the number of new cases detected during 2009 was 244,796 (World Health Organization [WHO], 2010). Although there has been a declining trend in prevalence and detection of new cases, leprosy is still a public health problem in Brazil. In 2009, the prevalence rate of the disease was 1.99 per 10,000 habitants and 37,610 new cases of leprosy were detected in the entire country (Brazilian Ministry of Health, 2011). On the other hand, the Human deficiency Virus (HIV) infection is one of the greatest health problems of the world due to its pandemic nature and high morbidity and mortality rates. In the absence of treatment, the Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) usually leads to premature death. The World Health Organization estimates that 33.3 million people were living with HIV in the end of 2009 around the globe and 2.6 million people became HIV infected in 2009 (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS [UNAIDS], 2010). In Brazil, the AIDS epidemic has been maintained stable in the last few years. In 2009, the incidence rate was 20.1 per 100,000 habitants and 38,538 new cases of AIDS were registered in the country (Brazilian Ministry of Health, 2010). Although the prevalence rate of coinfecting individuals has never been estimated neither in Brazil nor worldwide, leprosy and the HIV infection seem to overlap in a number of countries, mainly in Africa and Asia continents.

As observed with others Mycobacterial infections, it has been speculated that HIV and *Mycobacterium leprae* coinfection could exacerbate the pathogenesis of leprosy lesions and/ or could lead to increased susceptibility of leprosy. However, up to date, HIV infection has not seemed to modify the epidemiology and the natural course of leprosy (Ustianowski et al., 2006). In contrast, initiation of anti-retroviral treatment has been reported to be associated with activation of sub-clinical *M. leprae* infection and exacerbation of existing leprosy lesions (Menezes et al., 2009).

It is well known that highly active anti-retroviral therapy (HAART) in HIV patients is associated with dramatic reduction of HIV viral load and subsequent increase in CD4 T lymphocytes and immune function. While the recovery of the immune system results in clinical benefits and decrease in the incidence of opportunistic diseases and death, a subset of patients experience clinical deterioration after HAART is initiated. This phenomenon is termed immune reconstitution inflammatory syndrome (Muller et al., 2010). This entity describes a collection of different inflammatory disorders which is associated with paradoxical worsening of symptoms and signs related to sub-clinical or preexisting infectious as well as of non infectious processes following HAART introduction (Hirsch et al., 2004). IRIS seems to result from dysfunction of some aspects of the immune system that affect the restoration of pathogen specific immune response and/ or immune regulation (French, 2009). The immunopathology of IRIS is poorly understood but it seems to be highly determined by the provoking pathogen. In this way, inflammation in Mycobacterial infections is often associated with characteristics of a TH1 immune response (French et al., 2009). The sudden clinical deterioration associated with IRIS can be at times fatal and

needs prompt intervention (Murdoch et al., 2007). The incidence of IRIS is not well known but it has been described ranging from less than 10% to more than 50% (Muller et al., 2010).

Some evidences suggest that antiretroviral therapy can accelerate the onset of leprosy symptoms. In a retrospective cohort study, Sarno et al has demonstrated that in those individuals who initiated HAART the length of time covered up to leprosy diagnosis was significantly shorter than in those not receiving HAART ($p=0,01$) (Sarno et al., 2008). In another study, in the Amazon region of Brazil, seven patients out of 25 presented leprosy as manifestation of IRIS (Talhari et al., 2010). One study, in French Guyana, has observed that the incidence of leprosy was higher in HIV patients receiving HAART for less than 3 months than in HIV untreated patients (13 against 0,7 per 1,000 person-year, $p=0,02$) (Couppié et al., 2009). Another study, in India, has found a high incidence of leprosy of 5.22 per 1,000 person-year in HIV patients on HAART (Vinay et al., 2009). Several case reports of leprosy associated with IRIS have been published in the literature (Martiniuk et al., 2007; Chow et al., 2009), including one of histoid leprosy case (Bumb et al., 2010).

Currently, it is widely accepted that the reconstitution of the immune function observed in HIV patients on HAART can trigger leprosy reaction. Leprosy reactions are immune-inflammatory events that complicate the disease. The frequency of reaction has been reported to range from 2.6% to 20% of PB patients (Becx-Bleumink & Berhe, 1992) and from 15% to 60% of MB cases (Bwire R & Kawuma HJ, 1994; Nery JAC et al., 1998). It is broadly accepted that reaction is the result of a shift in the patient's level of inflammation and/or cell-mediated immunity which, in turn, leads to accelerated nerve damage and serious physical disabilities (Sarno et al., 2008). It is frequently observed during multidrug therapy (MDT), but it may be developed before or after leprosy treatment. These reactional states are classified as type 1 (Reversal Reaction) or Type 2 (Erythema Nodosum Lepromatosum) reaction depending on the clinical characteristics of the acute episode and its immune background. Strong evidences currently indicates that reversal reactions are the result of an enhancement of cellular immunity and delayed hypersensitivity to *M. leprae* antigens, but both the precipitating factors and the physiopathological mechanisms involved remain ill-defined (Scollard et al., 2006). Reversal reaction is clinically characterized by the worsening of previous leprosy lesion or appearance of new infiltrated, erythematous plaques. It may be accompanied by neuritis or systemic symptoms such as fever, malaise, arthralgia, or edema.

Since HAART for AIDS treatment has become available in countries where leprosy is endemic, around 41 cases of leprosy reaction associated to IRIS have been described in the literature (Tables 1 and 2) (Pavie et al., 2009). It is worth to notice that the majority of the patients were paucibacillary (65,8%) and most of them (90,2%) developed reversal reaction with only 4 cases of Erythema nodosum leprosum published (Tables 1 and 2). The mean time that patients developed reaction after initiation of HAART was 18.95 (4-172) weeks (median:8, Mode:8, standard deviation:31,1)(Tables 1 and 2). Twenty three (56.09%) of the cases were from Brazil (Pereira et al., 2004; Visco-Comandini et al., 2004; Trindade et al., 2005; Talhari et al., 2007; Caruso et al., 2007; Batista et al., 2008; Deps et al., 2008 & Menezes et al., 2009), 13 (31.7%) from India (Narang et al., 2005; Singal et al., 2006; Kharkar et al., 2007; Kar et al., 2009 & Vinay et al., 2009), 3 (7.31%) from Haiti (Couppié et al., 2004 & Pavie et al., 2009), 1 (2.43%) from Uganda (Lawn et al., 2003) and 1(2.43%) from French Guiana (Couppié et al., 2004). Thirty one (75.6%) patients were man and 10 (27.3%) women. Twelve (27.3%) cases presented neuritis associated to reaction (Tables 1 and 2).

References	Leprosy/ Reaction Types	Weeks on HAART	CD4 Cell/ μ l		Viral load/MI	
			HIV	IRIS	HIV	IRIS
(Lawn et al., 2003)	BT + RR	4	10	70	120,000	1,000
(Couppie et al., 2004)	BB + RR	6	87	257	19,000	650
	BT + RR + N	8	130	278	40,701	68
	BT + RR + N	12	31	171	62,700	50
	BT + RR	8	73	270	NA	NA
(Pereira et al., 2004)	BT + RR	24	35	100	NA	NA
	BT + RR	8	7	90	NA	NA
(Visco-Comandini et al., 2004)	BT + RR	8	7	90	NA	NA
(Narang et al., 2005)	BT + RR	8	125	280	150,000	1,750
(Trindade et al., 2005)	BB+ RR	24	87	NA	<80	NA
	BB+ RR+N	4	223	NA	NA	NA
	BT+ RR	8	430	NA	NA	NA
	I +RR	8	NA	NA	<400	NA
	BL + RR+N	4	108	224	NA	NA
(Singal et al., 2006)	BT + RR	12	299	504	NA	NA
(Kharkar et al., 2007)	BT + RR	8	114	184	NA	NA
	BT + RR+N	12	92	426	NA	8,300
(Talhari et al., 2007)	BT + RR+N	12	92	426	NA	8,300
(Caruso et al., 2007)	BT+ RR	16	NA	57	NA	< 80
(Batista et al., 2008)	BT + RR+N	8	14	172	21,300	69,000
	BT + RR+N	8	104	235	NA	<80
(Deps et al., 2008)	BT + RR	10	33		6,310	NA

BT + RR	4	170	9,230	NA
---------	---	-----	-------	----

Table 1: Characteristics of 21 cases of leprosy reactions associated with immune reconstitution inflammatory syndrome published in literature until 2008:

Abbreviations: BT= Tuberculoid borderline; BB= Borderline borderline; BL= Lepromatous borderline; RR= Reversal reaction; N= Neuritis; NA= Not available.

References	Leprosy/ Reaction Types	Weeks on HAART	CD4 Cell/ μ l HIV	IRIS	Viral load/MI HIV	IRIS
(Menezes et al., 2009)	BT+ RR	4	142	499	300	<80
	BB+ RR	4	37	200	53,000	2,200
	BT+ RR	8	NA	226	NA	<80
	BT+ RR	10	62	226	NA	<80
	BT+ RR + N	4	85	190	5,700,000	140
	BB+ RR	8	179	271	39,000	<80
	BB+ RR	4	160	140	77,204	4,880
	BT+ RR	16	76	215	180,000	<80
	BB+ RR	4	NA	408	NA	<80
	BT+ RR	16	NA	171	14,000	<80
(Kar et al., 2009)	BT+RR	7	125	333	NA	NA
(Pavie et al., 2009)	MB+RR+N	40	25	110	100,000	<80
(Vinay et al., 2009)	MB+ENL	172	177	892	NA	NA
	MB+RR+N	32	75	170	NA	NA
	PB+RR+N	24	85	251	NA	NA
	MB+ENL	8	99	99	NA	NA
	MB+ENL	112	124	239	NA	NA
	MB+ENL+N	16	31	144	NA	NA
	PB+RR	64	331	374	NA	NA
	PB+RR	20	174	436	NA	NA

Table 2: Characteristics of 20 cases of leprosy reactions associated with immune reconstitution inflammatory syndrome published in literature in 2009. Abbreviations: BT= Tuberculoid borderline; BB= Borderline borderline; BL= Lepromatous borderline; RR= Reversal reaction; N= Neuritis; ENL= Erythema nodosum lepromatosum; NA= Not available.

In the present series, the highest casuistic published so far, 12 cases of leprosy reaction as manifestation of IRIS are thoroughly described in order to establish clinical and immunological parameters of definition.

2- Subjects and Methods

2.1- Study design and inclusion criteria

The Leprosy Laboratory and the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, have been evaluating coinfecting HIV/*M. leprae* patients since 1989. Both institutions are reference centers in Rio de Janeiro for these diseases and so far, a total of 100 patients have been followed.

For the purpose of this study, we have reviewed the charts of all patients coinfecting with *M. leprae* and HIV who were referred to the Leprosy laboratory/Fiocruz and the IPEC between 1997 and 2010. Inclusion criteria were based on the definition criteria proposed by French et al (French et al., 2004). Thus, reversal reaction as a manifestation of IRIS was defined as the presence of reaction any time during the first 6 months of HAART associated to decrease >1 log in HIV-1 viral load. In addition, it was defined in HAART naïve patients with no previous laboratory tests data (Viral load or CD4 lymphocytes count), if reaction was present during the first 6 months after initiation of HAART associated to undetectable HIV-1 viral load.

Since the introduction of HAART for AIDS treatment by the Brazilian government in 1997 until the year of 2010, 33 patients had leprosy reaction under HAART, 12 of which were diagnosed with IRIS and were grouped into the case series presented in the present study.

Case reports of 10 of these patients have been published (Menezes et al., 2009) but additional data was obtained and as they are part of the cohort studied they were maintained to compose the present case series.

2.2- Definitions and clinical routine

All patients followed the clinic routine dermatological and neurological evaluation. For diagnostic purposes, skin biopsies were obtained by punch. Samples were routinely processed, paraffin embedded, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Wade's modification of the Ziehl-Nielsen method for detection of acid-fast bacilli (2 sections of each staining). Slit skin smears were obtained from six body sites (one from each earlobe, one from each elbow, one from a lesion and one from the contra-lateral knee). The smears were stained for acid-fast

bacilli (AFB) by Ziehl-Neelsen techniques. The bacilloscopic index (BI) was calculated using the Ridley & Jopling logarithmic scale (Ridley & Jopling, 1966), based on analysis of 100 fields. The lepromin test was measured 30 days after the intradermal injection of 0.1 mL of heat-killed *M. leprae* in the anterior forearm. The result was either scored as negative if <5 mm, or positive if ≥5 mm. Leprosy was then diagnosed and classified according to Ridley-Jopling criteria (Ridley & Jopling, 1966). The diagnosis of reversal reaction was histopathologically defined on the presence of epithelioid cells granuloma. In this study we identified two main patterns of reversal reaction depending on the severity of the tissue inflammatory changes (Ridley 1969):

- mild acanthosis and exocytosis; well developed cohesive epithelioid granulomas intermingled with few lymphocytes; blood vessels, arrector pili muscles, adnexa and nerve bundles; sparse multinucleated cells and small foci of red blood cell extravasation.
- Exuberant changes as moderate to severe acanthosis, spongiosis and exocytosis; epithelial apoptosis and basal epidermal erosion; severe dermal inflammatory infiltration, including granulomas dissociated by marked edema or centered by necrosis, as well as numerous giant cells and red blood cell extravasation.

All the patients were treated for leprosy with multidrug therapy. Reversal reaction was treated following recommendations of the Brazilian Ministry of Health, with a daily morning dose of prednisone, starting with 1mg/kg for 1 month, followed by a 10mg/month progressive reduction.

Diagnosis of HIV infection followed the Brazilian Ministry of Health regulations, which include the performance of two tests; the immune-enzymatic method (ELISA) plus immune-fluorescence or Western Blot (National STD/AIDS program of Brazil, 2008). The CD4 cell count and viral load were determined around the time of HIV diagnosis and again around the time of leprosy diagnosis (defined as the first time the patient visited a health center with signs of leprosy). HAART was started at CD4 cell count of less than or equal to 200 cells/μL or if an opportunistic infection was diagnosed (National STD/AIDS program of Brazil, 2008). To control the HIV infection, the patients were submitted to periodical clinical evaluation and routine laboratory tests. The exchange of information related to the evolution of both infections is a routine at the Units, and remained under the responsibility of the professionals involved in the study.

2.3- Data collection and statistical analysis

Pertinent data were collected from the patient charts at both institutions. All analysis were performed using SPSS 16.0. The difference of the CD4 lymphocytes count and HIV viral load before and at the onset of reversal reaction associated with IRIS was analysed by the Wilcoxon test.

2.4- Ethical concerns

The study was approved by the ethics committee of the Oswaldo Cruz Institute and the IPEC.

3- Results

Among the total 33 patients experiencing leprosy reversal reaction under HAART, 12 (36.3%) met the predetermined IRIS criteria. Demographic, clinical and laboratory data of these 12 patients are presented in Table 3 (Figure 1). Ten patients were initially diagnosed with HIV infection. Significantly, HAART induced reaction in nine patients who had not been diagnosed with leprosy. All but one patient received standard treatment for reaction with a daily oral dose of prednisone. Five patients needed prolonged use of prednisone for up to 12 months (Table 3).

Case	Age/Sex	Leprosy/ reaction types	Lesion number/ complication	Lepromin test (mm)	BI	Time in prednisone (months)
1	48/M	BT/RR	2/ none	12	0	0
2	33/F	BB/RR	>20/ ulcer	10	0.5	9
3	39/M	BT/RR	>10/ulcer	6	0	12
4	34/M	BT/RR	>20/none	0	0	8
5	28/M	BT/RR + N	>20/none	0	0	10
6	46/M	BB/RR	1/none	12	0.57	11
7	22/M	BB/RR	>20/none	0	2.25	
8	28/M	BT/RR	1/ulcer	9	0	6
9	22/F	BB/RR	2/none	0	0.5	2
10	54/M	BT/RR	>20/none	0	0	0
11	27/M	BT/RR	>20/ulcer	NA	0	6
12	M	BB/RR	>10/none	10	0.57	9

Table 3. Clinical and epidemiological data of 12 patients with defined IRIS. BT= Borderline Tuberculoid, BB= Borderline Borderline, RR= reversal reaction; N=Neuritis

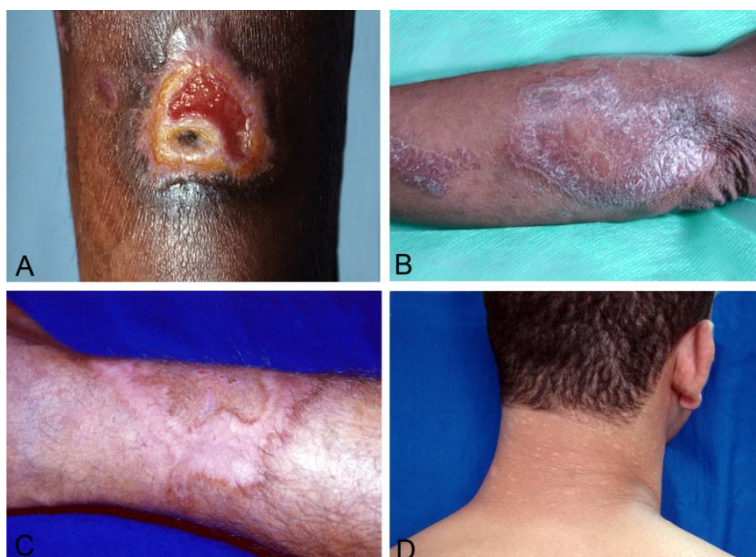


Figure 1: Clinical pattern of reversal reaction skin lesions.

1A - Clean, ulcerated plaque with well-defined borders. 1B - Infiltrated and erythematous plaques with a scaly surface and irregular borders. 1C - Erythematous, queloid-like plaque with small central ulcerations. 1D - Disseminated urticariform lesions of various sizes.

The clinical or laboratory findings of all patients showed immune suppression prior to reversal reaction diagnosis. However, only 5 patients had opportunistic infection, namely pneumocystosis, esophageal candidiasis, neurotoxoplasmosis and disseminated tuberculosis. Moreover, by the time reaction occurred during HAART treatment, most of the patients had an increase of the CD4/CD8 T lymphocyte rate, mainly due to increase of CD4 cell count mean of 204.5 cells/ μ L (92-446cells/ μ L) (Table 4) (Figure 2). Nine patients had an undetectable viral load when reaction developed and three had a mean viral load reduction of 2.4 log (1.4 - 4.6 log) (Table 4) (Figure 2). All patients were treated for HIV with regimens containing two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in combination with a protease inhibitor (8.33%), a boosted protease inhibitor (33.33%), or a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (58.33%) (Table 4). The mean time the patients presented reversal reaction after starting HAART was 7.8 weeks (Table 4).

All patients presented erythematous infiltrated plaques and were in the borderline spectrum of leprosy. Four patients had complicated ulcerated lesions (figure 1A & 1C) (Table 3). The histopathological features observed in all the skin biopsies were fulfilled the patterns described for the diagnosis of reversal reaction with tissue severity (figure 3), ranging from heavy infiltration, foci of necrosis and extensive involvement of the epidermis (figure 3C & 3D), to moderate cellular infiltration with well-formed granulomas (figure 3A & 3B) (Table 5). There was evidence of fragmented acid-fast bacilli in 6 skin biopsies (Table 5). Two samples (cases 1 and 11) showed unusually extensive multinucleated cells permeating the granulomas (Table 5). The biopsy of patient 2 had heavy dermal edema and marked inflammatory infiltration, including some polymorphonuclear leukocytes and many foci of necrosis. Initially, these features led to a mistaken diagnosis of *erythema nodosum leprosum*. After a clinical and histopathological review, reversal reaction superimposed to a multibacillary background was established.

Case	HAART regimen	Weeks on HAART	CD4 Cell/ μ l		Viral load/MI	
			HIV	IRIS	HIV	IRIS
1	AZT+3TC+NFV	4	142	499	300	<80
2	AZT+ DDI+EFVZ	4	37	200	53,000	2,200
3	AZT+ DDI+EFVZ	8	NA	226	NA	<80
4	D4T+ 3TC+ NVP	10	62	226	NA	<80
5	D4T+3TC+LPV/ RTV	4	85	190	5,700,000	140
6	AZT+3TC+LPV/ RTV	8	179	271	39000	<80
7	TDF+ 3TC+ATV/ RTV	4	160	140	77,204	4880
8	AZT+ 3TC+EFVZ	16	76	215	180,000	<80
9	AZT+3TC+LPV/ RTV	4	NA	408	NA	<80
10	D4T+ 3TC + EFVZ	16	NA	171	14000	<80
11	AZT+3TC+EFVZ	12	03	173	407,800	<80
12	AZT+3TC+EFVZ	4	125	571	321,560	<80

Table 4. Laboratory data of the 12 patients with reversal reaction and defined IRIS Abbreviations: NA= not available. AZT= Zidovudine; 3TC= Lamivudine; D4T= Stavudine; DDI= Didanosine; TDF: Tenofovir, NVP= Nevirapina; EFVZ= Efavirenz, NFV= Nelfinavir; ATV/RTV= Atazanavir/ Ritonavir; LPV/RTV= Lopinavir/Ritonavir.

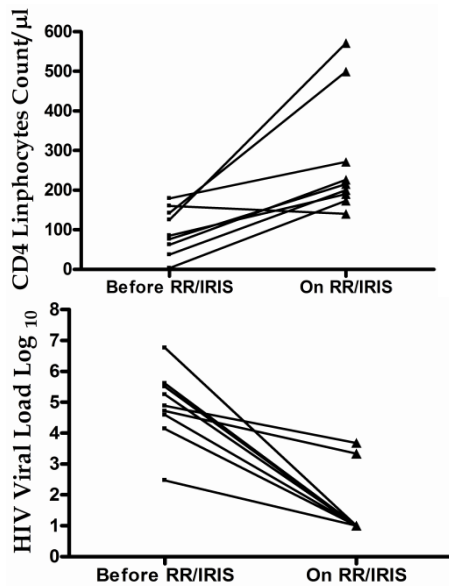


Figure 2: Longitudinal analysis of CD4 lymphocytes count and HIV viral load before and at the onset of reversal reaction/IRIS. The mean increase of the CD4 cells count and the mean decrease of the HIV viral load were significant ($p=0,007$ and $p=0,003$, respectively).

Case	AFB (ILB)	Granuloma Giant cells ^a	lymphocyte	necrosis ^b	Severeness
1	0	+++	20%	+	Severe
2	2.6	++	20%	++	Severe
3	0	+	15%	+	Severe
4	1	-	30%	+	Severe
5	3	-	20%	-	Mild
6	0	+	30%	-	Mild
7	2.8	+	20%	-	Mild
8	0	+	20%	-	Mild
9	0	+	20%	++	Severe
10	1.9	++	19%	+	Severe
11	0	+++	25%	++	Severe
12	1	++	20%	-	Severe

Table 5. Histopathological data of the 12 patients with reversal reaction and defined IRIS patients. In relation to control. Symbols: a) + = few, ++ = several, +++ = many, -=not observed; b) + = little, ++ = moderate, -=not observed.

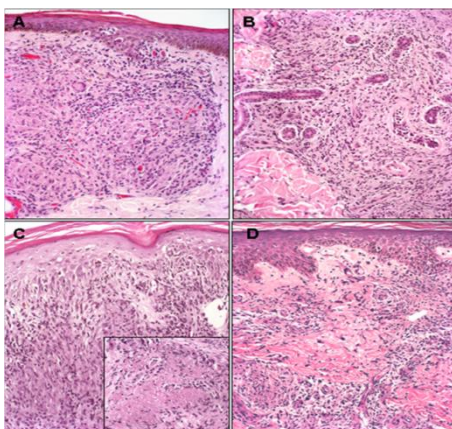


Figure 3: Histopathological patterns of skin lesions in IRIS patients
 A. Epidermis with intraepithelial lymphocytes and apoptosis; dermis showing cohesive tuberculoid granulomas with multinucleated giant cells in RR (pat. 6); B. Angled epithelioid granuloma dissociating adnexa in RR (pat. 5); C, D. Severe epidermal changes, dermal edema, and epithelioid granulomas with foci of necrosis (inset) in RR type D (pat. 9 and 2, respectively; H&E, original magnification, X200).

4- Discussion

As observed in the present case series, in the HAART era, leprosy reaction associated with IRIS appears to be a frequent event in coinfecting patients. The 36% reversal reaction rate in coinfecting patients undergoing HAART is similar to that estimated for tuberculosis as a manifestation of IRIS (French, 2009). Interestingly, HAART triggered reversal reaction in 88% of the patients not previously known to have leprosy. As likewise seen in the literature (Table 1 and 2), most of the present IRIS cases associated to leprosy had the predominantly borderline-tuberculoid form. The borderline forms are considered the most unstable in that the immunological capability of the patient to restrain the infection is only partial. During reversal reaction, high amounts of inflammatory cytokines such as interferon gamma and tumor necrosis factor are produced, reflecting the immune activation characteristics of skin lesions with a tuberculoid pattern (Nery et al., 2000).

Although the moment of infection for either HIV or leprosy is difficult to establish, most of the patients were first diagnosed with HIV. In the present case series the period of time elapsed between HAART introduction and leprosy reaction was variable but similar to previously described in the literature, which ranges from 4 to 24 weeks (Hirsch et al., 2004). In HIV negative individuals, reversal reaction usually occurs during the initial months of multidrug therapy. As recently reported, the diagnosis of leprosy is associated with improved immune status in HIV infected individuals (Sarno et al., 2008). The appearance of clinical signs of *M. leprae* infection in the form of reversal reaction observed in this series and in published case reports is not a manifestation of immune suppression but rather of immune reconstitution. This is further supported by the presence of a positive lepromin test in some of the multibacillary patients.

Among the risks factors associated to the development of IRIS, male gender (Shelburne et al., 2005), young age (Ratnam et al., 2006), and immune suppression (Shelburne et al., 2005; Ratnam et al., 2006) were also observed in the present series. Other risk factors, such as short interval between initiating treatment for opportunistic infection (OI), a rapid fall in HIV-1 RNA after HAART, and being ART naïve at the time of OI diagnosis were observed in most of the patients (Shelburne et al., 2005). Additional significant predictors include a lower baseline CD4 cell percentage, a lower CD4 cell count at ART initiation, and a lower CD4 to CD8 cell ratio at baseline were observed in a few cases (Ratnam et al., 2006). In the same way, a higher baseline CD8 cell count is associated with IRIS as CD8 cell counts represent the presence of immune activation [29, 36, 37] (Ratnam et al., 2006) (Robertson et al., 2006) (Cianchetta-Sivori et al., 2007). In a case control study, the nadir CD4 T count of less than 100 cells was independently predictive of development of IRIS as well as the absolute drop in viraemia positively correlated with increasing risk for IRIS (Manabe et al., 2007). In this series, 5 cases had less than 100 CD4+ cells/ μ L.

Absolute CD4 T cell increase was observed in most patients, but in 1 patient a cell count decrease was observed. As recently described, absolute CD4 T cell increase is not present in all cases of IRIS (French et al., 2004; Shelburne et al., 2006). Approximately 10% of IRIS complicated MAC infection occurred in the absence of an increase of CD4 T cells count (Manabe et al., 2007). Robertson *et al* suggested to remove an increase CD4 cell count as a sole criterion of IRIS, because CD4 lymphocyte plasma levels do not necessary reflect function (Robertson et al., 2006). Immune responses may be restored before a rise in plasma CD4 cell count is detected. They proposed that an increase in CD4 T cell count should be viewed as supportive of diagnosis rather than required for it.

Manabe *et al* suggested that the use of the most potent regimens (boosted protease inhibitors [BPIs] and/or non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors [NNRTIs]) is an independent risk factor for the development of IRIS (Manabe et al., 2007). In particular, the use of BPIs was associated with IRIS. All of the patients but one, in the present series, were using either one or more of these drugs. In addition, HAART induced reduction of 2.5 logs RNA levels has shown the highest risk of IRIS (Manabe et al., 2007). In the present study, a similar log reduction was observed in the cases with viral load data.

The pathogenesis of IRIS remains speculative. Current theories involve the combination of underlying antigen burden, the degree of immune restoration, as well as the host genetic susceptibility (Price et al., 2001). According to Murdoch, the antigenic stimulus can be intact, "clinically silent" organism or dead or dying organism and their residual antigens (Murdoch et al., 2007). A common feature of the cases of IRIS is that clinical presentation of the opportunistic infection is often atypical compared with that usually observed in HIV-1 infected patients (French et al., 2004). On the other hand, the pathogenesis of reversal reaction is still not completely understood. Restoration of the *M. leprae* specific immune response has been claimed, but convincing data are lacking. During reversal reaction, high amount of inflammatory cytokines are produced reflecting the immune reactivation of the skin lesions with tuberculoid pattern (Sampaio et al., 1995; Krutzik et al., 2005).

Among the various risk factors described for reversal reaction are concomitant infections, immunization, and pregnancy (Nery JA et al., 1998). In addition, in the present case series, HAART triggered reversal reaction in 88% of the patients not previously known to have leprosy. Different from initially expected HIV infection *per se* did not modify the course of the disease, but immune restoration by HAART does appear to worsen reversal reaction. In the present series, some patients had numerous lesions and ulcers and needed extended corticoid therapy, demonstrating a more intense inflammatory process. Such pattern could explain the profound scars left by the reversal reaction lesions that are not observed in non HIV patients. This type of presentation with numerous skin lesions and ulcerations is more usually seen in type II leprosy reactions which are more frequent in multibacillary

patients and was never referred in the context of IRIS. On the other hand, patients with tuberculoid forms which display strong cellular response to *M. leprae*, usually have neuritis. Surprisingly, only one patient in this series was diagnosed with neuritis. The histological findings observed in all patients were typical of reversal reaction (Ridley & Radia, 1981) even in those presenting AFB+ biopsies. Disorganized and disperse granulomas could be seen in some cases, thus rendering difficult to classify those patients according to the leprosy spectrum (cases 2, 5 and 9). The presence of necrosis only occurred in severe reactions, either in small foci or causing liquefaction of the granuloma, followed by fibrosis as in case 3, leaving profound scars. In some other cases, however, the granulomas take typical tuberculoid characteristics, with cohesive epithelioid cells surrounded by a lymphocytic halo. The presence of low number of AFB has already been described in borderline tuberculoid lesions (Ridley & Jopling, 1966).

Treatment of complications due to IRIS in other coinfections is frequently necessary to minimize short-term morbidity but in the long-term follow-up, outcome appears to be good (Murdoch et al., 2007; Riddell et al., 2007). In the present series the patients were treated with prednisone as standard for reversal reaction, and had a favorable evolution in spite of the severity of disease or the need of a short extension of the use of corticoids. Prednisone is the drug of choice for treating reversal reaction because it reduces nerve edema, exerts an immunosuppressive effect, and decreases post-inflammatory scar formation (Naafs 1996; Andersson et al., 2005). Thus, no modification of the standard therapy for reversal reaction is needed in case of IRIS in leprosy patients.

5- Conclusions

The present is the largest case series of reversal reaction associated with IRIS in coinfecting patients described in the literature. In countries like Brazil, where both epidemics overlap and HAART has been broadly administered, leprosy reaction associated to IRIS is prone to occur. It might be posited, therefore, that the appearance of clinical signs of *M. leprae* infection in HIV-infected individuals is not a manifestation of immunosuppression but rather of immune reconstitution. In the present series, the patients treated with prednisone as standard reversal reaction therapy had a favorable evolution despite disease severity. Thus, the results of this study clearly indicate that no modification of the standard reversal reaction therapy appears necessary in the case of leprosy patients with IRIS. However, there is still need of prospective studies to evaluate the association of leprosy reactions and IRIS in order to better characterize the pathology and immunology of the coinfection.

6- Acknowledgment

We would especially like to thank Dr. Mariza Morgado and Dr. Thais Porto Amadeu.

7- References

- Andersson AK, Chaduvula M, Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Jain S, Sunnetha L, Suneetha S & Lockwood DN. Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. *Infection and Immunity*, Vol. 73, No.6, (June 2005), pp.3725-3733, ISSN: 0019-9567.
- Batista MD, Porro AM, Maeda SM, Gomes EE, Yoshioka MCN, Enokihara MMSS & Tomimori J. (2008). Leprosy reversal reaction as immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with AIDS. *Clinical infectious disease*, Vol.46, No.6, (March 2008), e56-60, ISSN:1537-6591.
- Becx-Bleumink M & Berhe D. (1992). Occurrence of reaction, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience of leprosy control program of the All-Africa leprosy and rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. *International journal of leprosy and other mycobacterial disease*, Vol. 60, No.2, (June 1992), pp. 173-184, ISSN:0148-916X.
- Brazilian Ministry of Health, 2010. Boletim epidemiológicos AIDS/DST: versão preliminar. Brazilian Ministry of Health. Retrieved from http://www.aids.gov.br/sites/default/files/publicacao/2010/boletim2010_preliminar_pdf_34434.pdf
- Brazilian Ministry of Health. (2011). Distribuição da hanseníase no Brasil, In: *Portal Saúde*, 03/13/2011, Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31200.
- Bumb RA, Ghiya BC, Jakhar R & Prasad N. (2010). Histoid leprosy in a HIV positive patient taking cTARV. *Leprosy review*, Vol. 81, No. 3, (September 2010), pp. 221-223, ISSN:0305-7518.
- Bwire R & Kawuma HJ. (1994). Type 1 reactions in leprosy, neuritis and steroid therapy: the impact of the human immunodeficiency virus. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, Vol. 88, No.3, (May 1994), pp. 315-316, ISSN:0035-9203.
- Caruso RL, Fernandes RM, Serra MS, Lima RB & Martins CJ. (2007). Atypical reversal reaction in a borderline leprosy patient co-infected with HIV. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Vol.82, No.6, (November 2007), pp. 553-557, ISSN:0365-0596.
- Cianchetta-Sivori M, Raso S, Fernandez-Guerrero M, Gorgolas M, Garcia R. (2007). Do CD8(+)CD25(+) cells predict immune reconstitution syndrome in HIV-positive patients who begin HAART? *AIDS*, Vol.21, No.17, (November 2007), pp.2347-2349, ISSN: 0269-9370.
- Chow D, Okinaka L, Souza S, Shikuma C & Tice A. (2009). Hansen's disease with HIV: a case of immune reconstitution disease. *Hawaii Medical Journal*, Vol.68, No.2, (March 2009), pp. 27-29, ISSN:0017-8594.

- Couppié P, Abel S, Voinchet H, Roussel M, Hélénon R, Huerre M, Sainte-Marie D & Cabié A. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with HIV and leprosy. *Archives of Dermatology*, Vol.140, No.8,(August 2004),pp.997-1000, ISSN:0096-5359
- Couppié P, Domergue V, Clyti E, Guedj ME, Vaz T, Sainte-Marie D, Marty C & Nacher M. (2009). Increased incidence of leprosy following HAART initiation: a manifestation of the immune reconstitution disease. *AIDS*, Vol.23, No.12, (July 2009), pp. 1599-1600, ISSN: 0269-9370.
- Deps PD, Gripp CG, Madureira BP, Lucas EA. (2008). Immune reconstitution syndrome associated with leprosy: two cases. *International Journal of STD & AIDS*, Vol.19, No.2, (February 2008), pp.135-136, ISSN:0956-4624.
- French MA, Price P, Stone SF. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS*, Vol. 18, No. 12,(August 2004), pp.1615-1627, ISSN: 0269-9370.
- French MA. (2009). Immune reconstitution inflammatory syndrome: a reappraisal. *Clinical infectious disease*, Vol.48, No 1, (January 2009), pp.101-107, ISSN: 1058-4838.
- Hirsch HH, Kaufmann G, Sendi P, Battegay M. (2004).Immune reconstitution in HIV-infected patients. *Clinical Infectious Disease*, Vol. 38, No 8, (April 2004), pp.1159-1166, ISSN: 1058-4838.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2010. *Global report: Unaided report on the global AIDS epidemic 2010*.UNAIDS. Retrieved from <http://www.unaids.org/globalreport/>
- Kar HK, Sharma P & Bhardwaj M. (2009). Borderline tuberculoid leprosy with upgrading type 1 reaction in a HIV seropositive patient, after antiretroviral therapy: an immune reconstitution inflammatory syndrome. *Leprosy review*, Vol.80, No.1, (March 2009), pp.85-88, ISSN: 0305-7518.
- Kharkar V, Bhor UH, Mahajan S, Khopkar U. (2007). Type I lepra reaction presenting as immune reconstitution inflammatory syndrome. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprosy*, Vol. 73, No.4 , (July 2007),pp.253-256, ISSN:0378-6323.
- Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, Graeber TG, Sieling PA, Liu YJ, Rea TH, Bloom BR & Modlin RL.(2005). TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nature Medicine*, Vol.11, No. 6,(June 2005), pp.653-660, ISSN:1078-8956.
- Lawn SD, Wood C, Lockwood DN. Borderline tuberculoid leprosy: an immune reconstitution phenomenon in a human immunodeficiency virus-infected person. *Clinical Infectious Disease*, Vol.36, No 1,(January 2003), e5-6, ISSN:1537- 6591.
- Manabe YC, Campbell JD, Sydnor E, Moore RD. (2007). Immune reconstitution inflammatory syndrome: risk factors and treatment implications. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, Vol.46, No.4, (April 2007), pp.456-462, ISSN:1525-4135.
- Martiniuk F, Rao SD, Rea TH, Glickman MS, Giovinazzo J, Rom WN, Cabrera A & Levis WR. (2007). Leprosy as immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-positive persons. *Emerging infectious disease*, Vol.13, No.9, (September 2007), pp. 1438-1439, ISSN:1080-6059.
- Menezes VM, Sales AM, Illarramendi X, Miranda A, Morgado MG, Gutierrez-Galhardo MC, Sarno EM & Nery JAC (2009). Leprosy reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS*, Vol.23, No.5, (March 2009), pp.641-643, ISSN:0269-9370.
- Muller M, Wandell S, Colebunders R, Attia S, Furrer H & Egger M (2010). Immune reconstitution inflammatory syndrome in patients starting antiretroviral therapy for HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet infectious disease*, Vol.10, No.4, (April 2010), pp. 251-261, ISSN:1473-3099.
- Murdoch DM, Venter WD, Van Rie A, Feldman C (2007). Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): review of common infectious manifestations and treatment options. *AIDS Research Therapy*, Vol. 4, No.9, (May 2007), pp.1-10, ISSN:1742-6405.
- Naafs B. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Treatment of reactions and nerve damage. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, Vol. 64, No.4 supplement, (December 1996), S21-28, ISSN: 0148-916X.
- Narang T, Dogra S, Kaur I. (2005). Borderline tuberculoid leprosy with type 1 reaction in an HIV patient--a phenomenon of immune reconstitution. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, Vol.73, No.3,(September 2005), pp.203-205, ISSN:0148-916X.
- National STD/AIDS program of Brazil, 2008. *Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV: 2008 (7th edition)*, Brazilian Ministry of Health, ISBN:978-85-334-1352-8, Brasília.
- Nery JAC, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME & Sarno EN. (1998). Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Revista do Instituto de medicina tropical de São Paulo*, Vol. 40, No. 6, (November 1998), pp. 363-370, ISSN:0036-4665.
- Nery JA, Sampaio EP, Galhardo MC, Perissé AR, Vieira LM, Salles AM & Sarno EN. (2000). *M. leprae*-HIV co-infection: pattern of immune response in vivo and in vitro. *Indian Journal of Leprosy*, Vol.72, No.2, (April 2000),pp.155-167, ISSN:0254-9395.
- Pavie J, de Castro N, Molina JM & Flageul B. (2010). Severe peripheral neuropathy following HAART initiation in a HIV-infected patient with leprosy. *Journal of the international association of physicians in AIDS care*, Vol.9, No. 4, (July 2010), pp. 232-235, ISSN:1545-1097.
- Pereira GA, Stefani MM, Araujo Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol.71, No.5, (November 2004), pp.679-684, ISSN:0002-9637.

- Price P, Mathiot N, Krueger R, Stone S, Keane NM, French MA. (2001). Immune dysfunction and immune restoration disease in HIV patients given highly active antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Virology*, Vol. 22, No.3, (October 2001), pp.279-287, ISSN:1386-6532.
- Sampaio EP, Caneshi JR, Nery JA, Duppre NC, Pereira GM, Vieira LM, Moreira AL, Kaplan G & Sarno EM. (1995). Cellular immune response to *Mycobacterium leprae* infection in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infection and Immunity*, Vol.63, No. 5, (May 1995), pp.1848-1854, ISSN:0019-9567.
- Ratnam I, Chiu C, Kandala NB, Easterbrook PJ. (2006) Incidence and risk factors for immune reconstitution inflammatory syndrome in an ethnically diverse HIV type 1-infected cohort. *Clinical Infectious Disease*, Vol. 42, No.3, (February 2006), pp.418-427, ISSN:1058-4838.
- Riddell JT, Kaul DR, Karakousis PC, Gallant JE, Mitty J, Kazanjian PH. *Mycobacterium avium* complex immune reconstitution inflammatory syndrome: long term outcomes. *Journal of Translational Medicine*, Vol.5, N0. 50, (October 2007), pp.1-7.ISSN:1479-5876.
- Ridley DS, Jopling WH. (1966). Classification of Leprosy according to immunity. A five group system. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease*, Vol.34, No.3, (July 1966), pp.255-273, ISSN: 0148-916X.
- Ridley DS. (1969). Reactions in leprosy. *Leprosy Review*, Vol.40, No.2, (April 1969), pp.77-81, ISSN: 0305-7518.
- Ridley DS, Radia KB. The histological course of reactions in borderline leprosy and their outcome. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, Vol. 49, No.4, (December 1981), pp.383-392, ISSN: 0148-916X.
- Robertson J, Meier M, Wall J, Ying J, Fichtenbaum CJ. (2006). Immune reconstitution syndrome in HIV: validating a case definition and identifying clinical predictors in persons initiating antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Disease*, Vol.42, No.11, (June 2006), pp.1639-1646, ISSN:1058-4838.
- Sarno EN, Illarramendi X, Nery JA, Sales AM, Gutierrez-Galhardo MC, Penna MLF, Sampaio EP, Kaplan G. (2008) HIV-*M. leprae* interaction: can HAART modify the course of leprosy? *Public Health Reports* 2008, Vol.123, No. 2, (March 2008), pp.206-212, ISSN:0033-3549.
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW & Williams DL (2006). The continuing Challenges of Leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol.19, No.2, (April 2006), pp.338-381, ISSN:0893-8512.
- Shelburne SA, Visnegarwala F, Darcourt J, Graviss EA, Giordano TP, White AC Jr & Hamill RJ. (2005). Incidence and risk factors for immune reconstitution inflammatory syndrome during highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, Vol.19, No.4, (March 2005), pp. 399-406, ISSN: 0269-9370.
- Shelburne SA, Montes M, Hamill RJ. (2006). Immune reconstitution inflammatory syndrome: more answers, more questions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 57, No.2, (February 2006), pp.167-170, ISSN:0305-7453
- Singal A, Mehta S, Pandhi D. (2006).Immune reconstitution inflammatory syndrome in an HIV seropositive leprosy patient. *Leprosy Review*, Vol. 77, No.1, (March 2006), pp.76-80, ISSN: 0305-7518.
- Talhari C, Machado PR, Ferreira LC, Talhari S. (2007). Shifting of the clinical spectrum of leprosy in an HIV-positive patient: a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome? *Leprosy Review*, Vol.78, No.2, (June 2007), pp.151-154, ISSN:0305-7518.
- Talhari C, Mira MT, Massone C, Braga A, Chrusciak-Talhari A, Santos M, Orsi AT, Matsuo C, Rabelo R, Nogueira L, Ferreira LCL, Ribeiro-Rodrigues R & Talhari S. (2010). Leprosy and HIV coinfection: a clinical, pathological, immunological and therapeutic study of a cohort from a Brazilian referral center for infectious disease. *Journal of Infectious disease*, Vol. 202, No. 3, (August 2010), pp. 345-354, ISSN:0022-1899.
- Trindade MA, Manini MI, Masetti JH, Leite MA, Takahashi MD & Naafs B. (2005). Leprosy and HIV co-infection in five patients. *Leprosy review*, Vol. 76, No. 2, (June 2005), pp. 162-166, ISSN: 0305-7518.
- Ustianowski AP, Lawn SD, Lockwood DN (2006). Interactions between HIV infection and leprosy: a paradox. *Lancet Infectious Disease*, Vol.6, No 6, (June 2006), pp.350-360, ISSN:1473-3099.
- Vinay K, Smita J, Nikhil G & Neeta G. (2009). Human Immunodeficiency Virus and Leprosy coinfection in Pune, India. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 47, No. 9, (September 2009), pp.2998-2999, ISSN:0095-1137.
- Visco-Comandini U, Longo B, Cuzzi T, Paglia MG, Antonucci G. (2004). Tuberculoid leprosy in a patient with AIDS: a manifestation of immune restoration syndrome. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, Vol.36, No.11-12, (December 2004), pp.881-883, ISSN:0036-5548.
- World Health Organization, 2010. *Global leprosy situation, 2010*. Weekly epidemiological record, Vol.85, No. 35 (August, 2010) pp. (337-348), ISSN 0049-8114.

VIII.2: Anexo 2: Epidemiological and clinical patterns of 92 HIV and *Mycobacterium leprae* co-infected patients. Artigo referente ao estudo I da presente tese submetido para publicação para a revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

Title: Epidemiological and clinical patterns of 92 HIV and *Mycobacterium leprae* co-infected patients

Authors: Vinicius M. Menezes¹, MD; José Augusto C. Nery¹, PhD; Anna M. Sales¹, PhD; Alice Miranda¹, PhD; Maria Clara G. Galhardo², PhD; Francisco I. Bastos^{3,4}, PhD; Euzenir N. Sarno¹, PhD and Mariana A. Hacker¹, PhD.

Authors affiliation:

1- Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

2- Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

3- Institute of Science & Technology, Communication and Information in Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

4- CAPES Visiting researcher, Imperial College, London, UK.

Corresponding author:

Vinicius Martins de Menezes, M.D.

Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation,

Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. CEP. 21040-360,

e-mail: vmenezes@ioc.fiocruz.br

Phone: +552125621527

Abstract

Many articles have shown that HIV infection can modify the clinical course of Leprosy, but very scant epidemiological and clinical data about this co-infection are available in the peer-reviewed literature. We herein describe the geographical distribution and demographic characteristics of 92 HIV/ *M. leprae* co-infected patients assisted in a Brazilian Leprosy referral center. A multivariate analysis was performed in order to establish clinical factors associated with type 1 reaction. Co-infected patient admissions have steadily increased over the last years at this referral center. Most patients were men, with a mean age of 32.3 years old and presenting with the paucibacillary form of leprosy. The use of ART was the only factor associated with type 1 reaction. Most patients were living in the metropolitan area and the north subarea of the Rio de Janeiro city. In conclusion, co-infected patients receiving ART have a greater chance to develop type 1 reaction. Patients living with both HIV and leprosy are likely to live in regions characterized by a high density impoverished population.

Keywords: Leprosy and HIV co-infection, Social geography of Leprosy, Type 1 reaction, Brazil.

Introduction

Several studies have documented the complex relations between socioeconomic context and the spread of infectious diseases. Such relations may help to explain the geographic and sociodemographic overlapping and eventual clustering of different infectious diseases on a single geographic area/ affected population. Such superimposed burdens may include different tropical diseases and HIV/AIDS in contexts of poverty and pronounced socioeconomic and geographic heterogeneity.

Since the beginning of the Aids epidemic the role of co-infections with major tropical diseases like tuberculosis, leishmaniasis and malaria has been studied in the Brazilian context(1-2).

As recently highlighted by an editorial of *The Lancet Infectious Diseases*, in the years to come, the proper management of different co-infections, will be one of the key battlegrounds in the worldwide effort to curb the epidemic and provide optimal care for those already living with HIV/AIDS(3).

Despite the evidence that HIV infection can modify the natural history of leprosy(4-7), little epidemiological data on HIV/ *M. leprae* co-infection have been published in the literature(5).

Leprosy is primarily found in countries situated in tropical and subtropical regions of the world. According to WHO reports, the number of new cases detected during the year 2011, as reported by 105 countries was 219,075 (8). Although there has been a declining trend in overall prevalence and new-case detection in recent years, leprosy remains a relevant public health care problem in Brazil, yet to be satisfactorily curbed. In 2011, the prevalence rate of the disease was 1.54 cases per 10,000 habitants and 33,955 new cases of leprosy were detected all over the country (9).

By the same token, HIV infection remains one of most serious health care problems due to its pandemic nature and high morbidity and mortality rates in areas where potent

therapies remain elusive. WHO estimates that 2.5 million people became HIV infected in 2011 and 34 million people were living with HIV at the end of 2011(10). In Brazil, the AIDS epidemic has been stabilized within the last few years. In 2011, the incidence rate was 20.2 per 100,000 inhabitants with 38,776 new cases of AIDS being registered throughout the country(11).

To the best of our knowledge, no reliable estimates of the number of AIDS/leprosy co-infected individuals have been published to date. However, analyses documenting the superimposed burden of both diseases in the same impoverished areas(12)in addition to estimates clinical cases of co-infection overall show that both diseases overlap to some extent in Brazil as well as in Sub-Saharan Africa(13) and Southeastern Asia(14).

In the last decade, leprosy and HIV co-infection gained the attention of the scientific community due to the possibility of type 1 reaction after the initiation of combined antiretroviral therapy (ART) (4). Patients with leprosy who are co-infected with HIV seem to be at higher risk of developing leprosy reactions.(15). It is broadly accepted that reaction is the result of a shift in the patient's level of inflammation and/or cell- mediated immunity which, in turn, may lead to accelerated nerve damage and serious physical disabilities(5).

In order to evaluate the clinical and epidemiological patterns of HIV/*M. leprae* co-infected patients in Brazil, data from a major leprosy referral center, located in the city of Rio de Janeiro, were compiled and analyzed. Thematic maps were used to assess the geographical distribution of co-infected patients, according to the address of their household. In addition, factors associated with the type 1 reaction were evaluated, profiting from socio-demographic and clinical data from their medical records.

Material and Methods

Study site

The city of Rio de Janeiro is the major and most important municipality in the state of the same name with a population of roughly 6,320,446 people. Despite being the second

wealthiest city in the country (The first being Sao Paulo city), Rio de Janeiro has been affected by entrenched socioeconomic inequalities(16). A substantial proportion of its population still lives in precarious living conditions(17). The city has 160 neighborhoods and is historically divided into 4 regions referred as southern, northern, western and central areas or zones.

According to the last Brazilian Census in 2010, Rio de Janeiro State had a population of 15,989,929 people, the vast majority of whom (96.7%) were living in urban areas, especially in the Greater Metropolitan Area of Rio de Janeiro capital city, its capital city(16). Rio de Janeiro state is subdivided in 5 meso-regions; namely metropolitan, southern, northern, northwest, and central.

The Leprosy Outpatient Clinic at FIOCRUZ is a center of excellence for leprosy diagnosis, management and care, as well as contact tracing. Under the auspices of the Brazilian Ministry of Health, it has been responsible for evaluating HIV/ leprosy co-infected patients since 1989. As a referral center, the clinic's coverage is not limited to any specific geographical area. Notwithstanding, most of its clientele consists of individuals from the Metropolitan region of Rio de Janeiro city due to their easy access to the Clinic, but includes as well patients from others cities located in the state of Rio de Janeiro, besides a sizeable minority of patients from all over the country. Patients may be referred to the Clinic by any health service (public or private), nationwide, may spontaneously seek care, or may have been appointed to the Clinic after diagnosis of their index cases (contact tracing).

Study design

An analysis of socio-demographic, clinical and geographical data from the Leprosy Outpatient Clinic cohort of patients living with HIV/ *M. leprae* was carried out in order to evaluate the clinical and epidemiological profile of this population. Patient information is systematically collected at the time of leprosy diagnosis at Fiocruz and it is maintained in a

dedicated database over time. Data from all co-infected patients included in the present study were then retrieved from this database.

Definitions and the clinical routine

All patients were evaluated according to the standardized clinical and dermatological procedures. For the sake of diagnosis and classification, skin lesions biopsies were obtained and samples were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Detection of acid-fast bacilli was performed via Wade's modification of the Ziehl-Nielsen method. Slit skin smears were obtained from six body sites and they were stained for acid-fast bacilli detection (AFB) by Ziehl-Nielsen techniques. The bacilloscopic index (BI) was calculated by way of the Ridley & Jopling logarithmic scale(18). The lepromin test was measured 28 days after the intradermal injection of 0.1 mL of heat-killed *M. leprae* in the anterior forearm. The result was scored as either negative if ≤ 5 mm, or positive if >5 mm. Leprosy was then diagnosed and classified according to Ridley-Jopling criteria(18), including pure neural (PN) and indeterminate (I). The WHO disability grading was evaluated. Grade 0 corresponded to the absence of all anesthesia, visible deformity, and neurological damage (19).

Type 1 reaction was clinically defined by the presence of inflammatory skin lesion (new lesion or preexisting skin lesion which becomes inflamed) or by the presence of acute neuritis associated or not with skin lesion. Dermatopathological diagnosis criteria for type 1 reaction were based on the presence of epithelioid cells granuloma. This study identified two main patterns of type 1 reaction depending on the severity of the tissue inflammatory changes(20):

- Mild acanthosis and exocytosis; well developed cohesive epithelioid granulomas intermingled with few lymphocytes; blood vessels, arrector pili muscles, adnexa and nerve bundles; sparse multinucleated cells and small foci of red blood cell leakage.
- Exuberant changes such as moderate to severe acanthosis, spongiosis and exocytosis; epithelial apoptosis and basal epidermal erosion; severe dermal inflammatory

infiltration, including granulomas dissociated by marked edema or centered by necrosis in addition to numerous giant cells and red blood cell extravasation.

Diagnosis of HIV infection included the performance of two tests; the immune-enzymatic method (ELISA) and immune-fluorescence or Western Blot.

The variables under analysis refer to patient's information at diagnosis and comprise gender, age, education, marital status, leprosy clinical form, data from the WHO operational classification, disability grade, bacilloscopic index, reaction to the lepromin test, use of ART and CD4 lymphocyte count.

Geoprocessing and Mapping

Information on patients household addresses were georeferenced in order to build maps showing the geographical distribution of leprosy cases in the cities within the geographical perimeters of the state of Rio de Janeiro as a whole and in the neighborhoods located within the city of Rio de Janeiro.

To take into account differences in population size and number of cases, average incidence rates of AIDS and leprosy were calculated for given periods, for each municipality under analysis, using data from all reported cases retrieved from the respective national notification systems (SINAN-AIDS and SINAN-Leprosy), using standardized population sizes as denominators(21).

Reported cases of leprosy retrievable from the respective national notification system are only available from 2001 to 2010. Maps were constructed after the average rates of leprosy detection and AIDS incidence for each one of Rio de Janeiro State municipalities, covering two time periods: 2001-2005 and 2006-2010.

The ArcMap program was used. Dot density maps were use to visualize the distribution of co-infected patients according to the neighborhood corresponding to their households. Each dot represented one randomly-distributed case within the Rio de Janeiro State and the Rio de Janeiro City.

Statistical analysis

Bivariate analyses were performed to compare reactional versus non-reactional patients via the Chi-square test. Multivariate analysis was performed using logistic regression to assess factors associated with the reverse reaction. A significance level of 5% was adopted.

Results

Patient characteristics at diagnosis

From January 1989 to December 2011, 92 leprosy patients with a HIV positive serology were referred to the FIOCRUZ Leprosy Clinic. Over half (56.5%) of them were male and the mean age at diagnosis was 32.3 (18-72) years old. The great majority of patients (81.5%) were unmarried (single or divorced). Most (76.8%) had had 1-to-8 year of formal schooling, whereas 20.9% had attended school for more than 8 years and 2.3% had never been at school.

Although a great majority of the patients were classified as paucibacillary (77.2%), because they had a BI equal to zero, almost half (44.4%) had a negative lepromina test (≤ 5 mm). Again, most (69%) had a disability grade equivalent to zero at leprosy diagnosis, whereas for 21% it was 1, and for 10%, 2.

Out of the 92 patients included in the study, 33 (35.5%) patients were undergoing leprosy reaction at the time of the diagnosis, of whom 32 (97%) had type 1 and one patient a type 2 reactions.

The patient characteristics at the first visit as well as cross-comparisons between the characteristics of those patients with type 1 reaction with those without reaction are summarized in Table 1 (exception made to the single patient with type 2 leprosy reaction).

Ridley and Jopling criteria were used to classify those patients who did not present leprosy reaction at diagnosis, as follows: 2 were classified as having tuberculoid tuberculoid; 33 (55.9%), as borderline tuberculoid; 4 as borderline borderline; 5 as lepromatous borderline;

2 as lepromatous lepromatous; 11 (18.6%) as indeterminate, and 2 as having the pure neural clinical form.

More than two-thirds (70.7%) of the patients under analysis were receiving ART before being diagnosed with leprosy. CD4 lymphocyte counts were available for this first visits for 62 (67.4%) patients and their mean CD4 lymphocyte count was 371.3 cells/ mm³.

Factors associated with type 1 reaction

In bivariate analyses, a low CD4 lymphocyte count and the use of ART at the time of leprosy diagnosis were found to be associated with the development of type 1 reaction. Such findings were further assessed using logistic regression, as summarized in Table 2. The use of ART remained as the single independent factor associated with the outcome (type 1 reaction). The high proportion of patients without a valid CD4 for this initial visit precluded any further analysis of this covariate.

Temporal and spatial distribution of co-infected patients

The number of co-infected patients referred to Fiocruz Leprosy Clinic has increased over the last few years (Figure 1). In contrast, the prevalence and incidence rates of leprosy has been decreasing in Rio de Janeiro state as reported by the national notification systems: 24.9/10,000 and 21.8/100,000 inhabitants in 1990, respectively, versus 0.9/10,000 habitants and 10.6/100,000 habitants in 2001(9).

The general reduction in detection rate of leprosy and incidence rate of AIDS, in the municipalities and time period under analysis are visualized in Figure 2. The rates of Leprosy and AIDS were higher in some regions of the state, particularly the metropolitan area and the northern area of Rio de Janeiro city, and in some municipalities on the coastal plains and the southern part of the state.

The AIDS map for the second period shows a more homogeneous epidemic accompanied by rates reductions in the metropolitan region of the city of Rio de Janeiro and no great variation among state municipalities.

Almost all co-infected patients included in the present study were living in the metropolitan region of Rio de Janeiro city by the time they were diagnosed with leprosy (Figure 3). Half (49.5%) of the patients were living in the City of Rio de Janeiro, 42 (45.1%) were living in other cities within the Metropolitan area of Rio de Janeiro City, and only 5 (5.4%) patients were referred to Fiocruz from others cities of the Rio de Janeiro State outside the metropolitan area of Rio de Janeiro City.

Among the patients living in the city of Rio de Janeiro, 20 (43.5%) patients were from the northern area of the city, 11(23.9%) from the western area, 5 from the central area, and 2 from the southern area of the city (Figure 4).

Most of patients (77.4%) were natives of the State of Rio de Janeiro, 16.1% patients had migrated to Rio de Janeiro from the Brazilian northeast, and 6.5% came from other states in the Brazilian southeast. A majority of them (88.2%) was referred to the Clinic by other public health care services.

Discussion

The present study shows that an increasing number of co-infected patient have been admitted over the last few years at the Fiocruz Leprosy Outpatient Clinic. In contrast, the burden of leprosy and AIDS has declined in Rio de Janeiro over the same period of time.

One possible explanation for this recent increasing is that since 1997 ART has become available for all AIDS patients in Brazil, what maybe is associated with an augmented susceptibility to leprosy at ART initiation, as suggested by some authors. Couppié et al. demonstrated a higher incidence of leprosy in HIV patients receiving ART for less than 3 months, compared to those patients not yet receiving ART or with patients in use of ART for more than 3 months (7). By the same token, Sarno et al. have shown that initiation of ART was associated with the clinical appearance of leprosy lesions, then the greater clinical visibility of such cases (5). Thus, the appearance of clinical signs of leprosy in HIV-infected

individuals does not seem to be a manifestation of immune suppression but rather of immune reconstitution (22).

Although it was expected that HIV infection would lead to an increase in the frequency of multibacillary forms of leprosy, the present study shows that HIV/ *M. leprae* co-infected patients can present all clinical forms of leprosy. Actually, our findings documented a higher percentage of patients presenting paucibacillary leprosy. Paucibacillary leprosy is characterized by a strong cellular immune response with skin lesions containing a well organized granuloma formed by the epithelioid and multinucleated giant cells infiltrated by Th1 CD4 lymphocytes (23). We may hypothesize that the underlying antigenic stimulus associated with the progressive restoration of the immune competence after the initiation of ART may be associated with granuloma formation and the subsequent appearance of tuberculoid skin and nerve lesions.

Type 1 reactions are secondary to an enhancement of cellular immunity and delayed hypersensitivity to *M. leprae*(24). The precise triggering mechanisms and causes of this enhancement are unknown; but a spontaneous increase in CD4 T lymphocyte reactivity to *M. leprae* and macrophage activation have been described(24).

It is well known that ART is associated with a dramatic HIV viral load reduction and a subsequent increase in CD4 T cells, a key marker of the partial recovery of the immune function. To fully elucidate whether the high frequency of type 1 reaction observed at the moment of diagnosis, as documented by our study, is a consequence of the immunological recovery triggered by the use of ART is not within the scope of the present study. However, Initiation of ART has been reported to be associated with activation of sub-clinical *M. leprae* infection and exacerbation of pre-existing leprosy lesions(22). As such, the use of ART was the only independent factor associated with the presence of type 1 reaction at diagnosis (Table 2).

The socio-demographic characteristics of the co-infected patients at their first visit to the referral center presented herein were similar to the ones observed among cases notified in Brazil nationwide. National databases related to both diseases show a higher concentration of male patients in the age category between 30 to 59 years old, as was also observed in the present study (11). Interestingly, no patients under 15 years of age were admitted to the referral center at Fiocruz even though this category accounted for 3.4% of all new leprosy cases in the State of Rio de Janeiro in 2010 (9). Maybe *M. leprae* and HIV co-infection in children under 15 years old is a rare event and for this reason something the present study (limited to patients referred to our service) could not assess. A second hypothesis to be better analyzed by future studies refers to a putative underdiagnosis of such condition.

Most of the patients in our study had 1 to 8 years of schooling. Neglected diseases, particularly leprosy, are often found in poor, marginalized sections of the population with restricted access to formal education (25).

Most of the patients admitted at Fiocruz were born and continued to live in Rio de Janeiro State. This information is of particular interest because it suggests that leprosy may be, for the most part, acquired and transmitted within the State of Rio de Janeiro instead of imported from other areas of the country where it is hyperendemic, as might have been expected.

The maps visualizing the distribution of Leprosy and AIDS cases throughout the state documented a preponderance of co-infected patients living in the metropolitan area of Rio de Janeiro city. Few co-infected patients have come from other areas of the state, such as the eastern and northeastern, despite the high AIDS incidence and leprosy detection rates in these areas. This may be due to many causes, such as the low number of co-infected individuals and the less than optimal quality of local health care services.

We did not make evident any association between the distribution of the patients in the city of Rio de Janeiro and the Rio de Janeiro state with the prevalence rates of Leprosy

and AIDS in each city subarea and state regions. Most of the patients were living in the metropolitan area of the city and the northern region of the Rio de Janeiro City, closely followed by those from the western zone. Regions such as the metropolitan area and the northern and western regions of Rio de Janeiro City are characterized by a great number of favelas (slums), with high density population, which may be a major contributor to the spread of leprosy. However, as Fiocruz referral center is located in the northern region of Rio de Janeiro City, it is not possible to attribute the distribution of the co-infected patients made evident in the present study as an actual pattern or rather a consequence of inclusion bias.

Regions such as the metropolitan area and the northern and western sub-areas of Rio de Janeiro City are characterized by high density population, most of whom living in *Favelas*, or slums, which itself may constitute a major contributor to the spread of leprosy.

Leprosy distribution is characterized by its heterogeneity. Factors such as the rapid growth of a given the city, migration, access to health services, high population density, as well as impoverishment and non-hygienic living conditions are among the determinants that most influence the high geographic endemicity of leprosy (26-29).

The findings from our study are by no means representative of all cases of HIV/ *M. leprae* co-infection living in Rio de Janeiro, either because they may be never diagnosed as such or under follow-up in primary health care units. However, we strongly believe that the majority of the patients co-infected with HIV/ *M. leprae* in the state of Rio de Janeiro have been followed up at Fiocruz. In fact, to date, the 92 co-infected patients in the present work make up the largest HIV/ *M. leprae* casuistry under analysis in the international literature.

Authors' Contributions: The study was planned and supervised by ENS and MH and executed by VMM and MH. AM performed the hispathologic analysis. AMS, MCGG., JACN and VMM were treating physicians of the patients. VMM wrote the first draft and ENS, MH and FIB critically reviewed the manuscript. All authors approved the final version. ENS is guarantor of the paper.

Acknowledgments: We thank Renata Gracie for helping the management of geographical information system and Judy Grevan for editing the manuscript.

Funding: This study was supported by the Oswaldo Cruz Foundation and The National council of Technological and Scientific Development.

Conflicts of Interest: None declared

Ethical approval: The Evandro Chagas clinical research ethic committee granted ethical approval for this study. All the patient gave informed written consent.

Table 1: Characteristics of the patients at leprosy diagnosis:

Characteristics	Type 1 reaction	No type 1 reaction	<i>P</i> - Value
Male sex	22(68.7%)	29(49.1%)	0.07
Mean Age (min.- Max)	38.9 (22-72)	38.1(18-67)	0.77
IB>0	9 (28.1%)	11 (18.6%)	0.29
Using ART	28 (87.5%)	37 (62.1%)	0.01
Negative LT	14 (45.1%)	26 (44.0%)	0.92
Mean CD4 count	288 (24-635)	425 (37-1409)	0.02

IB: baciloscopic index, LT: lepromina test

Table 2: Influence of sex, age, bacilloscopic index, ART and the lepomin test for type 1 reaction.

Characteristics	OR	95% CI	P-value
Male sex	1.85	0.71-4.83	0.20
Age (continuous)	0.99	0.95-1.03	0.73
IB>0	1.66	0.49-5.57	0.41
Using ART	4.79	1.31-17.53	0.01
Positive LT	0.80	0.28-2.31	0.68

IB: bacilloscopic index, ART: antirretroviral therapy, LT: lepromina test, 95% CI: 95% Confidence interval, OR: Odds ratio

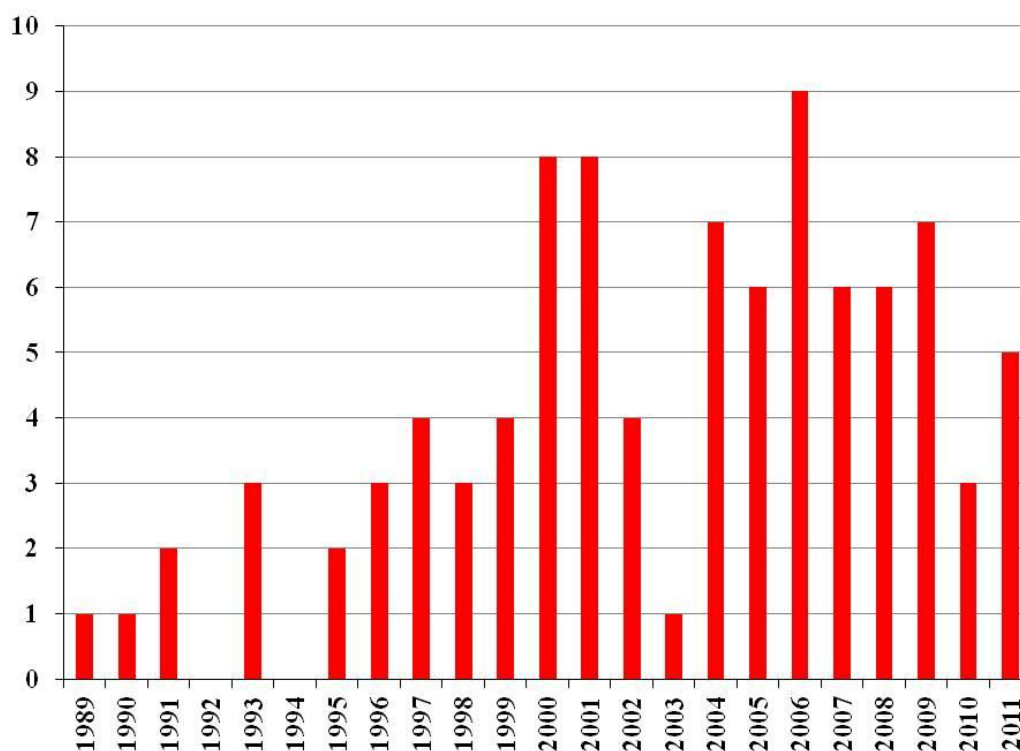


Figure 1: New HIV/ *M. leprae* cases per year of admission to Fiocruz. Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 1989-2011.

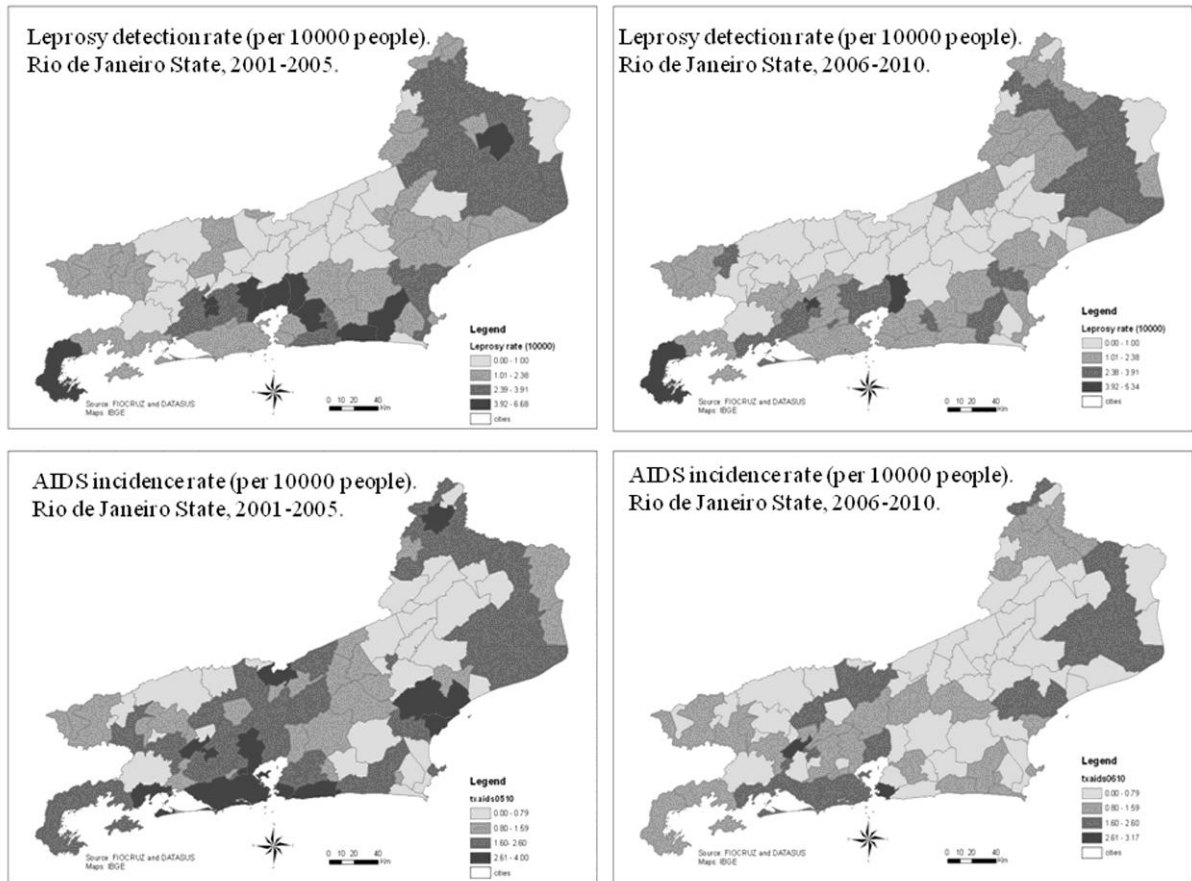


Figure 2: Leprosy detection and AIDS incidence rates. Rio de Janeiro State, 2001-2005 and 2006-2010.

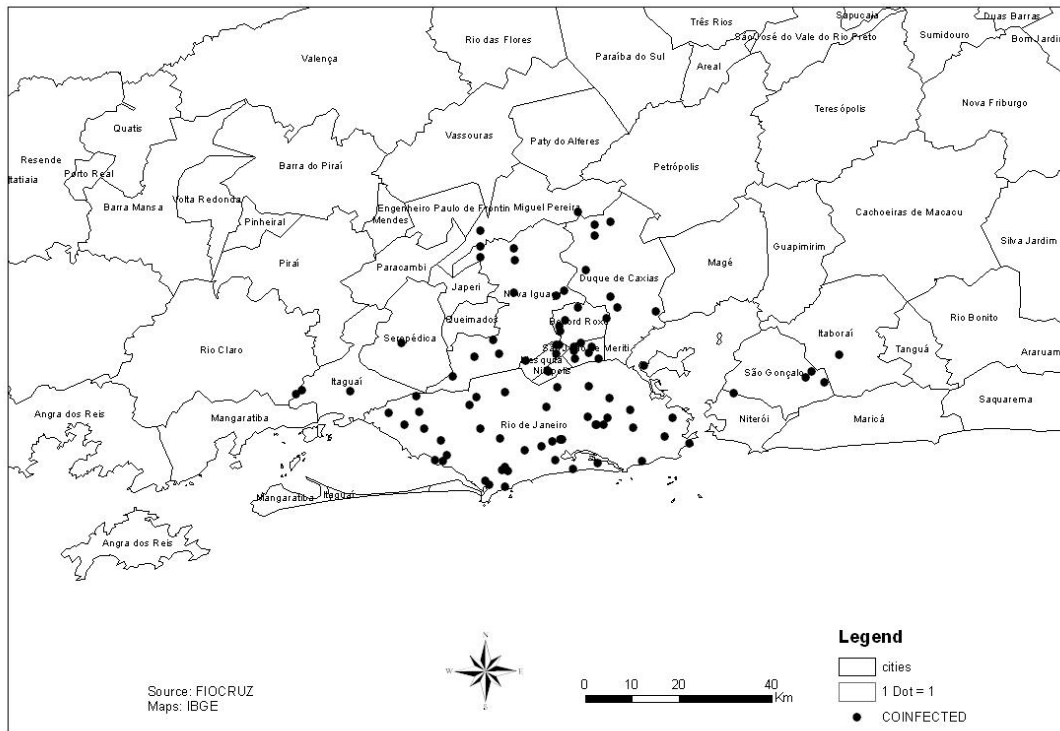


Figure 3: Spatial distribution of HIV/ *M. leprae* co-infected patients followed up at Fiocruz per municipality of leprosy diagnosis. Rio de Janeiro state, 1989-2011.

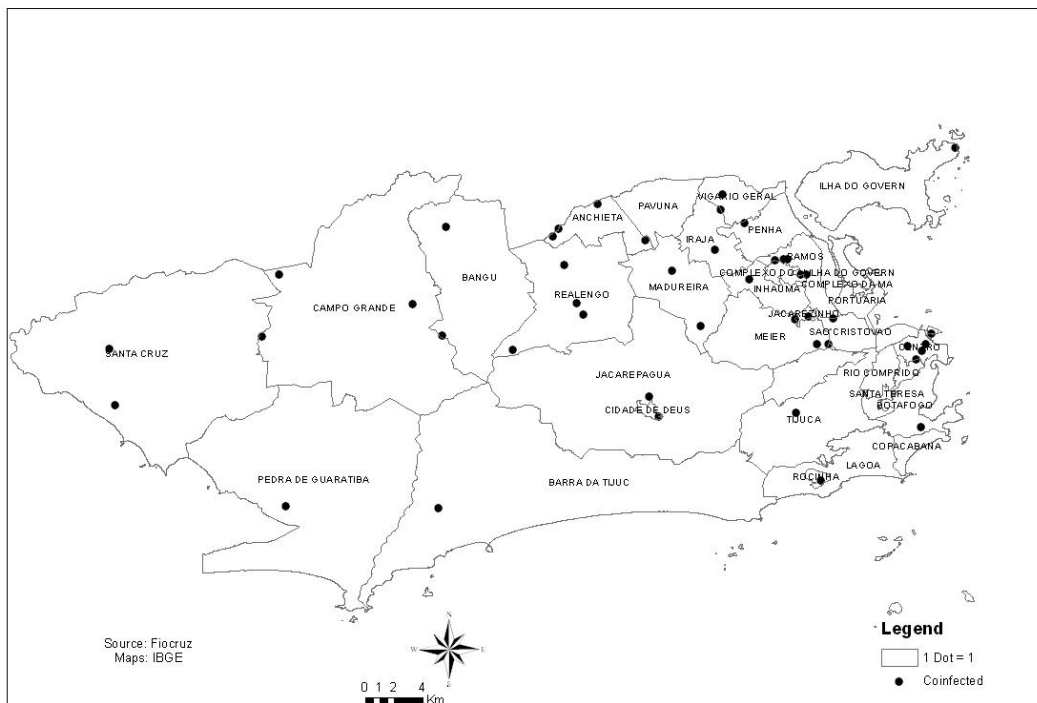


Figure 4: Spatial distribution of HIV/ *M. leprae* co-infected patients followed up at Fiocruz per neighborhood. Rio de Janeiro city, 1989-2011.

References

1. Morgado MG, Barcellos C, Pina Mde F, et al.; Human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome and tropical diseases: a Brazilian perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;**95 Suppl 1**:145-51.
2. Orsini M, Canela JR, Disch J, et al.; High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012;**106**(5):283-8. doi: S0035-9203(12)00009-0 [pii] 10.1016/j.trstmh.2012.01.008.
3. Disease TLI; Co-infection: new battlegrounds in HIV/AIDS. *The Lancet Infectious Disease* 2013;**13**(7):559.
4. Pavie J, De Castro N, Molina JM, et al.; Severe peripheral neuropathy following HAART initiation in an HIV-infected patient with leprosy. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)* 2010;**9**(4):232-5. doi: 9/4/232 [pii] 10.1177/1545109710373829.
5. Sarno EN, Illarramendi X, Nery JA, et al.; HIV-M. leprae interaction: can HAART modify the course of leprosy? *Public Health Rep* 2008;**123**(2):206-12.
6. Talhari C, Mira MT, Massone C, et al.; Leprosy and HIV coinfection: a clinical, pathological, immunological, and therapeutic study of a cohort from a Brazilian referral center for infectious diseases. *J Infect Dis.* 2010;**202**(3):345-54.
7. Couppie P, Domergue V, Clyti E, et al.; Increased incidence of leprosy following HAART initiation: a manifestation of the immune reconstitution disease. *AIDS* 2009;**23**(12):1599-600. doi: 10.1097/QAD.0b013e32832bb5b7.
8. World Health Organization. Weekly epidemiological record: global leprosy situation. 2012; 87 (34): 317-28; <http://www.who.int/wer/2012/wer8734.pdf>. [accessed 13 August 2013]

9. Brazilian Ministry of Health. Leprosy distribution in Brazil. 2012; http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31200. [accessed 13 August 2013]
10. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. [2012 UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic](http://www.unaids.org/en/resources/publications/2012/). 2012; <http://www.unaids.org/en/resources/publications/2012/>. [accessed 13 August 2013].
11. Brazilian Ministry of Health. Epidemiological Bulletin- STD/AIDS. 2012; <http://www.aids.gov.br/publicacao/2012/boletim-epidemiologico-aids-e-dst-2012>. [accessed 13 August 2013].
12. Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD; Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Negl Trop Dis* 2007;**1**(2):e114. doi: 10.1371/journal.pntd.0000114.
13. Moses AE, Adelowo KA, Ajayi BB; Prevalence of HIV-1 infection among patients with leprosy and pulmonary tuberculosis in a semi-arid region, Nigeria. *J R Soc Health* 2003;**123**(2):117-9.
14. Vinay K, Smita J, Nikhil G, et al.; Human immunodeficiency virus and leprosy coinfection in Pune, India. *J Clin Microbiol* 2009;**47**(9):2998-9. doi: JCM.00876-09 [pii] 10.1128/JCM.00876-09.
15. Deps P, Lucas S, Porro AM, et al.; Clinical and histological features of leprosy and human immunodeficiency virus co-infection in Brazil. *Clin Exp Dermatol* 2013;**38**(5):470-7. doi: 10.1111/ced.12028.
16. Brazilian Institut of Geography and Estatistics. 2010 population census. 2011. <http://www.censo2010.ibge.gov.br/resultados>. [accessed 29 April 2011]
17. Cavallieri F LG; Índice de Desenvolvimento Socia- IDS: comparando as realidades microurbanas da cidade do Rio de Janeiro. In: Janeiro PMdRds (ed). Rio de Janeiro, 2008.

18. Ridley DS, Jopling WH; Classification of Leprosy according to immunity. A five group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966;**34**:255-73.
19. Ranque B NV, Vu HT, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, et al; Age is an important factor for onset and sequelae of reversal reaction in vietnamese patients with leprosy. *Clin Infect Dis* 2007;**1**(44):33-40.
20. Ridley DS; Reactions in leprosy. *Lepr Rev* 1969;**40**(2):77-81.
21. Brazilian National System of Disease Notification. www.datasus.gov.br. [accessed 29 April 2011]
22. Menezes VM, Sales AM, Illarramendi X, et al.; Leprosy reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome: a case series of a Brazilian cohort. *AIDS* 2009;**23**(5):641-3. doi: 10.1097/QAD.0b013e328329140500002030-200903130-00013 [pii].
23. Britton WJ, Lockwood DN; Leprosy. *Lancet* 2004;**363**(9416):1209-19. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15952-7
S0140-6736(04)15952-7 [pii].
24. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, et al.; The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006;**19**(2):338-81. doi: 19/2/338 [pii]
10.1128/CMR.19.2.338-381.2006.
25. Schneider MC, Aguilera XP, Barbosa da Silva Junior J, et al.; Elimination of neglected diseases in latin america and the Caribbean: a mapping of selected diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;**5**(2):e964. doi: 10.1371/journal.pntd.0000964.
26. Montenegro AC, Werneck GL, Kerr-Pontes LR, et al.; Spatial analysis of the distribution of leprosy in the State of Ceara, Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;**99**(7):683-6. doi: S0074-02762004000700003 [pii]
/S0074-02762004000700003.

27. Imbiriba EN, Silva Neto AL, Souza WV, et al.; Social inequality, urban growth and leprosy in Manaus: a spatial approach. *Rev Saude Publica* 2009;**43**(4):656-65. doi: S0034-89102009005000046 [pii].
28. Souza WV, Barcellos CC, Brito AM, et al.; [Empirical bayesian model applied to the spatial analysis of leprosy occurrence]. *Rev Saude Publica* 2001;**35**(5):474-80. doi: S0034-89102001000500011 [pii].
29. Opromolla PA, Dalben I, Cardim M; [Geostatistical analysis of leprosy cases in the State of Sao Paulo, 1991-2002]. *Rev Saude Publica* 2006;**40**(5):907-13. doi: S0034-89102006000600022 [pii].

VIII.3: Anexo 3: Paradoxal effect of HIV infection on leprosy disease: artigo em preparação para ser submetido para publicação.

Paradoxal effect of HIV infection on leprosy disease

Vinicius M. Menezes¹, MD; Mariana A. Hacker¹, PhD; José Augusto C. Nery¹, PhD; Alice Miranda¹, PhD; Maria Clara G. Galhardo², PhD; Ariane L. de Oliveira¹, PhD; Roberta O. Pinheiro¹, PhD and Euzenir N. Sarno¹, PhD.

1- Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

2- Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Running title: Type 1 reaction in co-infected HIV/leprosy patients

Word count (abstract): 176

Abstract

Type 1 reactions occur in all clinical forms of leprosy but there is no data in literature if it is more frequent and/or more severe in HIV positive individuals. Type 1 reaction is observed before, during or after leprosy treatment and requires a long course of corticosteroid therapy. After MDT introduction it has become the most important issue in the management of patient. Here, we evaluated the incidence, risk factors and severity of type 1 reaction in HIV co - infected patients. 344 borderline tuberculoid patients admitted at Souza Araujo outpatient unit (Fiocruz-RJ/Brazil) were enrolled in this study. 43 (12,5%) were HIV positive. The incidence of type 1 reaction was higher in HIV positive group than in HIV negative although it was not more severe in co-infected patients when compared to no co - infected. The presence of AFB in skin lesion and HIV infection were independent risk factors for development of type 1 reaction. Co-infection may alter host's immune system and increase pro-inflammatory cytokines that can contribute for an increase in type 1 reaction in this group of patients.

Key words (3-10): leprosy, HIV, type 1 reaction incidence and risk factors

Introduction

In the last decade, Leprosy and HIV coinfection gained the attention of the scientific community due to the relation of type 1 reaction and the initiation of combined antiretroviral therapy (ART). Since ART for AIDS treatment has become available in countries where leprosy is endemic, more than 40 cases of leprosy reaction associated to immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) have been described in the literature (Pavie et al. 2010). However, since type 1 reactions affect a high percentage of all leprosy patients, it is not clear if they are actually more frequent or more severe in HIV positive individuals (Scollard et al. 2006).

Although there has been a declining trend in prevalence and detection of new cases, leprosy is still a public health problem in Brazil. In 2011, the prevalence rate of the disease was 1.54 cases per 10,000 inhabitants and 33,955 new cases of leprosy were detected in the country overall (Brasil 2008). In Brazil, the AIDS epidemic has been maintained stable within the last few years. In 2011, the incidence rate was 20.2 per 100,000 inhabitants with 38,776 new cases of AIDS being registered throughout the country (Brasil 2011). Although the prevalence rate of coinfecting individuals has never been estimated neither in Brazil nor worldwide, leprosy and the HIV infections seem to overlap in a number of countries, mainly in Africa and Asia continents.

Since the successful introduction of multi-drug therapy (MDT) for leprosy treatment, leprosy type 1 reaction turned to be the most important issue in the management of individual patient. It is frequently observed during multidrug therapy (MDT), but it may be developed before or after leprosy treatment (Balagon et al. 2010). Type 1 reaction is clinically characterized by the worsening of previous leprosy lesion or appearance of new infiltrated plaques. It may be accompanied by neuritis and systemic symptoms. The treatment of type 1 reaction requires long course of corticosteroids therapy.

The frequency of type 1 reaction varies widely in the literature depending on different clinical and epidemiological inclusion criteria, time of follow up and geographical and ethnical circumstances. It has been reported to range from 2.6% to 67% of leprosy patients (Becx-Bleumink 1993; Bwire & Kawuma 1994; Kahawita IP 2008; Nery et al. 1998; Ranque B 2007).

Among the various risk factors described for type 1 reaction are concomitant infections, immunization, pregnancy, extensive disease and increasing age. Other factors such as detection of *M. leprae* DNA by PCR in skin lesion, a positive slit skin smear and positive IgM anti-PGL1 antibody in serum were found to be related with type 1 reaction as

well(Kahawita IP 2008; Motta et al. 2012; Nery et al. 1998; Ranque B 2007) (Roche et al. 1991).

It is broadly accepted that reaction is the result of a shift in the patient's level of inflammation and/or cell-mediated immunity which, in turn, leads to accelerated nerve damage and serious physical disabilities(Sarno et al. 2008). Up to date, no study has evaluated the level of serum cytokines during type 1 reaction in the context of HIV coinfection. The purpose of this study was to evaluate the incidence, risk factors and severity of type 1 reaction in HIV coinfecting patients.

Methods

Study design and inclusion criteria

The study was approved by the ethics committee of the Evandro Chagas Clinical Research Institute/ Fiocruz (number 0038.0.009.000-07). The Leprosy Outpatient Clinic at FIOCRUZ is a center of excellence for leprosy diagnosis, management and care, and contact tracing. Under the auspices of the Brazilian Ministry of Health, it has been responsible for evaluating HIV/ leprosy patients since 1989.

For the purpose of this assay, we have conducted a retrospective longitudinal study of all paucibacillary leprosy patients aged ≥ 15 years with at least 1 skin lesion (excluding pure neural form) attended at the FIOCRUZ Clinic from 1st January 1997 to 31st December 2008. Patients were classified as paucibacillary according to the WHO operational classification if their bacilloscopic index collected from four body sites was negative (=0). Patients classified with the indeterminate or tuberculoid tuberculoid forms were not included because of their low risk to develop type 1 reaction. We only included patients that had been followed up for at least 1 year after MDT therapy.

A total of 344 patients admitted at Souza Araújo outpatient Unit (Fiocruz-Rio de Janeiro/Brazil) fulfilled the inclusion criteria and were enrolled in the study. All patients were routinely monthly followed up during MDT therapy and annually after MDT therapy. Patients were advised to seek immediately medical attention at the Clinic at any time when presenting signs of skin lesion or nerve inflammation. Patient's pertinent data were obtained from medical charts. Out of the 344 patients, 43 (12.5%) were serological HIV infection confirmed (HIV+ group) and their data were matched with the data from the others 301(87,5%) patients (HIV- group). Although 36 (11.9%) patients out of the 301 were confirmed to be HIV negative, all of the others were assumed to be negative even if they had not been tested for HIV infection, due to the remote probability of their been HIV positive (Figure 1).

Leprosy diagnosis and classification criteria

All patients were classified as borderline tuberculoid leprosy according to the Ridley and Jopling criteria which involves histopathological, immunological, bacteriological, and clinical criteria (Ridley & Jopling 1966). Thus, for diagnostic purposes, skin biopsies were obtained and samples were stained with hematoxylin and eosin and Wade's modification of the Ziehl-Nielsen method for detection of acid-fast bacilli. Slit skin smears were obtained from four body sites and stained for acid-fast bacilli (AFB) by Ziehl-Neelsen techniques. The lepromin test was measured 30 days after the intradermal injection of 0.1 ml of heat-killed *M. leprae* in the anterior forearm. The result was either scored as negative if < 5 mm, or positive if ≥ 5 mm. The WHO disability grading was evaluated. Grade 0 corresponded to the absence of all anesthesia, visible deformity, and neurological damage (Ranque B 2007).

Type 1 reaction definition criteria

Diagnosis of type 1 reaction was clinically defined by the presence of inflammatory skin lesion (new lesion or preexisting skin lesion which becomes inflamed) and/or by the presence of acute neuritis associated or not with skin lesion. Neuritis was defined as pain associated with swelling and tenderness of the nerve with or without nerve function impairment.

Dermatopathological diagnosis criteria for type 1 reaction was based on two histopathological patterns of type 1 reaction depending on the severity of the tissue inflammatory changes (Ridley 1969):

- mild acanthosis and exocytosis; well developed cohesive epithelioid granulomas intermingled with few lymphocytes; blood vessels, arrector pili muscles, adnexa and nerve bundles; sparse multinucleated cells and small foci of red blood cell extravasation.
- Exuberant changes as moderate to severe acanthosis, spongiosis and exocytosis; epithelial apoptosis and basal epidermal erosion; severe dermal inflammatory infiltration, including granulomas dissociated by marked edema or centered by necrosis, as well as numerous giant cells and red blood cell extravasation.

Cytokine levels determination in serum sample

In order to describe cytokines dynamics in the context of leprosy and HIV infection, we were able to select serum sample from four HIV/ *M. leprae* coinfecting patients at the time of leprosy BT diagnosis and later at the time of type 1 reaction diagnosis before prednisone treatment. Blood was collected in EDTA, centrifuged immediately, and serum aliquots were stored at -20°C prior to assay.

The Luminex platform (Millipore's MilliPlex Human Cytokine Th1-Th2 kit) was used to measure cytokine levels in serum samples. Ten immune mediators including proinflammatory mediators (IL-1 β , IL-6, IL-8); type 1 cytokines (IL-2, IFN γ , TNF α , IL12p40, IL12p70, IL17) and type 2 cytokines (IL-10, IL4, IL13) were determined. The cytokine assay plate layout consisted of seven standards in duplicate (3.2–2000 pg/mL), one blank well (for background fluorescence subtraction), two internal quality control samples in duplicate and 25 μ L duplicates of each serum sample. The MilliPlex method was performed as recommended by the manufacturer.

Detection of IgM antibodies to phenolic glycolipid-1 (PGL1)

An ELISA was performed in order to detect IgM antibodies to the specie- specific antigen PGL-1 in serum of co-infected patients at leprosy diagnosis. Disaccharide bovine serum albumin (DBSA) was used as a semi-synthetic analogue of PGL-1. Ninety-six-well polystyrene plates were coated with DBSA in sodium carbonate buffer (2 μ g/ml), pH 9.6 and stored at 4⁰C until used. The serum from each patient was diluted 1:200 in 15 mM Tris-Tween buffer containing 1% DBSA, and 10 μ l was distributed per well and incubated in a humid chamber at 37⁰C for 1h. At the end of this period, the samples were washed with 15 mM Tris- Tween buffer, and then anti-human IgM beta-galactosidase conjugate diluted 1:45.00 (Rockland) in 15 mM Tris-Tween buffer containing 1% DBSA was added. The plates were then incubated at 37⁰C for 1 h. A fluorogenic substrate (10_1 4- methylumbelliferyl beta-D-galactopyranoside) was added to the samples, and the material was incubated at room temperature for 10 min. The plate was read with a multiscan ELISA reader at 450 nm.

Statistical analysis

All analyses were performed using Stata database (version 9.0). The incidence rate of type 1 reaction and recurrent reaction per 100 person-years was calculated.

In order to evaluate risk factors for type 1 reaction, enrolled patients presenting type 1 reaction at the time of leprosy diagnosis were not included. Thus, for this part of the analysis, 24 HIV positive and 256 HIV negative patients not presenting reaction at leprosy diagnosis were included. Part of these patients developed reaction during follow up. The explanatory variables for type 1 reaction risk factor refer to patient's information at leprosy diagnosis and comprise male gender, mean age, positive lepromin test, HIV infection and the presence of AFB in skin lesion biopsies. Risk factors were assessed using bivariate and multivariate Poisson regression model.

For type 1 reaction clinical outcomes, clinical data of patients on reaction were compared using X^2 or Fisher's exact test for categorical variables and the T student test for continuous variables. The level of significance was 0.05. The variables under consideration for type 1 reaction outcomes were mean number of skin lesion, mean number of body segments affected, presence of ulcerated skin lesion, presence of neuritis, need for hospitalization and mean time of corticosteroid therapy.

Differences among the means of cytokines serum levels from the two groups were evaluated using the Mann Whitney test by the Graphpad prism 5 software . Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Characteristics of the groups at leprosy diagnosis

The baseline characteristics of the 344 borderline tuberculoid patients enrolled in the present study are detailed in Table 1. There was a preponderance of the male sex in the HIV positive group with a male to female ratio of 1.25/1 and a greater proportion of the female gender in the HIV negative group with a male to female ratio of 0.63/1 ($p = 0.04$). The mean age was lower among the coinfecting individuals (40.2 years old), comparing with the HIV negative group (44.1 years old) ($p = 0.04$). Most of the patients in both groups had the disability grade equal to zero at leprosy diagnosis (80.5% in the HIV positive group and 85.5% in the HIV negative group, $p = 0.53$). The proportion of patients with positive lepromin test was greater in the HIV positive group (73.1%) than in the HIV negative group (58.4%) but there was no statistically significant difference ($p = 0.07$). By histopathological analysis of the skin lesion biopsies at leprosy diagnosis, there were a greater proportion of patients in the HIV positive group (25.5%) with the presence of AFB in the than in the HIV negative group (9.6%) ($p < 0.01$).

Eleven (29%) coinfecting patient presented tuberculosis prior to leprosy. Out of them, 9 (81.8%) had a positive lepromin test at leprosy diagnosis. In the other hand, 27 (71%) coinfecting patients had never been diagnosed with tuberculosis and 17 (63%) of them presented a positive Mitsuda test at admission in the Clinic. There was no statistically relation between a positive Mitsuda test and a previously tuberculosis diagnoses ($p = 0.19$).

Of the total of 43 HIV/ *M. leprae* coinfecting patients, 41 (95,3%) were in use of ART by the time the study was initiated. Thirty two (74,4%) of the coinfecting patients had the diagnosis of HIV infection established previously to the diagnosis of leprosy, in 9 (21%) patients both diagnosis were established simultaneously and 2 patients (4,6%) were first diagnosed with leprosy. Overall, the mean CD4 lymphocytes count at the time of leprosy

diagnosis was 319.6 cells/ mm³. However, among patients presenting type 1 reaction at leprosy diagnosis the mean CD4 lymphocytes count was 278 cells/ mm³ and among those not on type 1 reaction at leprosy diagnosis the CD4 count was 359.1 cells/mm³. Two coinfecting patients (7,4%) presented type 1 reaction during opportunistic infection (both toxoplasmosis encephalitis) treatment. None of included patients presented opportunistic infection during leprosy reaction treatment with prednisone.

The incidence rate for type 1 reaction

During the period of the study, 27 (62.8%) coinfecting and 84 (27.8%) HIV- patients developed type 1 reaction ($p < 0.01$) (Figure 1). The incidence of type 1 reaction was much greater in the HIV positive group (30.2/100-person-year) than in the HIV negative group (6.5/100 person-year, $p < 0.01$) (Figure 1). Nineteen (70.4%) co-infected patients and forty five patients in the HIV negative group (53.5%) presented type 1 reaction at leprosy diagnosis. Four (14.8%) patients in the HIV positive group and 16 (19%) in the HIV negative group developed type 1 reaction during MDT treatment, while 14.8% HIV coinfecting patients and 28.5% HIV negative patients presented reaction after MDT therapy.

Most patients, 70.4% in the HIV positive group and 64.3% in the HIV negative group, presented type 1 reaction without signs of acute neuritis; eight (29.6%) patients in the HIV positive group and 17 (20.2%) in the HIV negative group presented acute neuritis associated with inflamed skin lesion and 13 (15.5%) patients in the HIV negative group and none in the HIV positive group developed acute neuritis without any inflamed skin lesion.

Despite the greater incidence of type 1 reaction in the HIV positive group; there was no significant difference in the incidence of recurrence of reaction and it was similar in both groups: 1/100 person-year in the HIV positive group and 0.3/100 person-year in the HIV negative group ($p = 0.2$) (Figure 1).

Type 1 reaction risk factors

In a bivariate analysis, HIV infection (RR= 2.85, $p < 0.01$) and the presence of Acid Fast Bacilli (AFB) in the skin lesion biopsies (RR= 11.23, $p < 0.01$) were statistically significant risk factors for type 1 reaction. A lepromin positive reaction, however, was a protective factor (RR= 0.29, $p < 0.01$). There was no relation among male gender and mean age to type 1 reaction (Table 2).

Multivariate analysis identified two risk factors for type 1 reaction. The most significant was the presence of AFB in skin lesion biopsies (RR=8.26, $p < 0.01$). Being HIV

coinfected was also an important risk factor for type 1 reaction (RR= 3.13, p=0.01), while a positive lepromin test continued to be a protective factor (RR= 0.27, p< 0.01) (Table 2).

Cytokine levels, CD4 T cells count and HIV viral load at leprosy diagnosis and at type 1 reaction diagnosis

As shown in Figure 2, there was an increasing in the absolute count of CD4 lymphocytes in 3 out of the 4 patients evaluated from the time BT leprosy was diagnosed to the time they presented type 1 reaction. By contrast, all patients presented a decreasing in HIV viral load in the same period of time.

In the cytokine analysis, there was an increasing levels of TNF- α , IFN- γ , IL12p70, IL4 and IL10 from the time BT leprosy was diagnosed to the time type 1 reaction was set. There were no significantly differences in the values of CD4 T lymphocytes, HIV viral load and cytokines levels between the two periods analyzed.

Frequency of IgM antibodies to phenolic glycolipid-1 (PGL1) positive

We were able to evaluate the detection of IgM anti- PGL1 from the serum of 13 (31.7%) coinfecting patients at BT leprosy diagnosis. Out of them, 4 (30.7%) was presenting type 1 reaction. In none of the patients tested, the test turned to be positive.

Type 1 reaction clinical outcomes

In order to evaluate the clinical outcomes of type 1 reaction the frequency of clinical characteristics related to the severity of leprosy reaction was evaluated. There was no significant difference between the groups in the frequency of neuritis (29.6% in the HIV positive group and 35.7% in the HIV negative group, p= 0.75) and need of hospitalization (11.1% in the HIV positive group and 4.7% in the HIV negative group, p= 0.22) (Table 3). In addition, there was no significant statistical difference in the mean number of lesions (8.1 in the HIV positive group and 9.6 in the HIV negative group, p= 0.37) and the mean number of body segments with skin lesion (3.4 in the HIV positive group and 3.8 in HIV negative group, p=0.49) (Table 3). The mean time of corticosteroids use for type 1 reaction treatment was similar in both groups (8.4 in the HIV group and 11.7 in the HIV negative group, p= 0.12) (Table 3). However, there were a greater proportion of patients with ulcerated skin lesion in the HIV positive group (Table 3).

Discussion

The present study reveals, for the first time, that the frequency of type 1 reactions was higher among HIV co-infected patients. It is difficult to compare the incidence rate found in our analysis with data from other studies due to the differences in type 1 reaction definition

criteria (e.g., including or excluding pure neuritis), diagnosis methods (e.g., clinical and/or histopathological), types of health facilities (e.g., hospital based, referral center based, primary care based) and ethnics and geographical variations. The incidence rate found in the HIV negative group, however, is consistent with most of the incidence rates previously published. Among the coinfecting patients, the incidence rate herein presented was higher when compared to previously published data though. It is unlikely we overestimated the incidence rates of type 1 reaction once the great majority of the episodes were clinically diagnosed and confirmed by histopathological analysis or electroneuromiography (in case pure neuritis cases).

Once HIV affects the cellular immunity, it has been speculated that the patient infected with the HIV could have a deficiency in granuloma formation. Thus, patients coinfecting with HIV/*M. leprae* could present a deficient response facing the test of Mitsuda in the same way that occurs with patients co-infected with HIV/*M. tuberculosis* in relation to the PPD test. Interestingly, we found a higher proportion of patients in the HIV positive group with a positive Mitsuda test than in the HIV negative group and this difference is significant. One possible explanation is that HIV infected individuals are more susceptible to tuberculosis which is endemic in Rio de Janeiro City and so, previously tuberculosis could be associated with positive lepromin test. Damasco et al have demonstrated injection of purified protein derivative of tuberculin (PPD) induced local induration and mononuclear leucocyte accumulation in leprosy patient (Damasco et al. 1992). However, in the present study, no significant difference was observed when the positive response to the Mitsuda test was related with previous presentation of tuberculosis. Another possibility is that there was a greater proportion of patients presenting type 1 reaction in the HIV group at the time the Mitsuda was evaluated, which could have contributed to a higher frequency of lepromin positive test.

The influence of the HIV infection in the development of type 1 was confirmed by the risk factor analysis. HIV infection comprises a wide spectrum of clinical and immunological patterns and many aspects such as opportunistic infections, prophylactic drugs and ART can interfere in its natural history. Most of our patients were AIDS individuals in use of ART and none of them was presenting opportunistic infection by the time type 1 reaction was diagnosed.

Type 1 reactions are the result of an enhancement of cellular immunity and delayed hypersensitivity to *M. leprae* (Scollard et al. 2006). The precise triggers and causes of this enhancement are unknown; but there is a spontaneous increase in CD4 T lymphocyte reactivity to *M. leprae* and macrophage activation. In the same vein, it is well known that

ART is associated with a dramatic HIV viral load reduction and a subsequent increase in CD4 T cells and immune function. We were not able to identify if the high incidence of type 1 reaction found in the HIV positive group was a consequence of the use of ART. However, Initiation of ART has been reported to be associated with activation of sub-clinical *M. leprae* infection and exacerbation of existing leprosy lesions(Menezes et al. 2009).

The most significant independent risk factor identified by multivariate analysis was the presence of AFB in skin lesion biopsies. The borderline forms are considered the most unstable in that the immunological capability of the patient to restrain the infection is only partial. Borderline tuberculoid leprosy resembles the TT form, but the number of skin lesions is usually greater and the granuloma, in the histopathology analysis, differ from the TT granuloma because it does not extend up to involve the basal layer of the epidermis and the numbers of acid-fast bacilli in lesions vary from undetectable to 1 in every 10 to 100 oil immersion microscopic fields(Hastings et al. 1988).

It is worth noting that it is not possible by histopathological analysis distinguish between viable bacillus from unviable ones or fragments of bacillus. However, the presence of an antigenic stimulus appears to play an important role in the development of type 1 reaction. Previously studies have documented that multibacillary patients and paucibacillary patients with single skin lesion with *M. leprae* PCR positive are in a greater risk for the development of type 1 reaction (Kahawita IP 2008).

Interestingly, despite all patients had a BI negative and a well formed granuloma in skin lesion which defines the BT form and, most patients in the HIV positive group had a positive reaction to the lepromin test; there were a greater proportion of HIV positive patients with AFB in their skin lesion biopsies. It's considerable to speculate that despite the well organized granuloma the mechanisms by which bacillus are cleared from the lesions may be partially impaired in HIV positive. It is possible to consider that the underlying mycobacterial antigenic stimulus associated with restoration of the immune response after the initiation of ART can trigger type 1 reaction.

Figure 2 illustrates the relation between the suppression of HIV viral load and the set up of type 1 reaction. It indicates, as well, the reconstitution of the immune system with increasing levels of CD4 T lymphocytes and cytokines. High levels of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and IL-2 and decreased levels of IL-4, 5 and 10 have been shown in type 1 reaction skin lesions.(Manandhar et al. 2002). This reactivation state seems to play a key role in the mechanisms of bacterial and its constituents clearance. By contrast, this high amount of pro-inflammatory cytokines produced during type 1 reaction has been reported to be involved in

the induction of tissue damage and disease severity. However, the degree of serum and tissue inflammation during type 1 reaction is yet to be studied in the context of HIV infection.

In leprosy patients, IgM antibody titers to *M. leprae* specific PGL-1 antigen are considered surrogate markers of the bacillary load. None of the co-infected patients was seropositive for PGL-1, a finding consistent with the low sensitivity of anti-PGL1 serology in patients with PB leprosy and PB leprosy co-infected with HIV (Pereira et al. 2004).

Despite the evidences that skin ulcerated lesion was more frequent in the HIV positive group, type 1 reaction did not seem to be more severe in co-infected patient as all others measured outcomes were similar in both groups. All patients were treated with prednisone as standard therapy for type 1 reaction and had a favorable evolution in spite of the severity of disease or the need of a short extension of the use of corticoids.

In conclusion, type 1 reaction was more frequent in HIV/ *M. leprae* co-infected patients. The presence of AFB in skin lesion and HIV infection were independent risk factor for the development of type 1 reaction. Type 1 reaction did not seem to be more severity than in HIV negative patients.

Tables and Figures

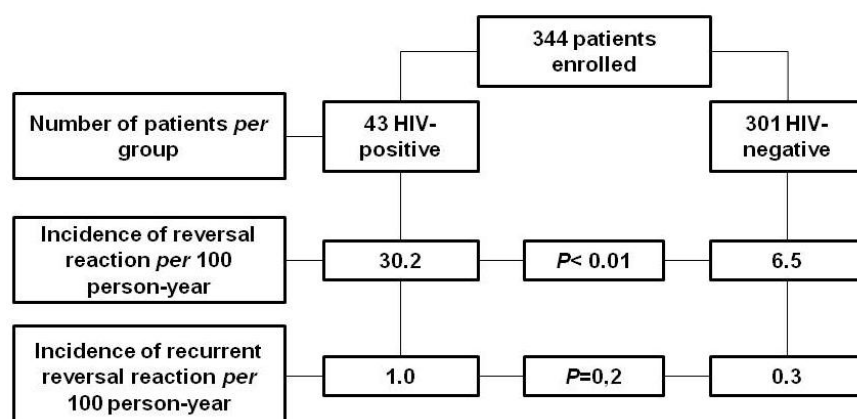


Figure 1: study design and frequency of reversal reaction and recurrent reversal reaction

Table 1: Characteristics of the groups at leprosy diagnosis

Characteristics	HIV+	HIV-	P
Male to female ratio	1.26/1	0.63/1	0.04
Mean age	40.2	44.1	0.04
Proportion of patients with positive lepromin test	30 (73.1%)	167 (58.4%)	0.07
Proportion of patients with AFB in skin biopsies	11(25.5%)	29 (9.6%)	<0,01
Type 1 reaction at leprosy diagnosis	19 (44.1)	45 (14.9%)	<0,01
Disability grade =0	33 (80.5%)	175 (85.5%)	0.53

Table 2: Risk factor for reversal reaction:

Risk factors	Bivariate			Multivariate		
	RR	P	IC 95%	RR	P	IC 95%
-						
HIV infection	2.85	<0.01	1.33-6.08	3.13	0.01	1.30-7.51
Presence of AFB in skin lesion	11.23	<0.01	6.10-20.68	8.26	<0.01	4.37-15.64
Positive lepromin Test	0.29	<0.01	0.16-0.52	0.27	<0.01	0.14-0.52
Age	0.92	0.69	0.63- 1.34	-		-
Male gender	0.91	0.76	0.50- 1.63	-		-

Table 3: Reversal reactions outcomes

Outcomes	HIV+	HIV-	P
Mean number of skin lesions	8.1	9,6	0.37
Mean number of body segments affected	3.4	3,8	0.49
Proportion of patients with ulcerated skin lesion	4(9.3%)	0	<0,01
Proportion of patients with neuritis	8 (29.6%)	30 (35.7%)	0.75
Proportion of hospitalized patients	3 (11.1)	4(4.7%)	0.22
Mean time of corticosteroid therapy	8,4	11,7	0.12

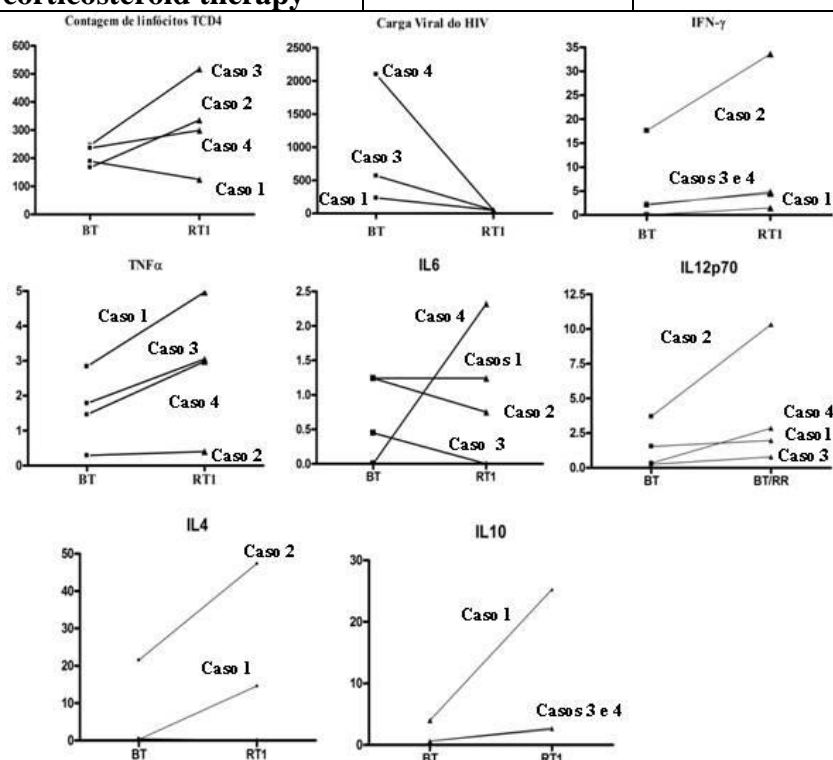


Figure4:CD4 count, HIV viral load and cytokines levels at BT leprosy diagnosis and Type 1 reaction diagnosis.

References

- Balagon MV, Gelber RH, Abalos RM, Cellona RV 2010. Reactions following completion of 1 and 2 year multidrug therapy (MDT). *Am J Trop Med Hyg*, 83, 637-644.
- Becx-Bleumink M 1993. Priorities for the future and prospects for leprosy control. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 61, 82-101.
- Brasil MdSd 2008. Tabela com o coeficiente de prevalência de hanseníase. In, Brasília.
- 2011. Boletim Epidemiológico DST/AIDS-2011- Preliminar. In PNd DST/AIDS, Brasília, p. 1-26.
- Bwire R, Kawuma HJ 1994. Type 1 reactions in leprosy, neuritis and steroid therapy: the impact of the human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88, 315-316.
- Damasco MH, Sarno EN, Lobao AS, Alvarenga FB, Porto JA, Rosankaimer F, Kaplan G 1992. Effect of cutaneous cell-mediated immune response to rIFN gamma on *Mycobacterium leprae* viability in the lesions of lepromatous leprosy. *Braz J Med Biol Res*, 25, 457-465.
- Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Franzblau SG 1988. Leprosy. *Clin Microbiol Rev*, 1, 330-348.
- Kahawita IP WS, Lockwood DN 2008. Leprosy type 1 reaction and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol*, 1, 75-82.
- Manandhar R, Shrestha N, Butlin CR, Roche PW 2002. High levels of inflammatory cytokines are associated with poor clinical response to steroid treatment and recurrent episodes of type 1 reactions in leprosy. *Clin Exp Immunol*, 128, 333-338.
- Menezes VM, Sales AM, Illarramendi X, Miranda A, Goncalves Morgado M, Gutierrez-Galhardo MC, Nunes Sarno E, da Costa Nery JA 2009. Leprosy reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome: a case series of a Brazilian cohort. *AIDS*, 23, 641-643.
- Motta AC, Pereira KJ, Tarquinio DC, Vieira MB, Miyake K, Foss NT 2012. Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. *Clinics (Sao Paulo)*, 67, 1145-1148.
- Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN 1998. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 40, 363-370.
- Pavie J, De Castro N, Molina JM, Flageul B 2010. Severe peripheral neuropathy following HAART initiation in an HIV-infected patient with leprosy. *J Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic)*, 9, 232-235.
- Pereira GA, Stefani MM, Araujo Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1

subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am J Trop Med Hyg*, 71, 679-684.

Ranque B NV, Vu HT, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, et al 2007. Age is an important factor for onset and sequelae of reversal reaction in vietnamese patients with leprosy. *Clin Infect Dis*, 1, 33-40.

Ridley DS 1969. Reactions in leprosy. *Lepr Rev*, 40, 77-81.

Ridley DS, Jopling WH 1966. Classification of Leprosy according to immunity. A five group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 34, 255-273.

Roche PW, Theuvenet WJ, Britton WJ 1991. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. *Lancet*, 338, 654-657.

Sarno EN, Illarramendi X, Nery JA, Sales AM, Gutierrez-Galhardo MC, Penna ML, Sampaio EP, Kaplan G 2008. HIV-M. leprae interaction: can HAART modify the course of leprosy? *Public Health Rep*, 123, 206-212.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*, 19, 338-381.