



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA  
SALUD**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MOLECULAR EN PACIENTES INFECTADOS  
CON *MYCOBACTERIUM LEPRAE* Y CONTACTOS QUE ACUDEN AL PROGRAMA NACIONAL  
DE CONTROL DE LEPROSIS DURANTE LOS AÑOS 2018 A 2020. ESTUDIO PILOTO**

**GLORIA ELIZABETH MAIZ GALEANO**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA**

**SALUD**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MOLECULAR EN PACIENTES INFECTADOS  
CON *MYCOBACTERIUM LEPRAE* Y CONTACTOS QUE ACUDEN AL PROGRAMA NACIONAL  
DE CONTROL DE LEPROSIS DURANTE LOS AÑOS 2018 A 2020. ESTUDIO PILOTO**

**GLORIA ELIZABETH MAIZ GALEANO**

**Tutor: PROF. DRA. CHYNTIA CAROLINA DIAZ ACOSTA**

**Co-tutor: PROF. DRA. EVA NARA**

**PROF. DR. GERALDO PEREIRA**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Junio, 2021

Maíz Galeano, Gloria Elizabeth

Caracterización de la respuesta inmune molecular en pacientes infectados con *Mycobacterium leprae* y contactos que acuden al Programa Nacional de Control de Lepra durante los años 2018 a 2020. Estudio piloto/ Gloria Elizabeth Maíz Galeano; Tutor: Chyntia Carolina Díaz Acosta; Co tutor Eva Nara, Geraldo Pereira.- - San Lorenzo: UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

xvii, 97; il.

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – UNA, IICS, FCQ; 2021

1. *Mycobacterium leprae* 2. Ensayo de Inmunoadsorción Enzimática,  
3. Reacción en Cadena de la Polimerasa 4. Sistema Inmunológico. Título

CDD (ed. 18<sup>a</sup>) 616.079  
M288c



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EL/LA **PROF. DR(A.) CHYNTIA CAROLINA DIAZ ACOSTA** DOCENTE/DOCENTE  
INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MOLECULAR EN PACIENTES INFECTADOS CON *MYCOBACTERIUM LEPRAE* Y CONTACTOS QUE ACUDEN AL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LEPROA DURANTE LOS AÑOS 2018 A 2020. ESTUDIO PILOTO**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el/la estudiante **GLORIA ELIZABETH MAIZ GALEANO** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 30 días del mes de junio de 2021.

  
**Chyntia Carolina Díaz Acosta**  
Bloquímica  
PhD. MSc. en Biología Molecular y Celular  
R. P. N° 1.472

**Tutor(a): Prof. Dr(a). Chyntia Carolina Díaz Acosta**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EL/LA **PROF. DR(A). EVA MEGUMI NARA PEREIRA** DOCENTE/DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MOLECULAR EN PACIENTES INFECTADOS CON *MYCOBACTERIUM LEPRAE* Y CONTACTOS QUE ACUDEN AL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LEPROA DURANTE LOS AÑOS 2018 A 2020. ESTUDIO PILOTO**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el/la estudiante **GLORIA ELIZABETH MAIZ GALEANO** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 30 días del mes de junio de 2021.

---

Co-Tutor(a): Prof. Dra. Eva Megumi Nara Pereira



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EL/LA **PROF. DR(A). GERALDO MOURA BATISTA PEREIRA**, DOCENTE/DOCENTE  
INVESTIGADOR DE Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado “**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MOLECULAR EN PACIENTES INFECTADOS CON *MYCOBACTERIUM LEPRAE* Y CONTACTOS QUE ACUDEN AL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LEPROA DURANTE LOS AÑOS 2018 A 2020. ESTUDIO PILOTO**”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el/la estudiante **GLORIA ELIZABETH MAIZ GALEANO** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de Rio de Janeiro, a los 30 días del mes de junio de 2021.



Co-Tutor(a): Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira  
Pesquisador Titular em Saúde Pública, IOC-FIOCRUZ



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

**INFORMA:** Que el presente documento, titulado **““CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MOLECULAR EN PACIENTES INFECTADOS CON MYCOBACTERIUM LEPRAE Y CONTACTOS QUE ACUDEN AL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LEPROA DURANTE LOS AÑOS 2018 A 2020. ESTUDIO PILOTO”**, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta el/la estudiante **GLORIA ELIZABETH MAIZ GALEANO** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección del/la docente investigador(a) **PROF. DRA. CHYNTIA CAROLINA DÍAZ ACOSTA, PROF. DRA. EVA MEGUMI NARA PEREIRA, PROF. DR. GERALDO PEREIRA.**

Considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 30 días del mes de junio de 2021.

---

**B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.**

**Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**Título del trabajo de tesis.**

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Nombres y Apellidos del estudiante

Aprobado el \_\_\_\_\_ de 2021

Tribunal examinador:

Evaluador 1 nombre completo, Institución, Ciudad, País

Evaluador 2 nombre completo, Institución, Ciudad, País

Evaluador 3 nombre completo, Institución, Ciudad, País

Evaluador 4 nombre completo, Institución, Ciudad, País

---

Nombre completo del tutor

Tutor

---

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.  
Directora de Postgrado FCQ

## DEDICATORIA

A mi papá Andrés, mi ángel que me cuida desde la eternidad.

A mi familia por todo el apoyo,  
por ser mi sustento diario.

Este logro va dedicado a ellos

## AGRADECIMIENTOS

Al culminar esta etapa, agradezco primeramente a Dios por sobre todas las cosas, por todas las bendiciones recibidas.

A mi familia, mi mamá, don Ángel y mi hermana Cinthia, por el apoyo y la fuerza y la confianza que siempre me brindaron y me transmitieron, son mi motor para seguir adelante. A mi novio por el ánimo, el apoyo y la comprensión de siempre.

A mi tutora, la Dra. Chyntia Díaz, por haberme guiado de la mejor manera en todo este tiempo, gracias a su infinita paciencia y por todo lo aprendido bajo su excelente tutoría.

A mis co-tutores, la Dra. Eva Nara y el Dr. Geraldo Pereira, por el acompañamiento. A todo el equipo de investigación del Laboratorio de Microbiología Celular del Instituto Oswaldo Cruz: la Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani, Vilma Figueiredo, Marcia de Bêrredo-Pinho, por la colaboración para la realización de este trabajo de tesis y por el acompañamiento. Al departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IICS, por haberme abierto las puertas al iniciar esta etapa de mi formación profesional. Un especial agradecimiento a la Dra. Laura Franco, Dra. Leticia Rojas y al Bioq. Diego González por la ayuda brindada durante la realización de la tesis.

Al Programa Nacional de Control de Lepra, por la colaboración, en especial a la Dra. Olga Almada, al Dr. José Pereira y a la Lic. Claudia Ramírez.

A mis amigos y amigas, por el ánimo y apoyo incondicional de siempre a pesar de la distancia. A mis compañeros/as de la maestría, por todos los momentos que pasamos juntos e hicieron que este camino que transitamos juntos sea mucho más llevadero.

Finalmente agradecer al IICS-UNA y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente y por seguir formando jóvenes en la ciencia.

Sólo me queda decir, muchas gracias a todos!!

**Caracterización de la respuesta inmune molecular en pacientes infectados con *Mycobacterium leprae* y contactos que acuden al Programa Nacional de Control de Lepra durante los años 2018 a 2020. Estudio piloto.**

**Gloria Elizabeth Maiz Galeano\*, Chyntia Carolina Diaz Acosta\*\***

\*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\*Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), Universidad Nacional de Asunción

## RESUMEN

La lepra es una enfermedad crónica de largo periodo de incubación con consecuencias discapacitantes, cuyo diagnóstico se realiza una vez presentadas las manifestaciones clínicas. En el Paraguay un número de 300 casos al año se ha estado manteniendo durante los últimos años. El principal grupo de riesgo de enfermedad son los contactos sanos de personas infectadas sin tratamiento y para controlar la transmisión se ha vuelto necesaria la identificación de biomarcadores correlacionados a la infección. En el presente estudio piloto, se pretende caracterizar el perfil inmunológico de pacientes con lepra multibacilar (MB), paucibacilar (PB) y sus contactos intradomiciliarios (CMB y CPB) que recurrieron al PNCL entre los años 2018 y 2020 antes del inicio del tratamiento. Para ello, fueron evaluadas muestras de sangre y suero de 23 pacientes (16 MB y 7 PB) y 17 contactos intradomiciliarios (14 CMB y 3 CPB) reclutados antes del inicio de tratamiento. Mediante ensayos de ELISA *in house* se evaluaron anticuerpos contra antígenos específicos de *Mycobacterium leprae* como PGL-I (IgM) con el cual se obtuvo serorreactividad de 81% en MB, 28% PB, 14% CMB y 0% CPB, en cuanto al LID-1 (IgG) sólo 63% de pacientes MB presentaron serorreactividad. Mediante qPCR se detectó ADN de *M. leprae* en 11/16 MB, 5/7 PB, 5/14 CMB y 2/3 CPB. La evaluación del cambio en la expresión génica de las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-4 se realizó por RT-qPCR y para IFN- $\gamma$  se observó diferencia significativa entre MB y PB ( $p=0,0371$ ). En cuanto a los contactos, se observó una tendencia de aumento del cambio de la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-12 en CMB comparado con el grupo CPB. No se observó diferencia en la expresión génica de IL-1 $\beta$  e IL-4 en los grupos estudiados. La caracterización del perfil inmunológico mediante diversas técnicas laboratoriales y los resultados obtenidos en este trabajo serán empleados como base para apoyar al Programa Nacional de Control de Lepra así como para lanzar nuevos estudios de biomarcadores buscando la detección precoz y tratamiento oportuno en personas con riesgo a contraer la infección.

**Palabras claves:** *Mycobacterium leprae*, Ensayo de Inmunoadsorción Enzimática, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Sistema Inmunológico

**Characterization of the molecular immune response in patients infected with *Mycobacterium leprae* and contacts who attend the National Leprosy Control Program during the years 2018 to 2020. A pilot study.**

**Gloria Elizabeth Maiz Galeano\*, Chyntia Carolina Diaz Acosta\*\***

\*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\*Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), Universidad Nacional de Asunción

**ABSTRACT**

Leprosy is a chronic disease with a long incubation period with disabling consequences, the diagnosis of which is made once the clinical manifestations have been presented. In Paraguay, a number of 300 cases per year has been maintained in recent years. The main group at risk of disease are healthy contacts of infected people without treatment, and to control transmission, the identification of biomarkers correlated to the infection has become necessary. In the present pilot study, the aim was to characterize the immunological profile of patients with multibacillary (MB), paucibacillary (PB) leprosy and their household contact contacts (CMB and CPB) who resorted to PNCL between 2018 and 2020 before starting treatment. To do this, blood and serum samples from 23 patients (16 MB and 7 PB) and 17 household contacts (14 CMB and 3 CPB) recruited before the start of treatment were evaluated. Through in-house ELISA tests, antibodies against specific antigens of *M. leprae* such as PGL-I (IgM) were evaluated, with which seroreactivity of 81% in MB, 28% PB, 14% CMB and 0% CPB was obtained, in terms of LID-1 (IgG) only 63% of MB patients presented seroreactivity. By qPCR, *M. leprae* DNA was detected in 11/16 MB, 5/7 PB, 5/14 CMB and 2/3 CPB. The evaluation of the change in the gene expression of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-1 $\beta$  and IL-4, was carried out by RT-qPCR and for IFN- $\gamma$  a significant difference was observed between MB and PB ( $p=0,0371$ ). Regarding the contacts, a trend of increasing change in the expression of IFN- $\gamma$ , IL-12 was observed in CMB compared to the CPB group. No difference was observed in the gene expression of IL-1 $\beta$  and IL-4 in the groups studied. The characterization of the immunological profile through various laboratory techniques and the results obtained in this work will be used as a basis to support the National Leprosy Control Program as well as to launch new biomarker studies seeking early detection and timely treatment in people at risk of contracting the infection.

**Keywords: *Mycobacterium leprae*, Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Polymerase Chain Reaction, Immune System.**

## INDICE

1.	MARCO TEÓRICO.....	18
1.1.	Generalidades de la enfermedad de Hansen o Lepra .....	19
1.1.1.	Epidemiología de la enfermedad.....	19
1.1.2.	El agente etiológico, Mycobacterium leprae.....	20
1.2.	Características clínicas de la enfermedad, diagnóstico y tratamiento.....	22
1.3.	Mecanismo inmunológico asociado a la enfermedad de Hansen .....	24
1.4.	Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de lepra. ....	28
1.4.1.	Antígeno PGL-I.....	28
1.4.2.	Antígeno LID-1 .....	30
1.5.	La Lepra en el Paraguay .....	31
1.6.	Antecedentes en la búsqueda de biomarcadores.....	34
2.	OBJETIVOS .....	36
2.1.	Objetivo general:.....	37
2.2.	Objetivos específicos:.....	37
3.	METODOLOGÍA .....	38
3.1.	Diseño y población de estudio .....	39
3.2.	Recolección de datos y toma de muestras .....	40
3.3.	Evaluación clínica de la población de estudio .....	41
3.4.	Detección de anticuerpos contra antígenos específicos de M. leprae 41	
3.4.2.	Detección de anticuerpos anti LID-1 .....	42
3.5.	Detección de ADN de M. leprae por qPCR.....	44
3.6.	Aislamiento de ARN y RT-qPCR con SYBR Green® para la evaluación de la expresión génica de citocinas.....	44
3.7.	Análisis estadísticos.....	46
4.	RESULTADOS .....	47
4.1.	Caracterización demográfica, clínica y epidemiológica de la población de estudio.....	48
4.2.	Evaluación de anticuerpos anti PGL-I y anti LID-1 en cada grupo de estudio 59	
4.3.	Detección de ADN de M. leprae en muestras de sangre periférica de pacientes y contactos intradomiciliarios.....	64

4.4.	Evaluación de la expresión génica de citocinas del perfil Th1 y Th2	69
5.	DISCUSIÓN .....	81
6.	CONCLUSIÓN .....	94
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96
8.	ANEXOS.....	108

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de la Lepra a nivel mundial en el año 2019. ....	20
Figura 2. Modelos animales para el estudio de la lepra. ....	22
Figura 3. Características clínicas de la lepra .....	23
Figura 4. Espectro inmunológico de la lepra según su clasificación clínica y posibles mecanismos de daño. ....	27
Figura 6. Prevalencia e Incidencia de Lepra en Paraguay del 2001 al 2015.....	32
Figura 7. Incidencia de Lepra en Paraguay desde el año 2003 hasta el 2020 .....	33
Figura 8. Incidencia de casos de Lepra en Paraguay en niños menores de 15 años en los años 2015 hasta 2019. Fuente Programa Nacional de Control de Lepra (PNCL). ....	33
Figura 9. Caracterización demográfica de pacientes Multibacilares y Paucibacilares estudiados.....	49
Figura 10. Ubicación geográfica de la residencia de los casos índices reclutados en el momento del diagnóstico según datos del Programa Nacional de Control de Lepra	51
Figura 11. Caracterización demográfica de contactos de pacientes Multibacilares y Paucibacilares.....	53
Figura 12. Porcentaje de hemoglobina glicosilada en la población de estudio.....	55
Figura 13. Hepatograma-enzimas hepáticas y bilirrubina en suero de pacientes al momento del diagnóstico, previo al tratamiento .....	56
Figura 14. Hepatograma-enzimas hepáticas y bilirrubina en suero de contactos al momento del diagnóstico del caso índice, previo al tratamiento .....	57
Figura 15. Representación gráfica de frecuencia absoluta y relativa de glóbulos blancos. Evaluación de anticuerpos anti PGL-I y anti LID-1 en cada grupo de estudio .....	58
Figura 16. Determinación del punto de corte de las pruebas de ELISA anti PGL-I y anti LID-1 .....	60
Figura 17. Evaluación de anticuerpos anti PGL-I y anti LID-1 .....	61
Figura 18. Perfil de anticuerpos anti PGL-I y anti LID-1 en los grupos de estudio.	62
Figura 19. Perfil de las pruebas de ELISA anti PGL-I y LID-1 en función al índice bacteriológico.....	64
Figura 20. Curvas de amplificación obtenidas mediante qRT-PCR con sonda para la evaluación del gen RLEP en muestras de sangre periférica de pacientes con lepra	67
Figura 21. Curvas de amplificación obtenidas mediante qRT-PCR con sonda para la evaluación del gen RLEP en muestras de sangre periférica de contactos.....	68

Figura 22. Evaluación de expresión génica del gen <i>housekeeping</i> RNaseP por RT-qPCR con SYBR Green® en sangre periférica de pacientes y contactos.....	69
Figura 23. Evaluación de expresión génica de IFN- $\gamma$ en sangre periférica por RT-qPCR con SYBR Green .....	70
Figura 24. Evaluación de expresión génica de IL-12 en sangre periférica por RT-qPCR con SYBR Green®. ....	72
Figura 25. Evaluación de expresión génica de IL1 $\beta$ en sangre periférica por RT-qPCR con SYBR Green® .....	73
Figura 26. Evaluación de expresión génica de IL-4 en sangre periférica por RT-qPCR con SYBR Green®. ....	74
Figura 27. Evaluación de expresión génica de citocinas en sangre periférica por RT-qPCR con SYBR Green®. ....	75
Figura 28. Electroforesis en agarosa al 1,5% de los productos de RT-qPCR de citocinas.....	77
Figura 29. Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de RT-qPCR de IL1 $\beta$ y RNaseP.....	77
Figura 30. Correlaciones entre las expresiones génicas de citocinas IFN- $\gamma$ e IL-12.....	80
Figura 31. Niveles de anticuerpos anti PGL-I y anti LID-1 en el seguimiento de pacientes con lepra .....	113

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Primers de citocinas empleados para la RT-qPCR .....	46
Tabla 2. Clasificación clínica y epidemiológica de los pacientes con lepra multi y paucibacilar .....	50
Tabla 3. Clasificación clínica y epidemiológica de los contactos de pacientes con lepra multi y paucibacilar.....	54
Tabla 4. Proporciones y frecuencias de pacientes MB serorreactivos anti PGL-I y anti LID-1 con respecto al IB.....	63
Tabla 5. Valores de Ct obtenidos con la evaluación del gen RLEP en muestras de sangre total de pacientes.....	65
Tabla 6. Valores de Ct obtenidos con la evaluación del gen RLEP en muestras de sangre de contactos .....	66
Tabla 7. Detección de ADN de <i>M. leprae</i> en muestras de sangre de pacientes y contactos.....	66
Tabla 8. Tamaño de los productos de amplificación en pares de base (bp).....	76
Tabla 9. Resultados de qPCR para RLEP, ELISA anti PGL-I/ LID-1 y niveles de expresión génica de citocinas en pacientes .....	78
Tabla 10. Resultados de qPCR para RLEP, ELISA anti PGL-I/ LID-1 y niveles de expresión génica de citocinas en contactos.....	79
Tabla 11. Características de péptidos empleados para la estimulación de sangre	110
Tabla 12. Valores de hemograma y hepatograma de los pacientes al momento del diagnóstico .....	111
Tabla 13. Valores de hemograma y hepatograma de contactos al momento del diagnóstico del caso índice.....	112

## ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud	PBS-T: Buffer fosfato salino con Tween 20
TT: Lepra Tuberculoide	BSA: Albúmina de suero bovino
BT: Lepra borderline tuberculoide	OD: densidad óptica
BB: Lepra borderline borderline	ADN: Acido desoxirribonucleico
BL: Lepra Borderline lepromatosa	ARN: Ácido ribonucleico
LL: Lepra lepromatosa	ML SON: <i>Mycobacterium leprae</i> sonificado
MB: Multibacilar	MIT: mitógeno
PB: Paucibacilar	GPT: transaminasa glutámico pirúvica
MDT: terapia multidrogas	GOT: transaminasa glutámico oxalacética
BCG: bacilo de Calmette-Guérin	GGT: Gamma-glutamyl transferasa
TR1: Reacción tipo 1	FA: Fosfatasa alcalina
TR2: Reacción tipo 2	BT: Bilirrubina total
BAAR: Bacilo acid alcohol resistente	BD: Bilirrubina directa
PGL-I: Glicolípido fenólico I	BI: Bilirrubina indirecta
LID-1: <i>Leprosy Infectious Disease Research Institute diagnosis -1</i>	HIV Ag/Ab: antígeno y anticuerpo anti virus de la inmunodeficiencia humana
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	HBsAg: antígeno del virus de la hepatitis B
IB: índice bacilosκόpico	HCV: virus de la hepatitis C
PNCL: Programa Nacional de control de Lepra	HTLV I y II: virus linfotrópico humano de células T tipo I y II
VIH: Virus de la inmunodeficiencia Humana	
EDTA: Etilen diamino tetra acético	

## **1. MARCO TEÓRICO**

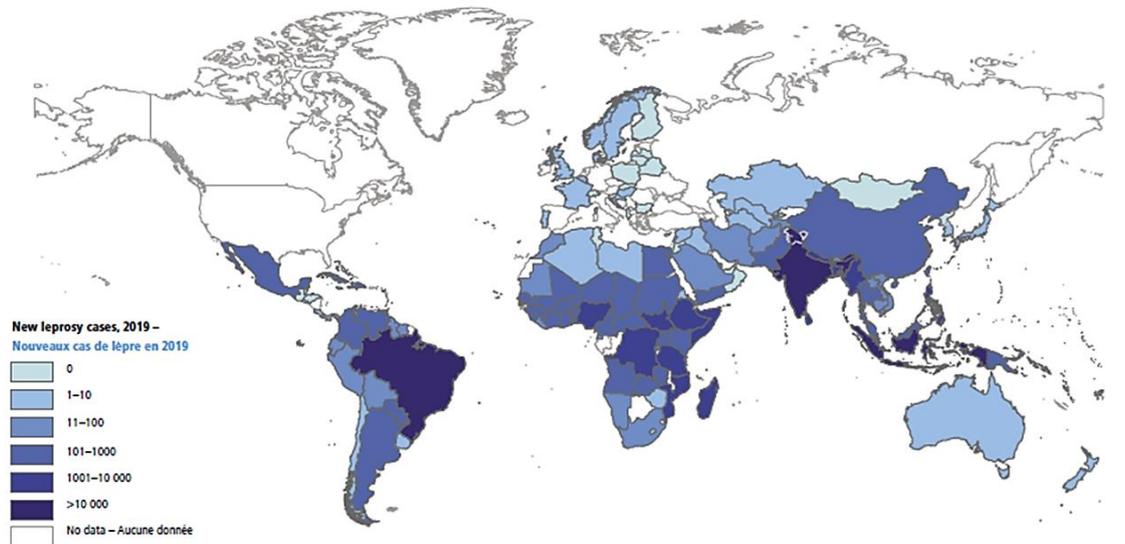
## **1.1. Generalidades de la enfermedad de Hansen o Lepra**

### **1.1.1. Epidemiología de la enfermedad**

La enfermedad de Hansen o Lepra es una enfermedad infecciosa granulomatosa crónica cuyo agente causal es *Mycobacterium leprae*. Esta micobacteria tiene un tropismo por la piel y células de Schwann de los nervios periféricos, presenta un período de incubación de un promedio de 5 años y puede avanzar a trastornos motores más graves conduciendo a discapacidades si los pacientes no reciben tratamiento o si reciben un diagnóstico tardío (1). La predilección del bacilo de la lepra por el sistema nervioso periférico causa entumecimiento, daño a los nervios y, gradualmente, la desfiguración de las extremidades y la descomposición de los tejidos, lo cual ha sido la causa fundamental del miedo y el estigma asociados con esta enfermedad durante siglos. Se trata de una enfermedad antigua, con informes de casos que datan desde hace más de 3000 años. Esta enfermedad parece haberse originado en África Oriental o en el Cercano Oriente y se extendió con sucesivas migraciones humanas. Más tarde los europeos o norteafricanos introdujeron la lepra en África occidental y las Américas en los últimos 500 años, según estudios de genómica comparativa (2,3).

En 1991 la Organización Mundial de la Salud (OMS) adoptó una resolución para eliminar la lepra como problema de salud pública para el año 2000, definiendo la eliminación como alcanzar un nivel de prevalencia por debajo de un caso por 10.000 habitantes a nivel global. En el año 2000 la OMS declaró a la lepra como enfermedad eliminada como problema de salud pública internacional, debido a una reducción global en la prevalencia. Aunque se alcanzó el objetivo, en la actualidad la lepra es considerada una enfermedad tropical desatendida, que todavía se presenta en más de 120 países, con más de 200.000 nuevos casos notificados cada año y es también considerada la enfermedad infecciosa que mayor deformidad física genera (4). En el 2019, Brasil, India e Indonesia notificaron más de 10.000 casos nuevos, mientras que otros 13 países: Bangladesh, República Democrática del Congo, Etiopía, Madagascar, Mozambique, Myanmar, Nepal, Nigeria, Filipinas, Somalia, Sudán del Sur, Sri Lanka y el República Unida de Tanzania, cada uno informó 1000 a 10.000 casos nuevos y 99 notificaron menos de 1000 casos nuevos, lo cual se puede

observar en la **Figura 1**, mapa de la distribución geográfica de los nuevos casos detectados en 2019 (4).



**Figura 1. Incidencia de la Lepra a nivel mundial en el año 2019.** Distribución geográfica de los nuevos casos de Lepra registrados a nivel mundial, según datos publicados por la OMS en el año 2020.

### 1.1.2. El agente etiológico, *Mycobacterium leprae*

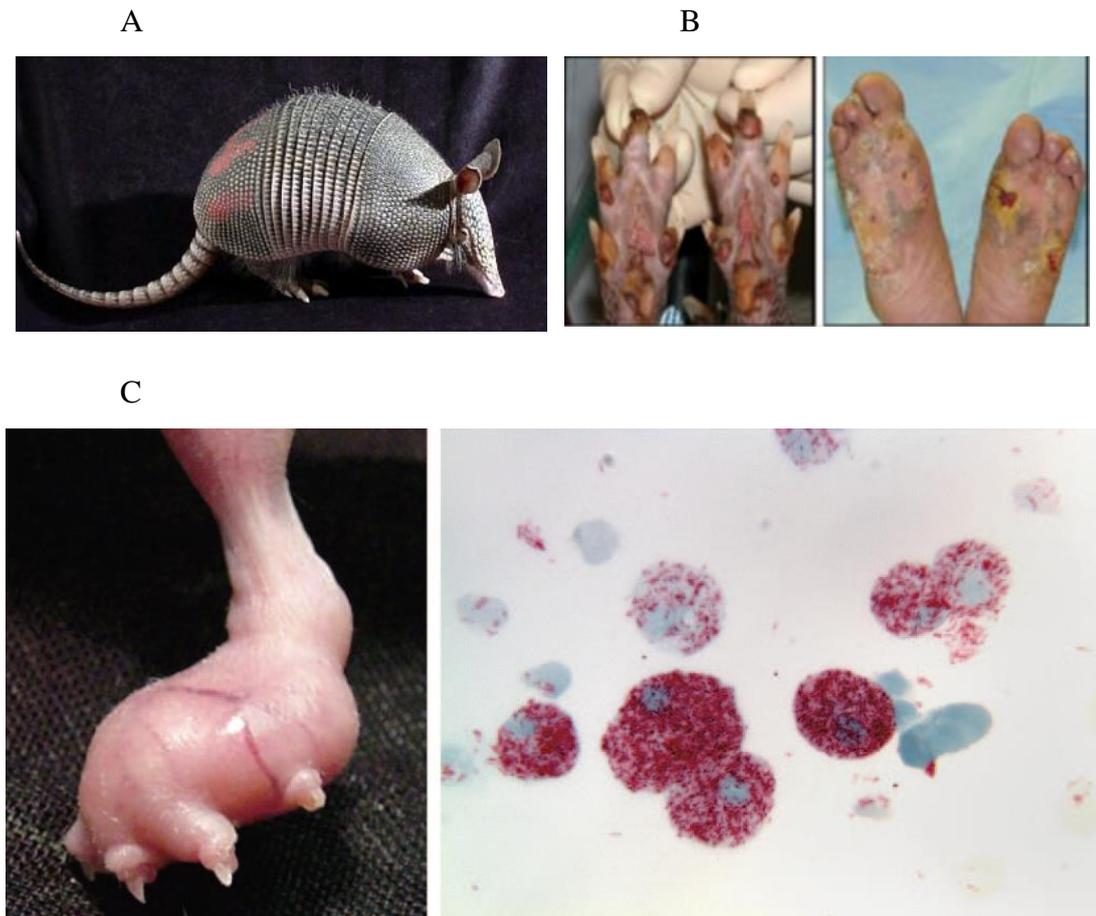
#### 1.1.2.1. Características generales y morfológicas

El agente causal de la lepra, *Mycobacterium leprae*, fue descubierto en 1873 por el médico noruego Gerhard Henrick Armauer Hansen. Con este descubrimiento histórico, *M. leprae* se convirtió en el primer patógeno bacteriano asociado con cualquier enfermedad humana. *M. leprae*, es una bacteria inmóvil, no formadora de esporas, microaerófila, de tinción ácido-resistente que por lo general forma varillas rectas o ligeramente curvas, es un patógeno intracelular obligado con un tropismo por los macrófagos y de manera característica, por las células de Schwann de los nervios periféricos. Una de las principales dificultades que presenta trabajar con *M. leprae* es que no se puede cultivar en medios artificiales y que su tiempo de duplicación en tejido es lento, casi 13 días (5).

### 1.1.2.2. Reservorio y transmisión

La infección por *M. leprae* probablemente ocurre a través de la piel o por las vías nasales, mediante mecanismos no definidos. El principal reservorio de infección es el hombre, sin embargo se han reportado infecciones adquiridas de forma natural en armadillos de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) y se manifiesta como una infección diseminada con características patológicas similares a los observados en los tejidos y nervios de los seres humanos con lepra (6). Se han detectado casos autóctonos registrados en el sur de los Estados Unidos, donde armadillos salvajes y pacientes con lepra estaban infectados con la misma cepa de *M. leprae*. Por esta razón los armadillos de nueve bandas son considerados un gran reservorio natural del bacilo y por ende la lepra puede ser una zoonosis en la región, aunque la dinámica de transmisión sigue siendo desconocida (7). El hecho de que hasta ahora la incidencia no haya disminuido significativamente en muchos países, ha llevado a especulaciones sobre otros posibles reservorios de *M. leprae*, como el suelo y el agua, lo cual ha llevado al desarrollo de investigaciones de búsqueda del bacilo en ese tipo de muestras en zonas endémicas, detectándose material genético de *M. leprae* en las mismas (8).

Gracias al descubrimiento de la infección del armadillo de nueve bandas, se obtuvieron cantidades suficientes de *M. leprae* para análisis biológicos e inmunológicos a partir de estos animales y debido a la gran carga de bacilos que albergan, se han convertido en el organismo preferido para propagar grandes cantidades de *M. leprae*, y ahora están avanzando como modelos de patogénesis de la lepra y daño nervioso **Figura 2 A y B** (6). Otro modelo de cultivo *in vivo* de *M. leprae* es la inoculación de bacilos en las almohadillas de pata de ratón, sean ratones normales o deficientes inmunológicamente, lo cual produce bacilos después de cinco a seis meses, aunque no se desarrolla ninguna enfermedad clínica **Figura 2 C** (9)



**Figura 2. Modelos animales para el estudio de la lepra.** A) Armadillo de nueve bandas B) Lesiones localizadas en patas de armadillos (izquierda) comparadas con pies de un paciente con lepra (derecha). C) Cultivo de *M. leprae* en almohadillas de patas de ratón (izquierda), macrófagos infectados obtenidos de cultivos de patas de ratón (derecha).

### 1.2. Características clínicas de la enfermedad, diagnóstico y tratamiento.

En un país o área endémico, se debe considerar que un individuo tiene lepra si muestra uno de los siguientes signos cardinales: lesión cutánea compatible con lepra y con pérdida sensorial definida, con o sin nervios engrosados, frotis positivos de la piel, siendo considerado el paciente enfermo la principal fuente de contagio conocida, y se piensa que la transmisión ocurre por medio de las vías respiratorias (10). La presentación clínica varía en un amplio espectro, por lo cual el sistema de Ridley y Jopling la define en cinco tipos: lepra tuberculoide polar (TT), lepra tuberculoide borderline (BT), lepra borderline-borderline (BB), lepra borderline-lepromatosa (BL), y lepra lepromatosa polar (LL) **Figura 3** (11). Como la lepra se

manifiesta en una variedad de formas clínicas relacionadas con el tipo y la fuerza de la respuesta inmune, la OMS clasifica a esta enfermedad en dos tipos, primeramente la forma paucibacilar (PB) asociada a una fuerte respuesta inmune celular eficaz para reducir la multiplicación de *M. leprae* y es definida por la presencia de 1 a 5 lesiones cutáneas o 1 nervio deteriorado y segundo, la forma multibacilar (MB), asociada a una respuesta celular débil que permite la replicación libre de los bacilos en el cuerpo y se define por la presencia de más de 5 lesiones cutáneas o nervios deteriorados (12).



**Figura 3. Características clínicas de la lepra.** A) Lepra Lepromatosa o LL B) LL no tratada de característica mutilante C) Lepra Tuberculoide o TT D) Lepra Indeterminada o Borderline (13).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el diagnóstico aún se basa en el examen clínico una vez manifestadas las características clínicas, como lesiones en la piel y daños en los nervios periféricos, acompañado o no de un frotis de piel o examen patológico de biopsias. Actualmente no existen pruebas recomendadas para diagnosticar infección por *M. leprae* (lepra latente) entre contactos asintomáticos (14). A principio de los 80, la OMS introdujo una terapia multidrogas (MDT), una combinación de los antibióticos dapsona, rifampicina y clofazimina, con una duración de 6 meses en los casos PB y de 12 meses en los MB. Gracias al advenimiento de la MDT, más de 16 millones de personas han sido tratadas y curadas, esto debido a que la OMS realiza más de 200 envíos de medicamentos MDT, anualmente a más de 90 países. Por tanto, los medicamentos contra la lepra están disponibles de forma gratuita incluso en las partes más remotas del mundo (4). A pesar del éxito de la terapia con múltiples fármacos para reducir el número de casos de lepra registrados en todo el mundo, la evidencia sugiere que *M. leprae* continúa transmitiéndose (15).

Con respecto al seguimiento, en Brasil una vez detectado el caso índice además del tratamiento aplicado al mismo, se realiza una re-vacunación a los contactos con la vacuna BCG o bacilo de Calmette-Guérin, la vacuna neonatal para la prevención de la tuberculosis. Hasta la fecha no existe ninguna vacuna específica para prevenir la enfermedad de Hansen, sin embargo, estudios en Brazil han evidenciado que la vacunación con BCG confiere un 68% de protección contra la lepra y con la revacunación este porcentaje aumenta (16). La justificación para usar BCG como vacuna contra la lepra se basa en el conocimiento de que *M. leprae* y *M. bovis* (BCG) comparten muchos antígenos con un alto grado de homología. En Brazil, los contactos sin cicatriz de BCG o con solo una cicatriz se vacunan, pero al tener dos cicatrices ya no se vacunan. En Brasil se considera que BCG brinda cierta protección contra la lepra (17).

### **1.3. Mecanismo inmunológico asociado a la enfermedad de Hansen**

La enfermedad de Hansen involucra complejos mecanismos inmunitarios del huésped constituyendo un importante modelo para la investigación de la respuesta inmune en humanos, ya que la diferencia entre las formas clínicas de la lepra se

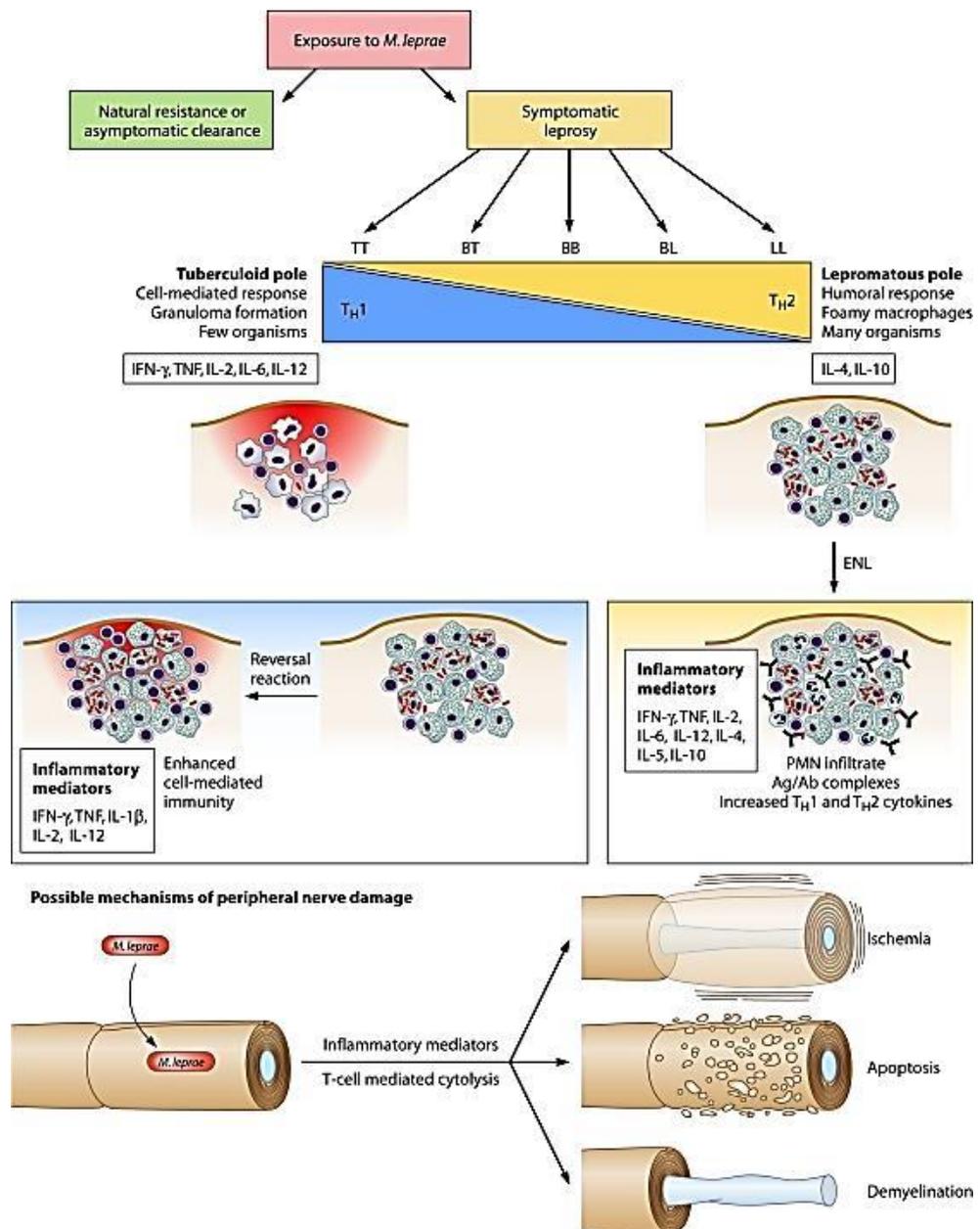
asocian con la respuesta inmune de los pacientes (18,19). De hecho, existe un paradigma inmunológico que resulta del análisis de citocinas producidas por linfocitos T CD4+, pudiendo generarse una respuesta de citocinas del perfil Th1 o del perfil Th2, **Figura 4** (20).

Por un lado, el polo tuberculoide, considerada la forma más resistente a la enfermedad, se caracteriza por presentar una baja carga bacilar, las lesiones de lepra tuberculoide tienen predominio de células T CD4+ y granulomas bien formados, asociada con un patrón de respuesta Th1 donde hay producción de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (21). Estas moléculas activan macrófagos que destruyen al bacilo debido a la liberación de radicales libres, además de la generación de un infiltrado granulomatoso compuesto por macrófagos y linfocitos (22). En este polo de la enfermedad, la inmunidad mediada por células se conserva y hay poca evidencia de inmunidad humoral específica de *M. leprae* (23).

Por el otro lado se encuentra el polo lepromatoso, considerada la forma más susceptible de la enfermedad, se asocia con un mayor número de lesiones y una modulación de la respuesta Th1 observada en el polo tuberculoide. Las lesiones de lepra lepromatosa se caracterizan por presentar numerosos linfocitos T CD8+ y macrófagos espumosos y la falta de linfocitos T CD4+(21). La producción de citocinas como IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ , que regula negativamente la respuesta Th1, inhibe la producción de citocinas proinflamatorias como también la respuesta microbicida de los macrófagos (24) produciéndose una sólida formación de anticuerpos pero que no es protectora, y la inmunidad mediada por células está ausente. Dentro de este paradigma inmunológico, existe además una subpoblación de células denominadas linfocitos T reguladores CD4+ CD25+ FoxP3+, las cuales desempeñan una función importante en la tolerancia inmunológica y así también se observó que juegan un papel importante en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmunosupresora que contribuye a la supervivencia del bacilo *M. leprae* en la forma más susceptible de la enfermedad (25,26).

Muchos de los pacientes con lepra desarrollan reacciones leprosas, las cuales se observan principalmente en pacientes que presentan las formas intermedias de la enfermedad, ya sea, antes, durante o después del tratamiento con MDT (27). Si bien el mecanismo inmunológico de estas reacciones aún se conoce poco, la teoría principal de su aparición es que se deban a un disparo en la respuesta inmune a causa de los componentes antigénicos de la micobacteria, pudiendo generarse la reacción de tipo 1 (TR1), también conocida como reacción de reversión, caracterizada con una fuerte respuesta inmune mediada por células y un cambio hacia el espectro tuberculoide. Por el otro lado está la reacción tipo 2 (TR2), también conocida como eritema nudoso leproso (ENL), observada en los tipos LL o BL y se caracteriza por ser una afección inflamatoria aguda con altos niveles de factor de necrosis tumoral, infiltración de tejido por células CD4+, neutrófilos, depósito de inmunocomplejos y complemento, generando vasculopatía, paniculitis y uveítis asociadas a inmunocomplejos (28,29).

La lepra progresiva se caracteriza principalmente por la lesión de los nervios periféricos, observándose en biopsias inflamación peri e intraneural con influjo de células inmunitarias y formación de edema dentro de las vainas nerviosas, generándose la lesión de los nervios por compresión mecánica o isquemia (30). También existe la teoría del daño nervioso mediado por una respuesta inmunológica que eventualmente conduce a la desmielinización de los nervios debido a la inducción a la apoptosis de las células de Schwann de los nervios periféricos **Figura 4** (31).



**Figura 4. Espectro inmunológico de la lepra según su clasificación clínica y posibles mecanismos de daño.** Las manifestaciones de la lepra se clasifican en un espectro clínico de lepra TT, BT, BB, BL y LL, cada polo está asociado con un perfil inmune humoral (Th2) o un perfil mediado por células (Th1). Las reacciones de reversión reflejan un cambio repentino hacia el polo Th1 desde el estado BT, BB o BL y pueden provocar un daño nervioso irreversible. El ENL se asocia con la liberación sistémica de TNF e IL-4, un influjo de leucocitos y deposición del complejo antígeno-anticuerpo. El daño nervioso puede involucrar un mecanismo inmunológico, la isquemia o la desmielinización (32).

#### **1.4. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico de lepra.**

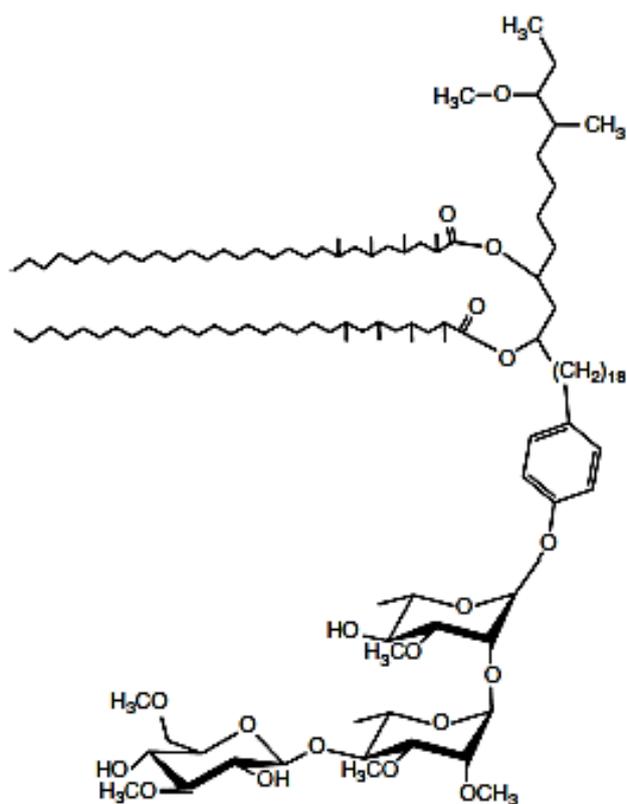
En la actualidad, no existe ninguna prueba de laboratorio que por sí sola se considere suficiente para diagnosticar la lepra (33). La demostración de la existencia de bacilos acidorresistentes sugiere la presencia de la enfermedad. Se realiza mediante una baciloscopía, técnica ampliamente utilizada en los laboratorios, que consiste en la realización de un frotis de linfa cutánea, para la enumeración semicuantitativa de organismos ácido alcohol resistente (BAAR) en la piel infectada, para lo cual se evalúa la carga bacilar calculando el índice bacilar (IB) y se expresa según una escala que va de 0 a 6+ (34). Además, se evalúa el índice morfológico (IM) mediante microscopía, que evalúa el porcentaje de bacilos vivos e infectantes por la morfología de los mismos. Esta prueba también es útil en el seguimiento de los pacientes durante y después del tratamiento, sin embargo en pacientes con la forma tuberculoide se dificulta visualizar estos bacilos y demostrar así su existencia (35).

No se disponen de pruebas serológicas para el diagnóstico de laboratorio de rutina aprobadas para la lepra, sin embargo, se encuentran disponibles herramientas empleadas como auxiliares en el diagnóstico o con fines de investigación, tales como, las pruebas serológicas con antígenos específicos de *M. leprae* como el glicolípido fenólico I (PGL-I), el antígeno leprosy IDRI diagnostic-1 (LID-1). Por otro lado, se cuentan con herramientas no serológicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigidos a diferentes dianas genómicas de *M. leprae* (36).

##### **1.4.1. Antígeno PGL-I**

La pared celular de *M. leprae* se caracteriza por presentar una estructura única rica en lípidos y similar en composición a otras paredes celulares micobacterianas, sin embargo hasta un 2% de su pared celular está compuesta de glicolípido fenólico-I (PGL-I), que se caracteriza por presentar un trisacárido antigénicamente específico exclusivo de *M. leprae*. El PGL-I fue uno de los primeros antígenos de *M. leprae* aislado y caracterizado, descubierto a principios de la década de 1980 (37). Su alta antigenicidad produce un alto título de anticuerpos IgM en pacientes con lepra lepromatosa (38).

Mediante un análisis químico se demostró que la estructura de PGL-I se compone de tres carbohidratos conocidos como 3-O-metil-ramnosa, 2,3-di-O-metil-ramnosa y 3,6-di-O-metil-glucosa, ligados glucosídicamente a un grupo fenilo, junto con una porción de ftiocerol con ácidos micocerósicos **Figura 5** (39).



**Figura 5.** Estructura química del PGL-I de la pared de *M. leprae*. Se muestra el trisacárido ligado al grupo fenilo y al ácido micocerosico.

El PGL-I en sí mismo o en forma de neoglicoproteínas semisintéticas que contienen el trisacárido conjugado químicamente con albúmina de suero bovino o humano (37), ha encontrado su mayor utilidad en el diagnóstico serológico y la confirmación de la lepra lepromatosa. Así también, este antígeno se ha implicado en el tropismo, adhesión y invasión de *M. leprae* por las células de Schwann, a través de la unión específica a la laminina de estas células (40). En estudios se ha visto que el PGL-I puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de las formas clínicas anérgicas de la enfermedad y en el daño tisular que se observa en los pacientes lepromatosos y durante los estados de reacción de la lepra, debido a que se cree que desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inmune llevando a la baja inflamatoria y la inhibición de la maduración y activación de las células dendríticas, facilitando así la persistencia de *M. leprae* (41).

El empleo de anticuerpos contra el glicolípido fenólico I (PGL-I), se ha propuesto como biomarcador predictivo para la progresión a la enfermedad en contactos. Sin embargo, se observó que la medición por sí sola de los anticuerpos anti-PGL-I no es suficiente (42). De hecho, en áreas endémicas se pueden observar valores elevados en individuos que no desarrollan la enfermedad debido a la continua exposición a micobacterias viables (43,44). Por otro lado, en individuos con índices bacterianos más bajos, este marcador presenta baja sensibilidad, llevando a la pérdida de potenciales casos PB (45). En la actualidad, se considera que los anticuerpos anti PGL-I ayudan en la detección de casos MB alcanzando una serorreactividad por encima del 80%, además en conjunto con datos epidemiológicos pueden indicar mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, sin embargo en casos PB la tasa de serorreactividad abarca sólo entre el 30% a 60% (46,47). Una estrategia que podría mejorar esta situación es la provisión de antígenos serológicos altamente específicos que puedan combinarse con PGL-I para mejorar la sensibilidad del diagnóstico (48).

#### **1.4.2. Antígeno LID-1**

Debido a que el diagnóstico serológico basado en el reconocimiento de anticuerpos del glicolípido fenólico I (PGL-I) no puede identificar de manera confiable a los individuos con índices bacterianos (IB) más bajos, se pensó en una estrategia que podría mejorar esta situación mediante la provisión de antígenos serológicos

altamente específicos que podrían combinarse con PGL-I para mejorar la sensibilidad del diagnóstico (48).

En estudios anteriores se han identificado un grupo de antígenos con potencial para diagnosticar la lepra. Las proteínas denominadas ML0405 y ML2331 codificadas por los genes ml0405 e ml2331 demostraron reactividad serológica en pacientes MB, razón por la que fue creada una proteína de fusión quimérica denominada *Leprosy Infectious Disease Research Institute diagnosis -1* (LID-1) y se observó que es altamente reconocida por las inmunoglobulinas IgG de pacientes con lepra (49,50). Mediante inmunoensayos se verificó la reactividad de sueros de pacientes ante la presencia de la proteína recombinante siendo mayor en pacientes MB que en pacientes PB (90% y 60% respectivamente) (46). Para intentar lograr mayor sensibilidad, se desarrolló un test rápido que emplea NDO-LID, un conjugado de LID-1 con el disacárido NDO (porción serorreactiva del PGL-I), de manera a fusionar ambas pruebas serológicas en un solo test. El mismo presentó una sensibilidad del 97% frente a 92% del LID-1 y 87% del PGL-I en los ensayos de ELISA individuales en pacientes MB, presentando baja sensibilidad en pacientes PB (51,52).

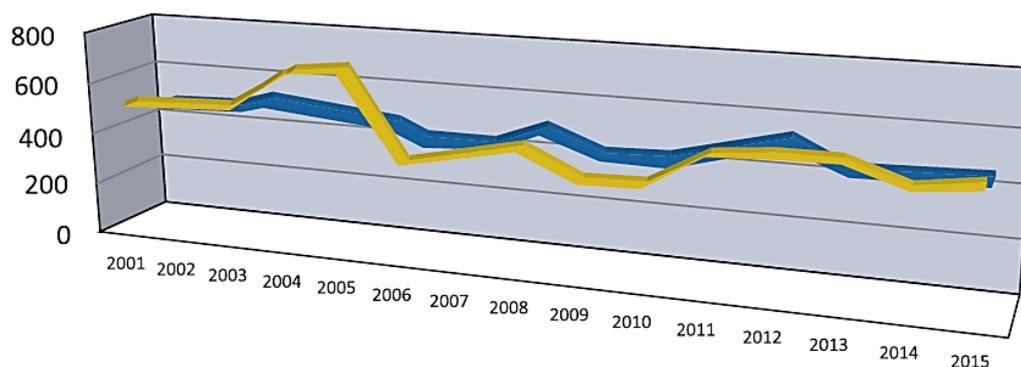
Además, se observó que el 10,4% de los contactos seropositivos para LID-NDO pueden desarrollar lepra en el futuro (49), razón por la cual, a pesar de las limitaciones que presentan estas pruebas serológicas en cuanto a la detección de casos PB, son pruebas útiles para ayudar a identificar contactos intradomiciliarios que requieran un seguimiento clínico riguroso (44,50,53).

### **1.5. La Lepra en el Paraguay**

En Paraguay la incidencia reportada de esta enfermedad se mantuvo en unos 400 casos nuevos por año durante el periodo del 2001 al 2015, de los cuales un 80% y 20% corresponden al tipo de lepra MB y PB, respectivamente y a partir del año 2016 hasta el 2019 se han detectado un promedio aproximado de 300 casos nuevos por año, como se pueden observar en la **Figura 6 y 7** (35). Si bien Paraguay es uno de los países que ha logrado la eliminación de la lepra como problema de salud pública alcanzando la prevalencia de menos de 1 caso por cada 10.000 habitantes en la población en general, la misma varía entre las regiones sanitarias. En el año 2015 se

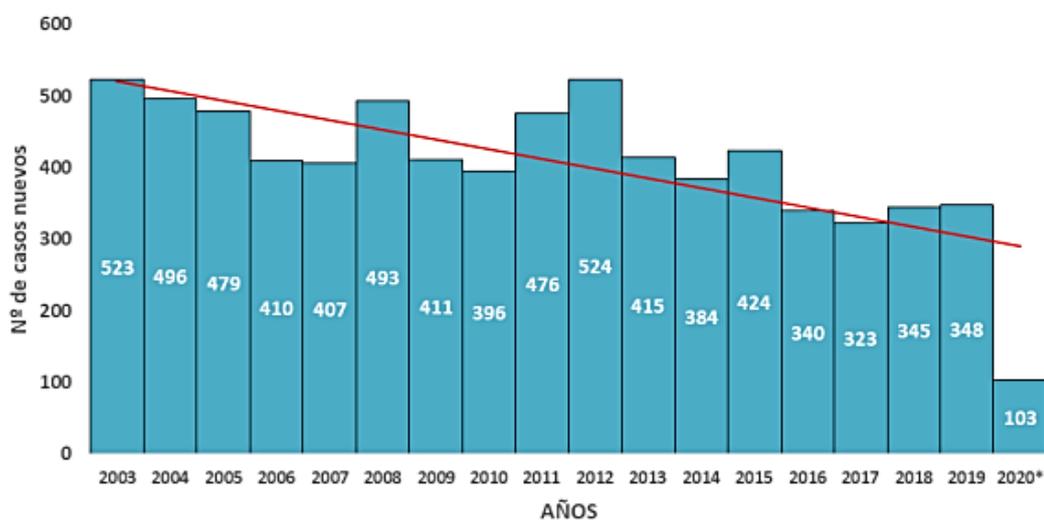
registró que San Pedro, Paraguari, Ñeembucú, Amambay, Boquerón y Alto Paraguay presentaron una tasa de prevalencia por encima de 1 caso por 10.000 habitantes. La transmisión continua en áreas endémicas probablemente se produce a partir del gran reservorio de individuos que están infectados de manera subclínica (54). Así, la detección precoz de infección por *M. leprae*, seguida de intervenciones efectivas, se considera clave para interrumpir la transmisión (15).

Los contactos intradomiciliares presentan mayor riesgo de contraer la enfermedad, razón por la cual uno de los pilares de la estrategia 2016-2020 de la OMS para el control de la lepra, es el seguimiento de dichos contactos, elaborando planes nacionales para la detección sistemática de los contactos directos, de manera a controlar la transmisión (16). Según datos del PNCL en el 2012 se examinó el 12% de los contactos, mientras que en el 2015 se avanzó a un 61%, sin embargo, no se alcanzó el 85% como recomendado por la OMS (35).



	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
■ prevalencia	527	510	537	689	713	356	414	458	356	357	484	507	506	424	460
■ detección	467	467	523	496	480	404	403	487	404	392	460	515	414	381	423

**Figura 6.** Prevalencia e Incidencia de Lepra en Paraguay del 2001 al 2015. Fuente Programa Nacional de Control de Lepra (PNCL)



\* Julio/2020

**Figura 7. Incidencia de Lepra en Paraguay desde el año 2003 hasta el 2020.** Fuente Programa Nacional de Control de Lepra (PNCL)

La lepra es más común en adultos, sin embargo, el brote de casos en niños y adolescentes muestra la circulación activa del bacilo, con su transmisión continua y la presencia de obstáculos en el sistema de salud para controlar esta enfermedad (55). En el Paraguay se han registrado un promedio de 10 casos de niños menores de 15 años diagnosticados con la enfermedad siendo entre un 1% a 4% del total de casos nuevos detectados al año, desde el 2015 hasta el 2019. En la **Figura 8** se presenta un gráfico de incidencia de Lepra en Paraguay, en niños menores de 15 años hasta el año 2019, datos publicados por el Programa Nacional de Control de Lepra (PNCL), en respuesta al marco de Estrategia mundial para la lepra 2016–2020 de la OMS (56).



**Figura 8. Incidencia de casos de Lepra en Paraguay en niños menores de 15 años en los años 2015 hasta 2019.** Fuente Programa Nacional de Control de Lepra (PNCL).

### 1.6. Antecedentes en la búsqueda de biomarcadores

Se han realizado esfuerzos para la generación de pruebas de diagnóstico precoces con el fin de disminuir la tasa de transmisión y sobre todo la aparición síntomas graves, sin embargo, en la actualidad aún no existen pruebas laboratoriales que diagnostiquen o predigan el desarrollo de la enfermedad. Por esta razón, continúa la búsqueda de biomarcadores para la elaboración de pruebas diagnósticas capaces de predecir el desarrollo de la enfermedad de manera a reducir la incidencia de discapacidad de grado 2 al garantizar que los que están en mayor riesgo sean diagnosticados y tratados a tiempo (57). En este contexto, se evaluó en sangre periférica el nivel de IFN- $\gamma$ , citocina del perfil Th1, ante la respuesta a antígenos específicos de *M. leprae* observándose que pacientes PB y sus contactos presentaron un nivel de producción alto de IFN- $\gamma$  en comparación con pacientes MB y sus contactos, resaltándose que estos contactos PB presentaban serología anti PGL-I negativo. Estos resultados en conjunto indican que la combinación de la serología con la evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  podrían ayudar a monitorear a contactos con baja exposición a la micobacteria (58). Sin embargo, se ha observado que a pesar de que el nivel de IFN- $\gamma$  ayuda a diferenciar pacientes PB de pacientes MB, el ensayo no discrimina la enfermedad PB activa de los contactos intradomiciliares o de controles sanos endémicos, en los cuales también se observa aumento en la producción de IFN- $\gamma$  en presencia del estímulo con antígenos de *M. leprae* (52). Adicionalmente, se han abordado estudios que analizan la producción de múltiples citocinas en sangre periférica de pacientes y contactos, ante la respuesta a antígenos específicos de *M. leprae*. Uno de ellos fue llevado a cabo en Brasil, para evaluar el impacto de las medidas de intervención para la prevención de la enfermedad en contactos de pacientes con lepra. En el mismo se ha reportado que posterior a la revacunación con BCG, hubo un aumento significativo de los niveles de producción de citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF, IFN- $\gamma$ , MIP1- $\beta$  y MCP-1 como un mecanismo de activación inmunitaria de los perfiles Th1/Th17 (59). Estos antecedentes indican que la evaluación de citocinas en respuesta a antígenos específicos de *M. leprae* podría ser útil para estudiar inicio y evolución de la enfermedad en contactos de pacientes con lepra con el fin de mejorar el diagnóstico de la enfermedad (51).

Por tanto, considerando la gravedad del cuadro clínico de la lepra y la dificultad de detectar los casos nuevos, se ha vuelto indispensable la identificación de biomarcadores que permitan el diagnóstico precoz de la infección por *M. leprae*. De hecho, uno de los pilares estratégicos de la OMS se basa en la promoción del diagnóstico precoz, y la vigilancia de contactos (15). Por esta razón se encuentra actualmente en ejecución en la Fiocruz (Brasil) un proyecto de búsqueda de biomarcadores en sangre y en colaboración, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IICS, se desarrolla el trabajo de investigación que lleva por título: “Caracterización molecular y celular de la respuesta inmune en contactos de pacientes infectados con *Mycobacterium leprae*”(código P15/2018), siendo el presente trabajo de tesis parte del mismo, con la finalidad de describir por vez primera en muestras biológicas paraguayas, la capacidad de *M. leprae* de modular la respuesta inmune, además de iniciar una red de investigación con el Programa Nacional de Control de Lepra. En el presente trabajo de tesis se aportan los primeros datos de caracterización inmunológica molecular de los pacientes de lepra en el Paraguay y de sus contactos intradomiciliarios. Los datos aportados servirán como base para futuros estudios que apunten al desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico precoz y la interrupción de la cadena de transmisión.

## **2. OBJETIVOS**

**2.1.Objetivo general:**

Caracterizar el perfil inmunológico molecular en sangre periférica de pacientes con lepra multibacilar, paucibacilar y sus contactos intradomiciliares que recurren al Programa Nacional de Control de Lepra entre los años 2018 a 2020 antes del inicio del tratamiento.

**2.2.Objetivos específicos:**

- Caracterizar demográfica, clínica y epidemiológicamente a los pacientes con lepra y a sus contactos intradomiciliares.
- Determinar la frecuencia de pacientes con anticuerpos anti LID-1 y anti PGL-I en suero de pacientes con lepra paucibacilar, multibacilar y en sus contactos intradomiciliares.
- Detectar la presencia del *M. leprae* en sangre de pacientes con lepra paucibacilar y multibacilar y en sus contactos intradomiciliares mediante qPCR.
- Determinar el nivel de expresión génica de citocinas de perfil Th1 y Th2 en sangre periférica de pacientes con lepra paucibacilar, multibacilar y en sus contactos intradomiciliares.

### **3. METODOLOGÍA**

### **3.1.Diseño y población de estudio**

Se realizó un estudio observacional descriptivo de corte transversal, con componente experimental, estudio piloto. Fueron reclutados pacientes adultos de ambos sexos, en el momento del diagnóstico de lepra (antes de iniciar el tratamiento con antibióticos) y sus contactos intradomiciliarios que acudieron al Programa Nacional de Control de Lepra (PNCL) durante los años 2018 a 2020. Los contactos fueron captados cuando acudían al PNCL como acompañantes de los pacientes o de lo contrario se realizó búsqueda activa en sus lugares de residencia reportados. Los sujetos reclutados cumplían los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

#### **Criterios de inclusión**

- Personas que acepten ser incluidas mediante un consentimiento informado.
- Adultos de ambos sexos con edad comprendida entre 18 y 65 años.
- Adultos recientemente diagnosticados con lepra multibacilar y paucibacilar mediante características clínicas y/o baciloscopia y los contactos intradomiciliarios de los casos índice.
- Personas que en el momento de la toma de muestra no estén cursando algún cuadro febril o alérgico.

#### **Criterios de exclusión**

- Personas VIH positivas
- Personas con enfermedades hepáticas infecciosas o no infecciosas
- Personas con cuadro diabético
- Personas que cursan con enfermedades inflamatorias
- Personas que consuman medicamentos inmunosupresores
- Mujeres en estado de embarazo

El tipo de muestreo fue no probabilístico por conveniencia de casos consecutivos hasta completar tamaño de muestra del estudio piloto. En cuanto al tamaño de muestra, inicialmente se propuso reclutar 10 pacientes multibacilares, 10 pacientes paucibacilares, siendo un total de 20 pacientes diagnosticados con la enfermedad y con respecto a los contactos, se propuso reclutar 10 contactos de pacientes multibacilares y 10 deberían ser contactos de pacientes paucibacilares, seleccionándose un máximo de 2 contactos por caso índice cuando el paciente diagnosticado presentaba un número elevado de contactos intradomiciliarios. Este

mecanismo de selección de contactos fue aplicado de manera a obtener un background genético variado del grupo de contactos.

Del total de pacientes y contactos reclutados, uno fue excluido del estudio por ser descartado como caso de lepra por el PNCL. Entonces, fueron reclutados en total 23 pacientes (14 pacientes MB y 7 pacientes PB), 17 contactos intradomiciliarios de los pacientes reclutados (14 contactos de pacientes MB y 3 contactos de pacientes PB). Los pacientes fueron diagnosticados en el PNCL empleando la clasificación de Ridley y Jopling para las formas clínicas de la lepra, basado en aspectos clínicos e histopatológicos y para el tratamiento se empleó la clasificación de la OMS.

El proyecto de tesis se encuentra enmarcado en un proyecto macro que busca además evaluar el perfil inmunológico humoral y celular posterior al tratamiento con antibióticos, por lo que a los pacientes y contactos reclutados se les realizó un seguimiento de 6 meses a 1 año según sean casos de lepra paucibacilar o multibacilar respectivamente.

### **3.2. Recolección de datos y toma de muestras**

Para cada sujeto de estudio, se procedió al llenado de fichas para la obtención de datos demográficos, clínicos y epidemiológicos. Para la toma de muestra fue organizado un taller de entrenamiento de toma de sangre total vía sistema vacutainer<sup>TM</sup>. El mismo fue organizado por el Depto. de Biología Molecular y Biotecnología (IICS), expertos de la empresa NIPRO y realizado en el Programa Nacional de Control de lepra. La toma de muestra de sangre fue realizada por personal del PNCL o personal del IICS en acompañamiento de un personal del PNCL en el momento del diagnóstico y previo al inicio del tratamiento. Se empleó el sistema de extracción al vacío de manera a asegurar un ambiente estéril en la recolección de las muestras de sangre. Fueron obtenidos 2 mL de sangre total en tubo seco (para la obtención de suero), 2 mL de sangre total en tubos con EDTA (para hemograma y hemoglobina glicada) y 10 mL de sangre total en tubos con heparina de litio, siendo una alícuota almacenada en un tubo Tempus (Applied Biosystems<sup>TM</sup> Tempus<sup>TM</sup> Blood RNA Tube), el cual contiene un estabilizador de material genético (para análisis de expresión de citocinas y detección de ADN de *M. leprae*). Una vez

obtenidas las muestras, personal del IICS las transportó al departamento de Biología Molecular y Biotecnología (IICS) cumpliendo con las normas de bioseguridad, en un rango de temperatura de 2 a 8 °C, antes de las dos primeras horas posterior a la toma de muestra y posteriormente se realizó la estimulación de la sangre heparinizada con antígenos específicos de *M. leprae*, según la metodología indicada en el ANEXO 1, para la obtención de plasma y separación de células.

Todos los datos obtenidos de los participantes (pacientes diagnosticados, contactos y controles) fueron registrados en una planilla de Excel, diseñada exclusivamente para uso en este estudio, en la cual se fueron registrando los datos obtenidos de los pacientes en las fichas clínicas, tales como datos generales, epidemiológicos y los datos que fueron obteniéndose con los ensayos realizados.

### **3.3. Evaluación clínica de la población de estudio**

Todos los pacientes y contactos reclutados fueron sometidos a una evaluación clínica laboratorial mediante estudios como hepatograma, para el análisis de la función hepática al momento del diagnóstico, pruebas de hepatitis B y VIH, así como pruebas de hemoglobina glicosilada para evitar la inclusión de sujetos que cursen con cuadro diabético y hemograma para la evaluación del nivel de recuento de glóbulos blancos. Las pruebas de hemograma, hemoglobina glicosilada y hepatograma, HIV y Hepatitis B fueron realizadas en colaboración con el Dr. José Pereira Brunelli, así como con la Dra. Maria Teresa Cuevas del Laboratorio Central del Hospital de Clínicas. Las técnicas utilizadas fueron sistemas automatizados usando la plataforma Architect (Abbott) para ensayos de quimioluminiscencia o de Química Clínica y el Cell-Dyn Ruby (Abbott) como analizador automático de hematología. Pruebas de inmunocromatografía para VIH y Hepatitis B fueron realizadas en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IICS.

### **3.4. Detección de anticuerpos contra antígenos específicos de *M. leprae***

#### **3.4.1. Detección de anticuerpos IgM anti PGL-I**

El ensayo de ELISA *in house* para detección de anticuerpos anti PGL-I en suero fue realizado en su totalidad localmente. Para ello, los anticuerpos IgM contra el antígeno PGL-I de *M. leprae* se detectaron según protocolo descrito anteriormente

(42), y siguiendo recomendaciones de la Fiocruz. Para ello, placas de ELISA Nunc de 96 pocillos, fueron sensibilizadas con ND-O-HSA (BEI Resources N° NR-19347), el cual es un glicoconjugado derivado del antígeno PGL-I, empleando 500 ng del antígeno por pocillo en 50 µl de buffer carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,6 a 4°C overnight. El antígeno no unido se eliminó lavando seis veces con 300 uL de buffer de lavado (PBS con Tween20 al 0,3%). Los pocillos fueron bloqueados con 50 uL de buffer de bloqueo (PBS-T0,3% + BSA al 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente fueron lavados con 300 uL de buffer de lavado 6 veces. Se realizaron diluciones 1:200 de los sueros de los sujetos de estudio y fueron agregados por pocillo 50 uL del diluido y se incubó por 1 hora a 37°C. Posterior a esto, los pocillos fueron lavados tres veces y se agregó el anticuerpo anti IgM humano conjugado con peroxidasa de rábano picante en una dilución de 1:5000 con PBS-Tween20 al 0,05% y BSA al 1%, incubándose por 1 hora a 37°C y luego se volvió a lavar 3 veces con el buffer de lavado. Posteriormente se agregó 100 uL del substrato TMB y se incubó por 4 min, luego se agregó 50 uL de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N para detener la reacción. Las lecturas fueron realizadas a una longitud de onda de 450 nm con un filtro diferencial de 630 nm.

#### **3.4.2. Detección de anticuerpos anti LID-1**

El ensayo de ELISA *in house* para detección de anticuerpos anti LID-1 en suero fue realizado en su totalidad localmente. Para la detección de anticuerpos contra la proteína de fusión quimérica LID-1, se siguió un protocolo descrito anteriormente (46) . Placas de ELISA Nunc de 96 pocillos, fueron sensibilizadas con 100 uL del antígeno LID-1 de concentración 1 ug/mL diluido en buffer carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6 y se incubó a 4°C *overnight*. Posteriormente se lavó 3 veces con 300 uL de buffer de lavado por pocillo, para eliminar todo el antígeno que no logró unirse. Luego fue adicionado 200 uL de buffer de bloqueo por pocillo y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Se procedió al lavado con 300 uL de buffer de lavado por triplicado y se adicionó 50 uL de suero diluido 1:200 en PBS-T 0,3% BSA 0,1% y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se procedió al lavado por triplicado y se adicionó 50 uL de anticuerpo IgG anti humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (Invitrogen ref.: A18805), en una dilución de 1:10.000 en solución PBS-T 0,3% BSA 0,1% y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente.

Se lavó por triplicado con buffer de lavado y se adicionó 100 uL de substrato TMB por pocillo, se incubó por 5 min cubriendo de la luz y la reacción se detuvo agregando 50 uL de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Las lecturas fueron realizadas a una longitud de onda de 450 nm con un filtro diferencial de 630 nm.

#### **3.4.2. Determinación del valor de corte (*cut-off*) para las pruebas de ELISA anti PGL-I y anti LID-1**

El valor de corte de la prueba de ELISA fue determinado a partir de 100 sueros de donantes sanos que fueron gentilmente donados por el banco de sangre de un hospital privado de Asunción. Fueron considerados como sanas aquellas personas que resultaban no reactivas para el tamizaje que incluye las siguientes pruebas (realizado como rutina por el banco de sangre del hospital):

- HIV Ag/Ab
- HBsAg
- HCV
- Chagas
- Sífilis
- Anti Core
- HTLV I y II

El *cut-off* se calculó sumando el doble de la desviación estándar al promedio de las densidades ópticas (OD). Para el anticuerpo anti PGL-I el valor de *cut-off* fue igual a 0,495 nm de OD, siendo considerada positiva toda muestra que superara ese valor.

El valor de punto de corte de la prueba de ELISA para el anticuerpo anti LID-1 es una densidad óptica (OD) igual a 0,485 nm, siendo considerada positiva toda muestra que superara ese valor.

Como control de calidad interno, en cada ensayo se procesaron controles positivos y negativos enviados por la FIOCRUZ-Brasil, cuyos valores de OD son conocidos. Además, las muestras de suero de los pacientes y contactos fueron enviadas al Laboratorio de Microbiología Celular (FIOCRUZ) para verificación de los resultados.

### 3.5. Detección de ADN de *M. leprae* por qPCR

Para la detección de ADN de *M. leprae* en muestras de sangre periférica de pacientes y contactos, conservada en tubo tempus® a partir del cual se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales empleando un kit de extracción comercial (Sacace Biotechnologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizó como control positivo material genético de la cepa de *M. leprae* Thai 53, donada por la FIOCRUZ-Brasil. Una vez obtenido el material genético, fue realizada una PCR en tiempo real, evaluando como gen blanco RLEP, el cual es un elemento repetitivo del genoma de la micobacteria, cuya secuencia de cebadores y sondas y protocolo de termociclado empleados fue la descrita por Martínez *et al*, 2009 (60). Por reacción se emplearon 400 nM de cebadores de sentido y antisentido y 200 nM de sonda marcada con FAM, se utilizó la TAKYON™ qPCR kit, colocando 12,5 µL de mix y 6,5 µL de material genético, completando con H<sub>2</sub>O RNase y DNase free hasta un volumen final de 25µL por reacción. En cuanto al límite de detección, se siguió lo propuesto por Martínez *et al*, (2009) siendo considerado como detectable un valor de ciclo de umbral o *threshold cycle*, Ct < 37. Como un control de calidad, todas las muestras fueron evaluadas con un control interno de amplificación, de manera a descartar algún proceso de inhibición de la reacción, para ello se empleó como gen blanco la RNAsaP humana, cuya secuencia de cebadores es la siguiente:

Cebador sentido: 5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'

Cebador antisentido: 5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'

### 3.6. Aislamiento de ARN y RT-qPCR con SYBR Green® para la evaluación de la expresión génica de citocinas

Para la evaluación de la expresión génica, se realizó extracción de ARN a partir de muestras de sangre heparinizada conservada en tubo tempus®, empleando el kit de extracción de ARN total que emplea un método de extracción por columnas, FavorPrep Tissue Total RNA Purification (FAVORGEN, Biotech Corp), siguiendo las indicaciones del fabricante y posteriormente el ARN obtenido fue cuantificado. Se evaluó la expresión de genes de las citocinas del perfil Th1: IFN-γ, IL-12, IL1β y del perfil Th2: IL-4. Para la realización de la RT-qPCR, para un volumen final de 13µL por reacción, se utilizó 6,5µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2x

(Applied Biosystems), 1,6 unidades de la enzima retro transcriptasa empleada fue M-MLV Reverse transcriptase (Promega) y se agregó por reacción 40 ng de material genético. Para cada citocina fue estandarizada la reacción según lo establecido por Rêgo, J.L. *et al*, 2018 (61) y recomendaciones de la Fiocruz, empleando los *primers* cuyas secuencias y concentraciones utilizadas se indican en la **Tabla 1**. Antes de la compra de *primers*, las secuencias fueron sometidas a control de calidad. Para ello se analizó su especificidad mediante NCBI tool Primer BLAST - NCBI – NIH. Luego se hizo un análisis *in silico* del producto de PCR con OligoAnalyzer TM (<https://www.idtdna.com>) para verificar el contenido de GC, la temperatura de fusión (melting) teórica, identificar el potencial de formación de estructura secundaria y el grado de dimerización. Esta temperatura de melting es teórica ya que tiene en cuenta las concentraciones de los componentes del mix de PCR. Y se desconocen algunos los detalles en mix comerciales como SybrGreen®.

Para las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL1 $\beta$ , las condiciones de termociclado comprendieron un paso inicial a 42 °C durante 1 hora, seguida de una incubación a 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, un *annealing* en gradiente que comienza en 65 °C hasta descender a 60 °C durante 10 segundos, extensión a 60 °C por 50 segundos. Para evaluar la calidad del proceso de amplificación se procedió a realizar la curva de *melting* del producto de PCR. La misma se obtuvo iniciando la desnaturalización con una temperatura de 65 °C subiendo 0,05 °C cada 0,5 segundos hasta alcanzar 95 °C. En cuanto a la IL-4 y la RNaseP, se ajustaron los parámetros de *annealing* a 67°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y en cuanto al protocolo de de curva de *melting*, se obtuvo iniciando la desnaturalización con una temperatura de 75 °C subiendo 0,4 °C cada 1 minuto hasta alcanzar 91 °C. Al finalizar el proceso se analizaron los gráficos de temperatura de *melting* experimentales.

Para la evaluación de la expresión génica de las citocinas, se empleó el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , según lo indicado por Livak y Schmittgen; 2001 (62), donde los datos son presentados como el cambio en la expresión del gen normalizado con un gen endógeno (*housekeeping*), en este caso se empleó la RNaseP, el cual es un gen humano constitutivo. Como calibrador fueron empleados ARN extraídos de

muestras de sangre de tres voluntarios sanos. En todas las corridas se utilizó un “No Target Control” (NTC) que consistió en el mix de PCR sin muestra biológica como control negativo. Para verificar que no exista amplificación inespecífica, se corrieron electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos

### 3.7. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron registrados en una planilla de Excel y se agruparon según el grupo de estudio (pacientes y contactos). Como el estudio es descriptivo, fue empleado esencialmente estadística descriptiva para el análisis de los datos (porcentajes, media y desviación estándar) y fue utilizado el software GraphPad Prism v8.0.1 para la realización de gráficos. Se realizó T-Student para evaluar el nivel de la expresión génica de citocinas en la población de estudio.

**Tabla 1.** Primers de citocinas empleados para la RT-qPCR

Primer	Secuencia	Concentración empleada (nM)	Tm teórico del producto (°C)*
IFN- $\gamma$ forward	5'-AGCCAACCTAAGCAAGATCCC-3'	150	79.6
IFN- $\gamma$ reverse	5'-TGCCATTAAGCACTGGCTC-3'		
IL-12 forward	5'-TGCCTTCACCACTCCCAAACC-3'	300	79.9
IL-12 reverse	5'-CAATCTCTCAGAAGTGCAAGGG-3'		
IL1 $\beta$ forward	5'-AATCTGTACCTGTCCTGCGTGTT-3'	150	78,6
IL1 $\beta$ reverse	5'-TGGGTAATTTTTGGGATCTACTACT-3'		
IL-4 forward	5'-AGGAAACCTTCTGCAGGGCT-3'	200	81,2
IL-4 reverse	5'-CAGCGAGTGTCCCTCTCATGG-3'		
TNF $\alpha$ forward	5'-TGGGATCATTGCCCTGTGAG-3'	300	81,2
TNF $\alpha$ reverse	5'-GGTGTCTGAAGGAGGGGGTA-3'		
IL-10 forward	5'-CCATTCCAAGCCTGACCACG-3'	300	80
IL-10 reverse	5'-TGTAGCAGTTAGGAAGCCCCA-3'		
IL-6 forward	5'-AACCTGAACCTTCCAAAGATGG-3'	150	72
IL-6 reverse	5'-TCTGGCTTGTTCCTCACTACT-3'		

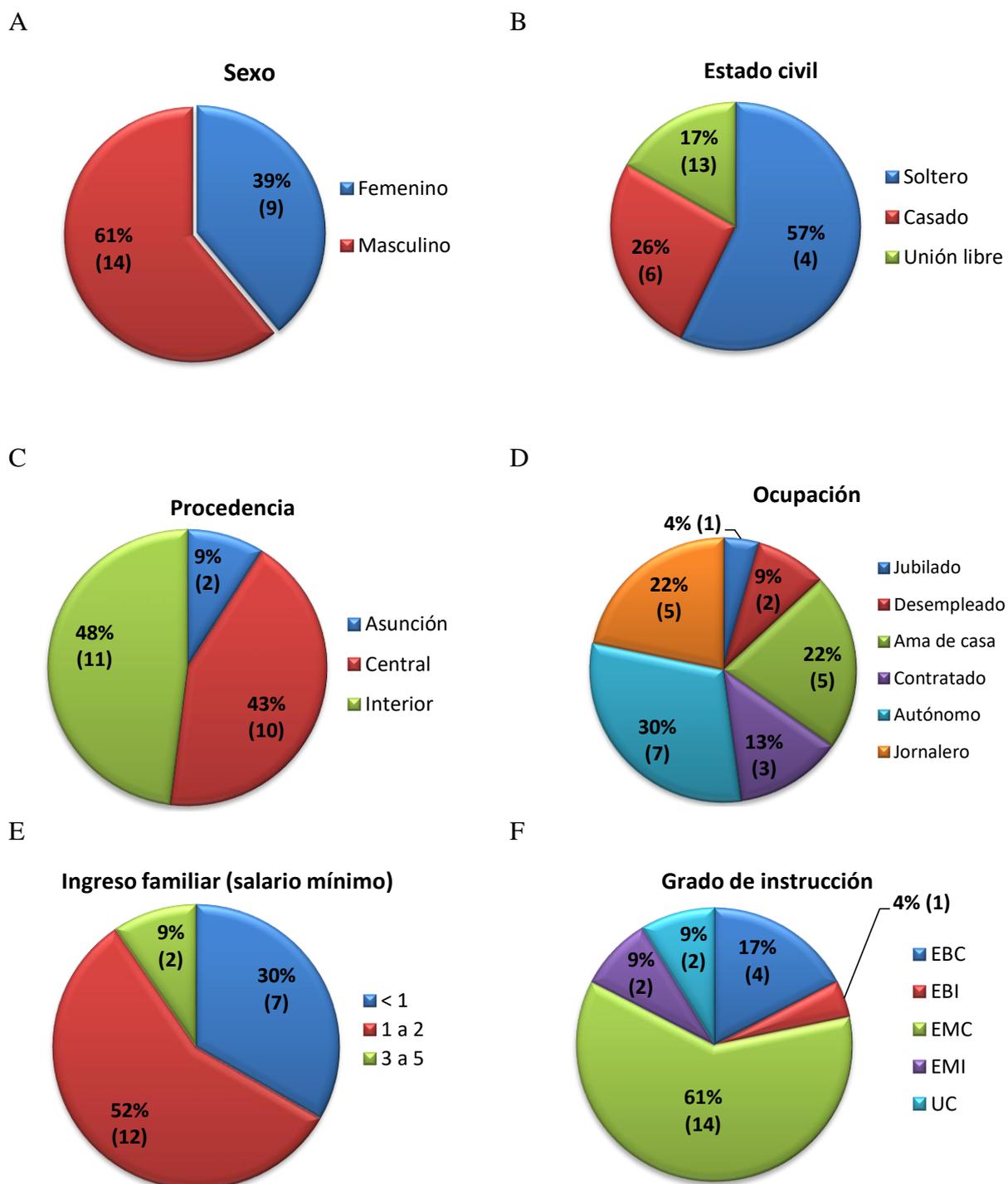
\*Calculado mediante **OligoAnalyzer**<sup>TM</sup> (<https://www.idtdna.com>)

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1. Caracterización demográfica, clínica y epidemiológica de la población de estudio**

Fueron incluidos un total de 23 pacientes, de los cuales 14 (61%) son hombres con edad promedio de  $37,3 \pm 13,1$  años y 9 (39%) son mujeres con edad promedio de  $45,5 \pm 15,5$  años (**Figura 9 A**). En cuanto a la clasificación clínica y operacional, 16 pacientes (70%) eran MB, siendo el de mayor frecuencia el tipo LL con un 43% y 7 pacientes (30%) eran PB, siendo el de mayor frecuencia el tipo TT y BT con 13% cada uno (**Tabla 3**). En cuanto a las variables demográficas, se observó que un alto porcentaje de pacientes provenían del interior, en un 48%, seguido del 43% proveniente del departamento Central y en menor proporción registraron que provenían de Asunción, con 9% (**Figura 9 C**). En la **Figura 10** se representa la distribución geográfica de los pacientes reclutados de acuerdo al lugar de residencia reportada por caso índice (A y B), como también los departamentos de los cuales provienen los mismos (C).

Una mayor frecuencia de los pacientes dedica su tiempo a realizar trabajos con ocupación autónoma (30%), siendo el salario mínimo el ingreso familiar preponderante, en un 52% **Figura 9 D y E**. Así también se observó que el 61% de los pacientes presentaban un grado de instrucción de educación media completa, seguido de 17% de pacientes con educación básica completa **Figura 9 F**. Con respecto a la caracterización epidemiológica, se observó que 50% de los pacientes convivían con enfermos de lepra, de los cuales 58% compartían la misma casa y el 59% de los pacientes convivían con 4 a 6 personas dentro de la misma casa. En cuanto a las prácticas conductuales que determinan el estilo de vida de los pacientes, se registró una menor frecuencia de pacientes que realizan ejercicios físicos (39%), una baja frecuencia registró hábitos de fumar (13%) y el 61% consumen bebidas alcohólicas, pero solo ocasionalmente. Como dato importante respecto al nivel de inmunización de los pacientes reclutados con la vacuna BCG, se observó que el 46% presentaba la cicatriz generada por la reacción ante la vacuna, **Tabla 2**.

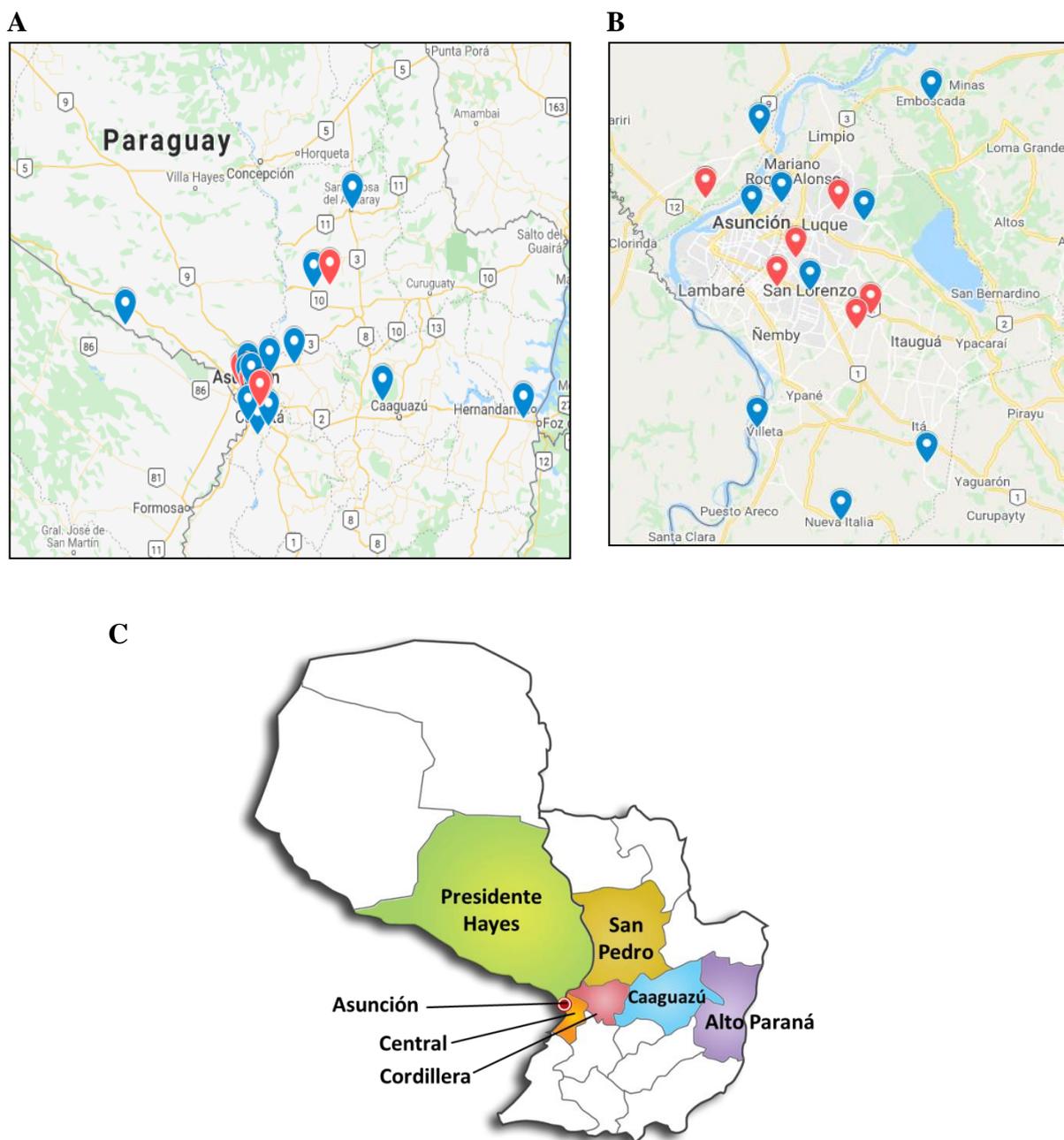


**Figura 9. Caracterización demográfica de pacientes Multibacilares y Paucibacilares estudiados.** N=23, dentro de cada gráfico se indican las frecuencias porcentuales y entre paréntesis la frecuencia absoluta A) Sexo B) Estado civil C) Procedencia D) Ocupación E) Ingreso familiar F) Grado de instrucción-educación: Básica completa (EBC), Básica incompleta (EBI), Media completa (EMC), Media incompleta (EMI), Universitaria completa (UC).

**Tabla 2. Clasificación clínica y epidemiológica de los pacientes con lepra multi y paucibacilar**

<b>Variables</b>	<b>Frecuencia Absoluta</b>	<b>Frecuencia Relativa</b>	<b>Frecuencia Porcentual</b>
<b>Epidemiológicas N=23</b>			
Convivencia con enfermos de lepra	12	0,5	50%
Tipo de convivencia			
Misma casa	7	0,58	58%
Otro domicilio	5	0,42	42%
Persona por casa			
1 a 3	8	0,36	36
4 a 6	13	0,59	59
>6	1	0,05	5
Cicatriz de BCG	11	0,46	46%
Práctica de ejercicios físicos			
Nunca	14	0,61	61%
2 veces por semana	5	0,22	22%
3 a 5 veces por semana	4	0,17	17%
Hábito de fumar	3	0,13	13%
Bebidas alcohólicas	14	0,61	61%
<b>Clínicas</b>			
<b>Clasificación clínica</b>			
LL	10	0,43	43%
BL	6	0,27	26%
TT	3	0,13	13%
BT	3	0,13	13%
BB	1	0,04	4%
<b>Clasificación operacional</b>			
MB	16	0,70	70%
PB	7	0,30	30%
<b>Baciloscopia Positiva</b>			
< 2 +	5	0,36	36%
2+ a 3,9 +	8	0,57	57%
> 3,9 +	1	0,07	7%

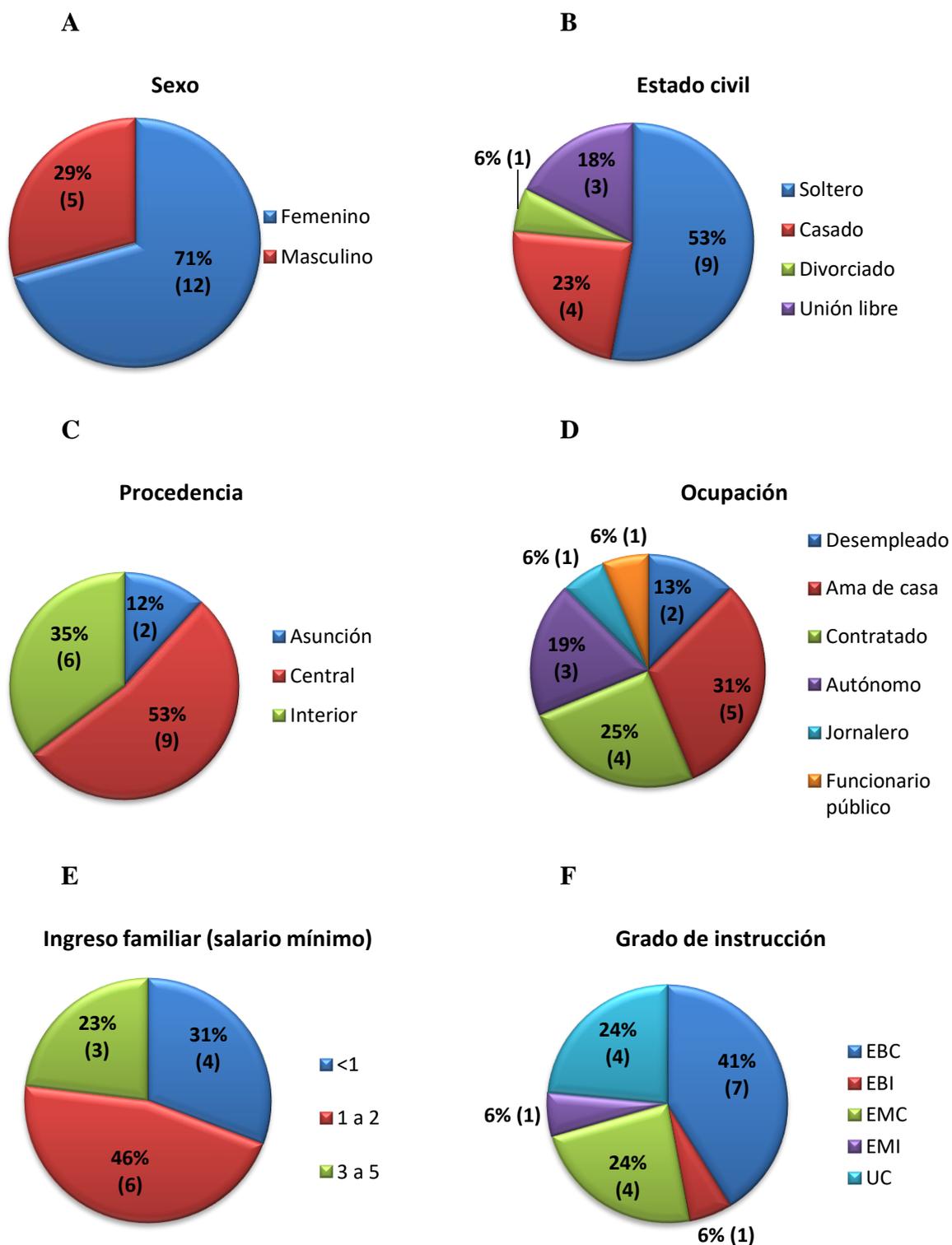
**BCG= vacuna Bacillus Calmette-Guerin; LL= lepra lepromatosa; BL=Borderline lepromatoso; TT= Lepra Tuberculoide; BT= Borderline Tuberculoide; MB= multibacilar; PB= Paucibacilar**



**Figura 10. Ubicación geográfica de la residencia de los casos índices reclutados en el momento del diagnóstico según datos del Programa Nacional de Control de Lepra.** Se presenta la ubicación geográfica de cada caso índice ingresado como sujeto de estudio. Los íconos azules indican los pacientes MB y los íconos rojos los pacientes PB. A) Visión general de las localizaciones. B) Acercamiento de la zona con ubicaciones superpuestas. C) Mapa político del Paraguay donde se indican los departamentos de los cuales provienen los pacientes reclutados.

Con respecto a los contactos intradomiciliarios, fueron incluidos un total de 17 contactos, de los cuales 12 (71%) eran mujeres, con un promedio de edad de  $31 \pm 11,4$  años y 5 (29%) eran hombres con un promedio de edad de  $51 \pm 14$  años (**Figura 11 A**). Según la clasificación operacional y clínica del caso índice, del total de contactos, 14 (82%) eran contactos de pacientes MB (53% eran contactos de pacientes LL y 29% eran contactos de pacientes BL) y 3 (18%) correspondían a contactos de pacientes PB (6% eran contactos de pacientes TT y 12% eran contactos de pacientes BT) (**Tabla 4**).

Se observó que el mayor porcentaje de los contactos eran de procedencia del departamento Central en un 53%, seguido de los contactos que proceden del interior del país, en un 35% y con menor frecuencia se registraron contactos en Asunción en 12% (**Figura 11 C**). La ocupación registrada con mayor frecuencia fue la de ama de casa, en un 31% y el ingreso familiar registrado en mayor proporción fue el salario mínimo en un 46%, seguido de un 31% que corresponde a contactos que ganan menos de un salario mínimo (**Figura 11 D y E**). En cuanto al grado de instrucción, el nivel académico registrado con mayor frecuencia fue educación básica completa en un 41%, seguida de educación media completa en un 24% (**Figura 11 F**). Con respecto a la caracterización epidemiológica y conductuales de los contactos, al igual que los pacientes, se observó una alta frecuencia de los contactos que viven con 4 a 6 personas por casa y con respecto a las prácticas conductuales que determinan el estilo de vida de los contactos, sólo el 23% realiza ejercicios físicos, el 6% presenta el hábito de fumar y el 53% consume bebidas alcohólicas, en su mayoría sólo de manera ocasional. Con respecto al porcentaje de inmunización de los contactos con la vacuna BCG, el 80% de ellos presenta la cicatriz de respuesta a esta vacuna, (**Tabla 3**).



**Figura 11. Caracterización demográfica de contactos de pacientes Multibacilares y Paucibacilares.** N=17, dentro de cada gráfico se indican las frecuencias porcentuales y entre paréntesis la frecuencia absoluta A) Sexo B) Estado civil C) Procedencia D) Ocupación E) Ingreso familiar F) Grado de instrucción educación: Básica completa (EBC), Básica incompleta (EBI), Media completa (EMC), Media incompleta (EMI), Universitaria completa (UC).

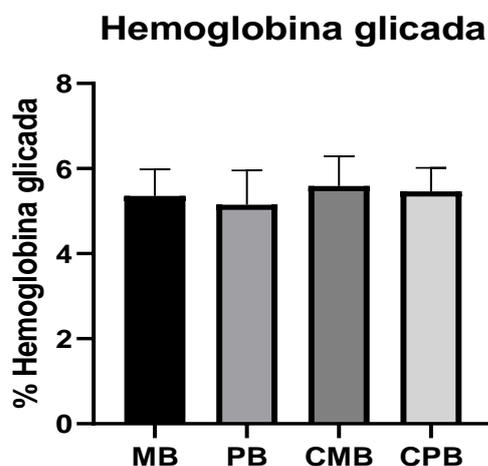
**Tabla 3. Clasificación clínica y epidemiológica de los contactos de pacientes con lepra multi y paucibacilar.**

Variables	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa	Frecuencia Porcentual
<b>Epidemiológicas</b>	<b>N=17</b>		
<b>Persona por casa</b>			
1 a 3	3	0,18	18%
4 a 6	9	0,53	53%
>6	3	0,18	18%
<b>Cicatriz de BCG</b>	12	0,8	80%
<b>Práctica de ejercicios físicos</b>	4	0,23	23%
<b>Hábito de fumar</b>	1	0,06	6%
<b>Bebidas alcohólicas</b>	9	0,53	53%
<b>Clínicas</b>			
<b>Clasificación clínica caso índice</b>			
LL	9	0,53	53%
BL	5	0,29	29%
TT	1	0,06	6%
BT	2	0,12	12%
<b>Clasificación operacional</b>			
MB	14	0,82	82%
PB	3	0,18	18%

BCG= vacuna Bacillus Calmette-Guerin; LL= lepra lepromatosa; BL=Borderline lepromatoso; TT= Lepra Tuberculoide; BT= Borderline Tuberculoide; MB= multibacilar; PB= Paucibacilar

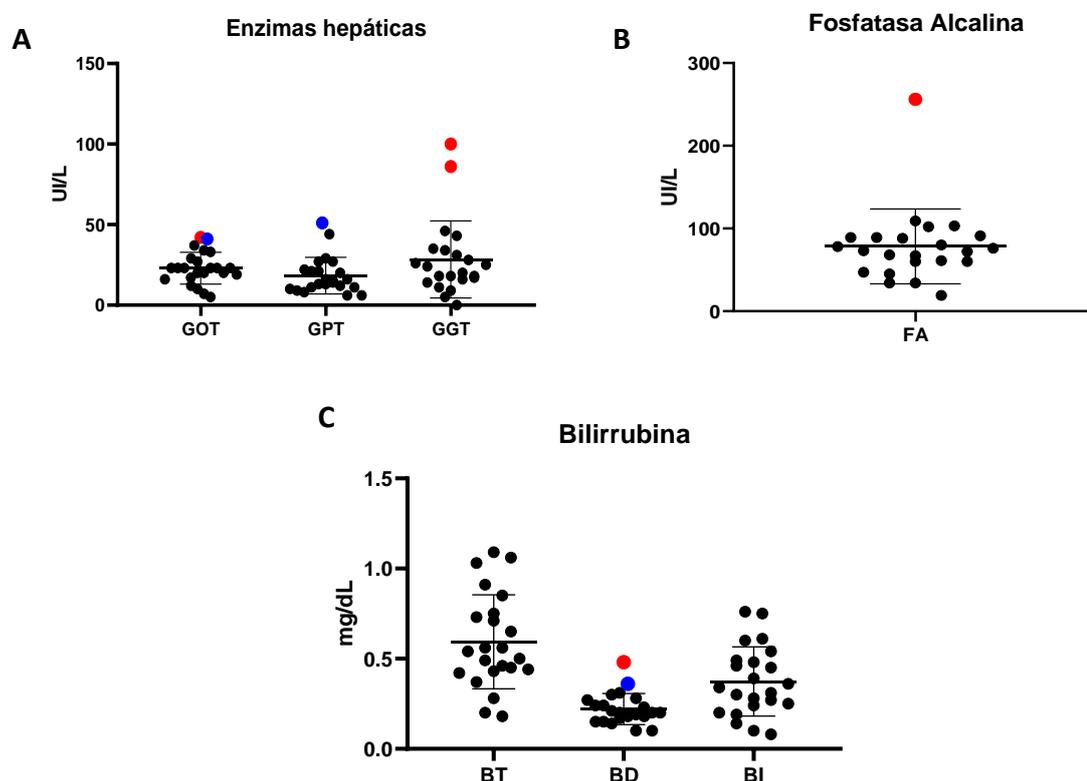
Para la evaluación clínica, primeramente se realizaron pruebas de inmunocromatografía y quimioluminiscencia para antígenos y anticuerpos contra HIV y hepatitis B, en los 23 pacientes así como en los 17 contactos intradomiciliarios. Todos los sueros de los individuos estudiados presentaron resultados negativos para HIV y hepatitis B.

Seguidamente se estudió el estado metabólico de los pacientes con respecto a la glucosa mediante una prueba denominada Hemoglobina glicosilada que mide el nivel promedio de glucosa en la sangre durante los últimos tres meses. El mismo es utilizado como marcador de Diabetes y pre- Diabetes. Con respecto a la evaluación del porcentaje de hemoglobina glicosilada en sangre total, todos los participantes presentaron valores inferiores a 6,5%, marcador que indica la ausencia del curso de diabetes en el momento del reclutamiento (**Figura 12**).

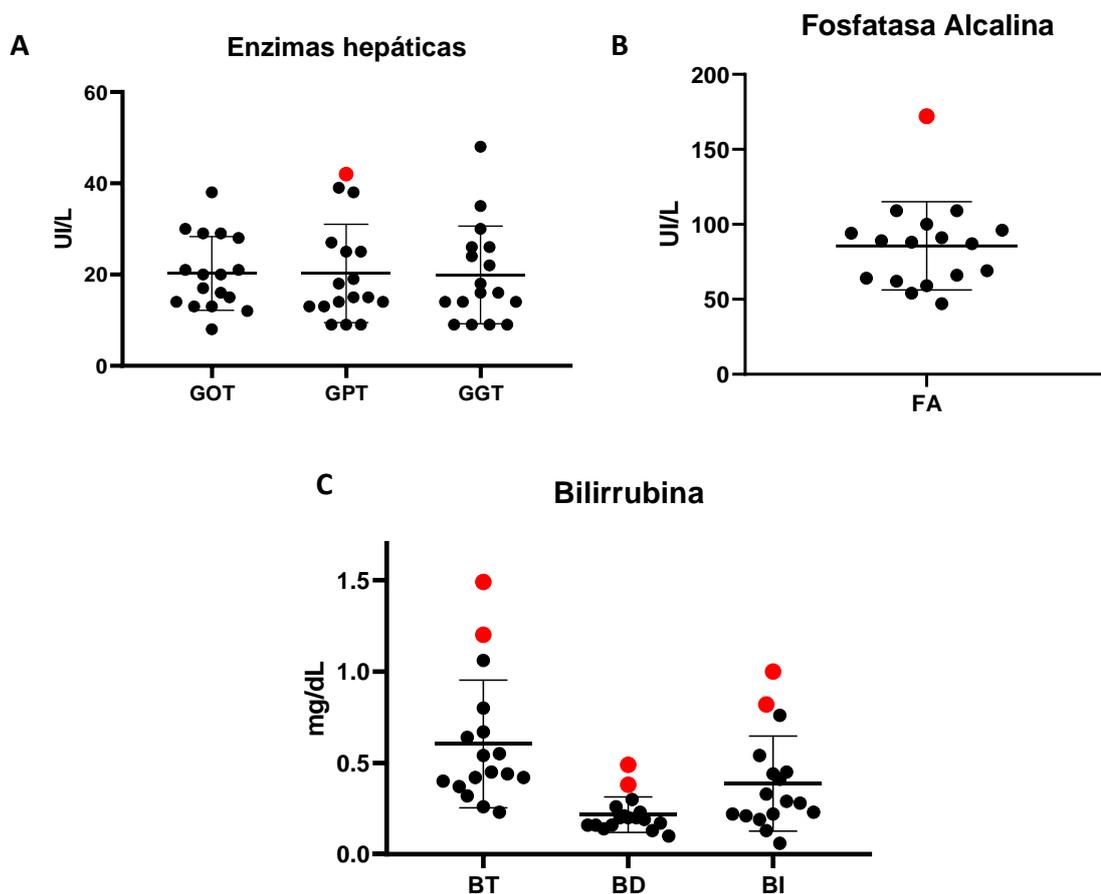


**Figura 12. Porcentaje de hemoglobina glicosilada en la población de estudio.** Representación gráfica del porcentaje de hemoglobina glicosilada detectada en los 23 pacientes y 17 contactos reclutados. Cada barra indica la media y la desviación estándar de los valores de cada grupo analizado. MB=multibacilar; PB= paucibacilar; CMB= contacto de multibacilar; CPB= contacto de paucibacilar. Ensayo de glucohemoglobina (HbA1c) automatizado para sangre completa realizado en Architect c4000, Abbott.

Para evaluar la funcionalidad hepática de los sujetos de estudio, se realizaron ensayos de perfil hepático en suero, cuyos resultados reflejaron que la mayoría de los pacientes y contactos presentaban valores dentro del rango normal, como se observa en la **Figura 13 y 14**. Entre las excepciones, en la cohorte de pacientes MB (puntos rojos), uno presentó valores alterados de GOT y BD, otro presentó valores elevados de GGT y FA y otro sólo GGT. En cuanto a los contactos MB dos contactos presentaron valores elevados de BT, BD y BI, otro sólo de FA. En la cohorte PB (puntos azules), un paciente presentó valores levemente elevados de GOT y GPT, otro sólo presentó valores elevados de BD.

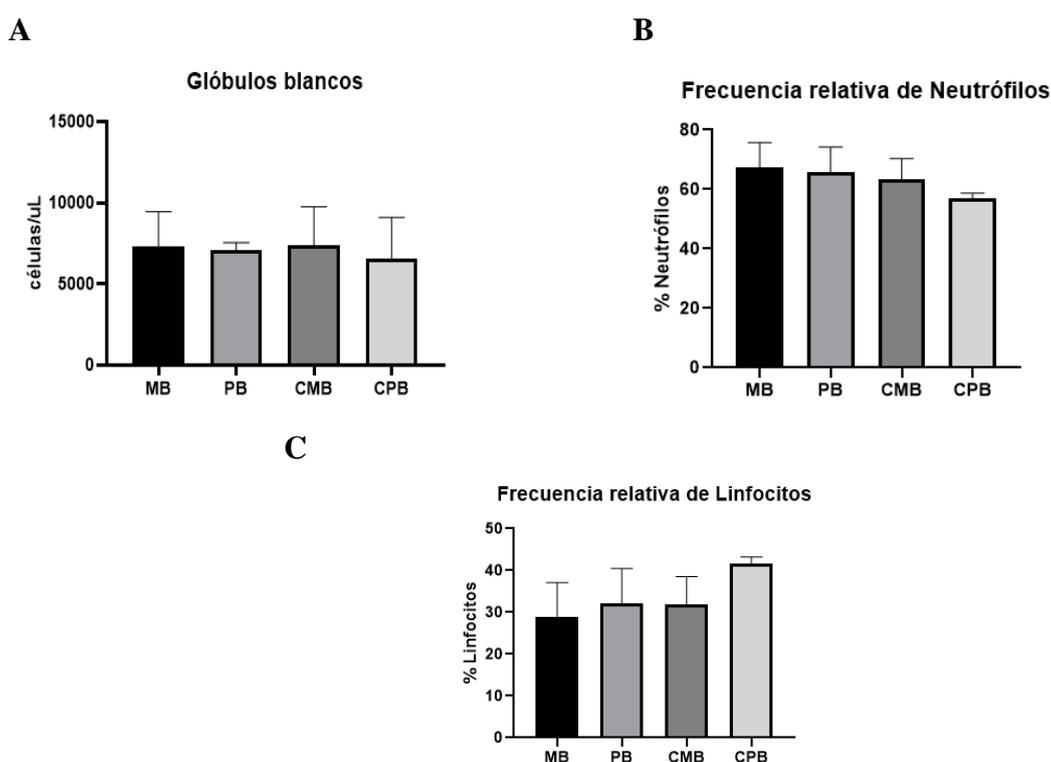


**Figura 13. Hepatograma-enzimas hepáticas y bilirrubina en suero de pacientes al momento del diagnóstico, previo al tratamiento.** Hepatograma de 23 pacientes, (rojo pacientes MB con valor alterado y azul pacientes PB con valor alterado) A) Enzimas hepáticas GOT, GPT y GGT B) Fosfatasa alcalina C) Bilirrubina. Valores de referencia en UI/L: GOT <40; GGT 9 a 64; GPT <40; FA 40 a 150. En mg/dL: Bilirrubina Total (BT) 0,00 a 1; Bilirrubina directa (BD) 0,00 a 0,25; Bilirrubina indirecta (BI) 0,00 a 0,75. Ensayo automatizado para suero realizado en Architect c4000, Abbott.



**Figura 14. Hepatograma-enzimas hepáticas y bilirrubina en suero de contactos al momento del diagnóstico del caso índice, previo al tratamiento.** Hepatograma de 17 contactos intradomiciliarios de pacientes al momento del diagnóstico (rojo CMB con valor alterado y azul CPB con valor alterado). Valores de referencia en UI/L: GOT <40; GGT 9 a 64; GPT <40; FA 40 a 150. En mg/dL: Bilirrubina Total (BT) 0,00 a 1; Bilirrubina directa (BD) 0,00 a 0,25; Bilirrubina indirecta (BI) 0,00 a 0,75. Ensayo automatizado para suero realizado en Architect c4000, Abbott.

Otra variable clínica evaluada en la población de estudio en general fue el recuento de glóbulos blancos, obtenidos mediante una prueba de hemograma y como se muestra en la **Figura 15** donde se representan en forma general los niveles de glóbulos blancos en pacientes MB, PB, contactos MB y contactos PB. Se observó que tanto los pacientes como los contactos intradomiciliarios presentaban en promedio, valores normales de frecuencia absoluta de glóbulos blancos (A) y frecuencia relativa, tanto de neutrófilos (B) como de linfocitos (C). En Anexo 1 se puede encontrar la tabla con resultados del hemograma de los individuos estudiados.



**Figura 15. Representación gráfica de frecuencia absoluta y relativa de glóbulos blancos.** A) Gráfico de frecuencia absoluta de glóbulos blancos, B) Frecuencia relativa de Neutrófilos y C) Frecuencia relativa de linfocitos. MB: Paciente multibacilar (n=16), PB: Paciente paucibacilar (n=7), CMB: Contacto de paciente multibacilar (n=9), CPB: Contacto de paciente paucibacilar (n=3).

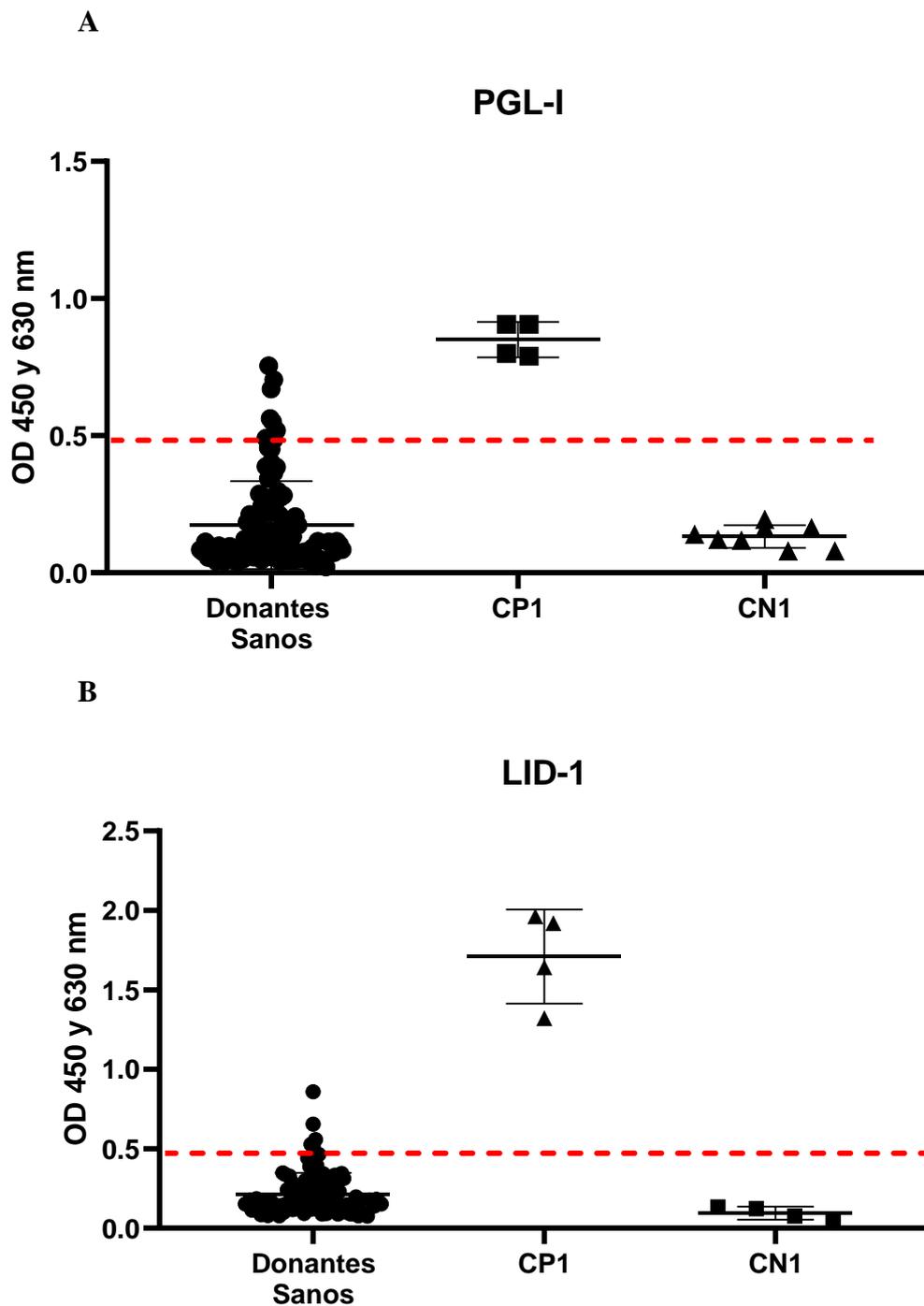
#### 4.2. Evaluación de anticuerpos anti PGL-I y anti LID-1 en cada grupo de estudio

Se evaluó por vez primera la producción de anticuerpos IgM anti PGL-I e IgG anti LID-1 en pacientes MB, PB y respectivos contactos intradomiciliarios de nuestro país.

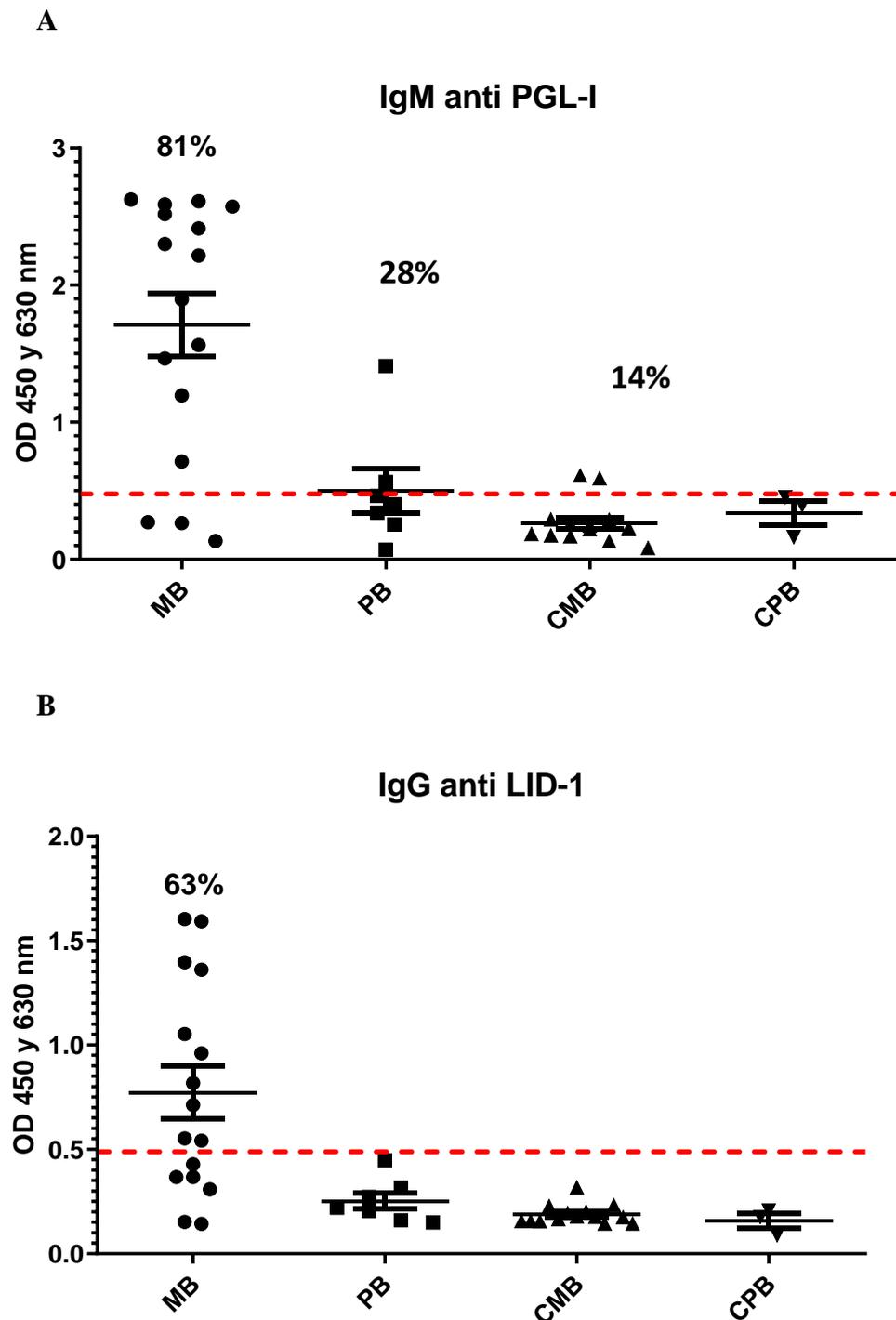
Inicialmente se procedió a estandarizar las pruebas de ELISA *in house*, siguiendo el protocolo recomendado por la Fiocruz. Para determinar el valor de punto de corte o *cutoff* de cada prueba, se analizaron 100 muestras de suero de donantes saludables de un banco de sangre de un hospital privado de la capital. El punto de corte fue calculado mediante el promedio del valor de OD más el doble de la desviación estándar. Para la prueba de ELISA anti PGL-I, el promedio de densidad óptica de los 100 donantes fue 0,174 con una desviación estándar de 0,161 dando un valor de punto de corte igual a 0,495. En cuanto a la prueba de ELISA anti LID-1, el promedio de OD de los donantes sanos fue 0,216 con una desviación estándar de 0,132 dando un valor de punto de corte igual a 0,481 (**Figura 16**).

Luego se procedió a la detección de anticuerpos IgM anti PGL-I en sueros de pacientes con lepra y contactos, observándose serorreactividad en el 65% del total de los pacientes y en el 12% del total de contactos. En el grupo de pacientes, resultaron serorreactivos 81% de los pacientes multibacilares, 28% de los pacientes paucibacilares y en el grupo de contactos, resultaron serorreactivos 14% de los contactos multibacilares. Ningún contacto paucibacilar resultó ser serorreactivo (**Figura 17 A**).

De igual manera, se procedió a la detección de los anticuerpos IgG anti LID-1, observándose serorreactividad en el 63% de los pacientes, de los cuales todos eran pacientes multibacilares. No se observó serorreactividad en ningún paciente paucibacilar, ni en ningún contacto intradomiciliario (**Figura 17 B**).

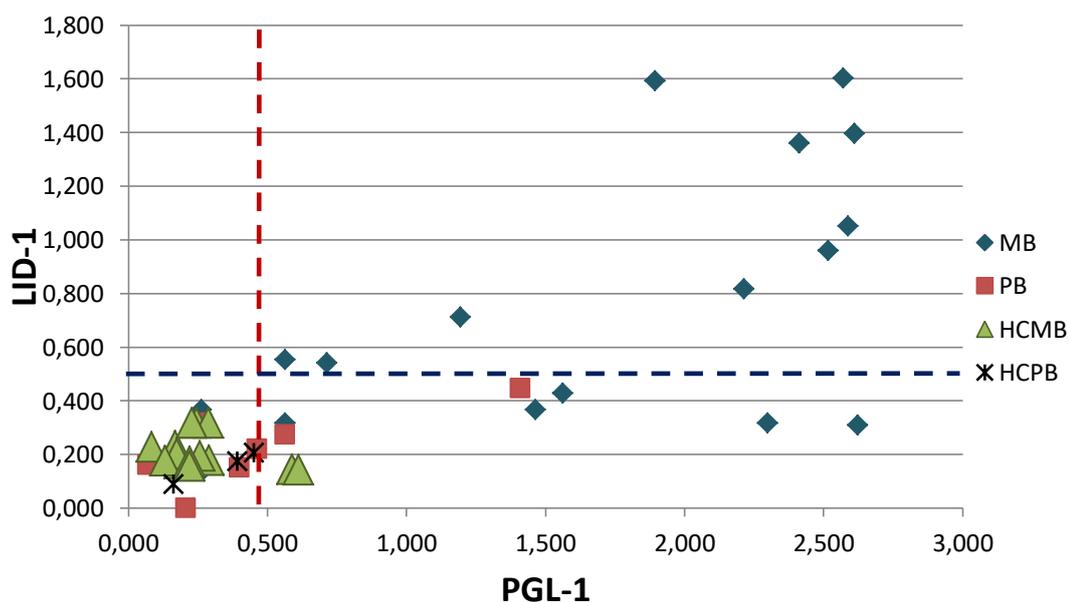


**Figura 16. Determinación del punto de corte de las pruebas de ELISA anti PGL-I y anti LID-1 en sueros de donantes sanos.** Se muestran los valores de OD a 450 nm y 630 nm de cada donante sano ( $n=100$ ) en A) ELISA anti PGL-I y B) ELISA anti LID-1, donde las líneas rojas discontinuas indican el valor de punto de corte para cada prueba. CP1 corresponde al control positivo y CN1 al control negativo incluidos en cada ensayo. Los valores se representan con una línea horizontal que indica el promedio de los mismos acompañado de la barra de desviación estándar.



**Figura 17. Evaluación de anticuerpos anti PGL-I y anti LID-1.** Representación gráfica de los valores de OD obtenidos en sueros de pacientes con lepra MB (n=16) y PB (n=7) y sus contactos (MB n=14 y PB n=3) ante A) el antígeno PGL-I y B) el antígeno LID-1. La línea roja discontinua representa el punto de corte cada prueba, siendo 0,495 para PGL-I y 0,481 para LID-1 respectivamente. MB: pacientes multibacilares, PB: pacientes paucibacilares, CMB: contactos multibacilares, CPB: contactos paucibacilares.

Con el fin de visualizar la proporción de pacientes y contactos que resultaron serorreactivos para ambos PGL-I y LID-1, se graficó las OD obtenidas ante el LID-1 en función a las OD obtenidas ante el PGL-I, observándose que 10 pacientes MB resultaron ser serorreactivos para ambos antígenos, representando el 43% del total de pacientes reclutados, como se observa en la **Figura 18**.



**Figura 18. Perfil de anticuerpos anti PGL-I y anti LID-1 en los grupos de estudio.** Representación gráfica de las OD obtenidas en las pruebas de ELISA anti LID-1 en función a las obtenidas en PGL-I. La línea discontinua roja indica el punto de corte de la prueba anti PGL-I (0,495) y la azul de anti LID-1 (0,481).

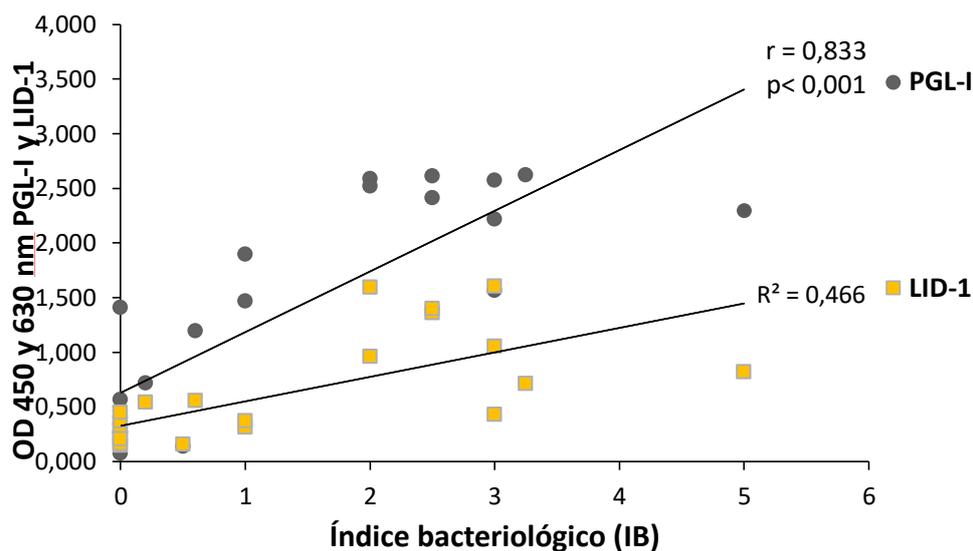
MB: pacientes multibacilares, PB: pacientes paucibacilares, CMB: contactos multibacilares, CPB: contactos paucibacilares.

El índice bacteriológico (IB) de los pacientes es considerado una medida de estimación de la carga bacilar y se ha descrito una relación directa con el nivel de anticuerpos detectados (49), por lo que utilizamos el resultado de baciloscopía para evaluar la calidad de nuestro ELISA *in house*. Cabe mencionar que los valores de índice bacteriológico fueron determinados en el laboratorio de microbiología del Programa Nacional de Lepra, a partir de la baciloscopía. Para facilitar su análisis, como se puede observar en la **Tabla 4**, los IB fueron estratificados en tres grupos: menor a 2 cruces (< 2+), de 2 a 3,9 cruces (2+ a 3,9+) y mayor a 3,9 cruces (> 3,9+). Se pudo observar que a medida que aumentaba el IB, aumentaba la frecuencia de pacientes positivos para ambos anticuerpos IgM anti PGL-I e IgG anti LID-1, observándose 28% de positivos para ambos anticuerpos en pacientes con IB <2+, esta frecuencia aumenta a 87,5% en pacientes con IB de 2+ a 3,9+ y el único paciente con IB > 3,9+ también presentó PGL-I y LID-1 positivo. Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluaron las OD obtenidas en ambas pruebas en función al índice bacteriológico, observándose una correlación positiva y estadísticamente significativa (**Figura 19**).

**Tabla 4. Proporciones y frecuencias de pacientes MB serorreactivos anti PGL-I y anti LID-1 con respecto al IB**

Grupo	IB	Número de muestras	PGL-I	LID-1	PGL-I y LID-1
MB	< 2 +	7	4/7 (57%)	2/7 (28%)	2/7 (28%)
	2+ a 3,9 +	8	8/8 (100%)	7/8 (87,5)	7/8 (87,5)
	> 3,9 +	1	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)
<b>Total</b>		<b>16</b>	<b>13/16 (81%)</b>	<b>10/16 (62%)</b>	<b>10/16 (62%)</b>

MB=multiplicar, IB=índice bacteriológico. Punto de corte de la prueba de ELISA para anti PGL-I=0,495 y para anti LID-1= 0,485.



**Figura 19. Perfil de las pruebas de ELISA anti PGL-I y LID-1 en función al índice bacteriológico.** La OD de la prueba de ELISA anti PGL-I en función al índice bacteriológico mostró una correlación significativa (correlación de Pearson; \* $p < 0,001$ ).

#### 4.3. Detección de ADN de *M. leprae* en muestras de sangre periférica de pacientes y contactos intradomiciliarios

A partir de muestras de sangre heparinizada y con estabilizador de material genético (Tempus), se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales y se procedió a la detección de ADN de *M. leprae* evaluando el gen RLEP. Los resultados obtenidos por paciente y contacto se muestran en la **Tabla 5 y 6**, interpretándose como “detectable” cuando el *cycle threshold* (Ct) o ciclo umbral de la muestra es menor a 37 y “no detectable” cuando supera este valor.

El ADN de *M. leprae* fue detectado en 16/23 (70%) de muestras de sangre del total de pacientes (MB y PB), siendo que dentro del grupo MB fue detectado en 11/16 (69%) y dentro del grupo PB fue detectado en 5/7 (71%). Así también se observó que fue detectado en 7/17 (41%) del total de contactos, siendo que en contactos de pacientes MB se detectó en 5/14 (36%) y en contactos de pacientes PB 2/3 (67%). Los valores de Ct se pueden visualizar en la **Tabla 7**. Las curvas de amplificación obtenidas se muestran en la **Figura 20 y 21**.

**Tabla 5.** Valores de Ct obtenidos con la evaluación del gen RLEP en muestras de sangre total de pacientes.

<b>Clasificación Operacional</b>	<b>Paciente</b>	<b>Valor de Ct RLEP</b>	<b>Resultado</b>	
MB	1	34,38	Detectable	
	2	31,09	Detectable	
	5	NA	No detectable	
	6	33,9	Detectable	
	7	38,82	No detectable	
	8	34,01	Detectable	
	9	39,22	No detectable	
	10	35,4	Detectable	
	12	34,93	Detectable	
	13	29,63	Detectable	
	15	NA	No detectable	
	16	NA	No detectable	
	17	31,25	Detectable	
	18	32,02	Detectable	
	19	32,55	Detectable	
	20	33,57	Detectable	
	PB	3	NA	No detectable
		4	36,87	Detectable
		11	34,59	Detectable
		14	30,29	Detectable
21		32,08	Detectable	
22		36,5	Detectable	
23		NA	No detectable	

NA: no amplifica

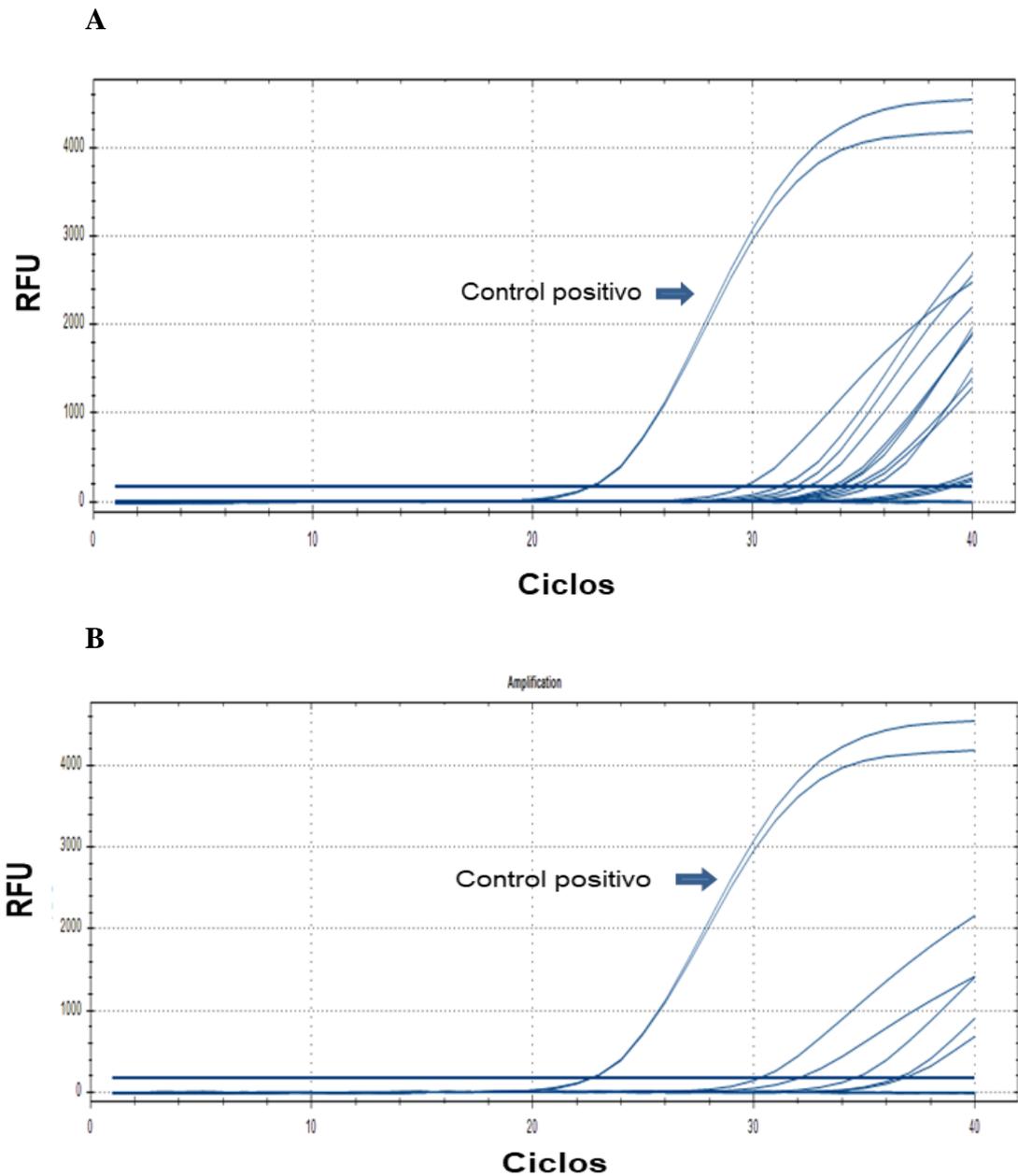
**Tabla 6.** Valores de Ct obtenidos con la evaluación del gen RLEP en muestras de sangre de contactos

Clasificación operacional Caso Índice	Contacto	Valor de Ct RLEP	Resultado
MB	1	NA	No detectable
	2	36,12	Detectable
	3	32,97	Detectable
	4	34,1	Detectable
	5	NA	No detectable
	6	37,51	No detectable
	7	NA	No detectable
	8	35,11	Detectable
	9	36,31	Detectable
	10	39,56	No detectable
	11	NA	No detectable
	12	NA	No detectable
	13	NA	No detectable
	14	NA	No detectable
PB	15	32,12	No detectable
	16	35,11	Detectable
	17	39,13	No detectable

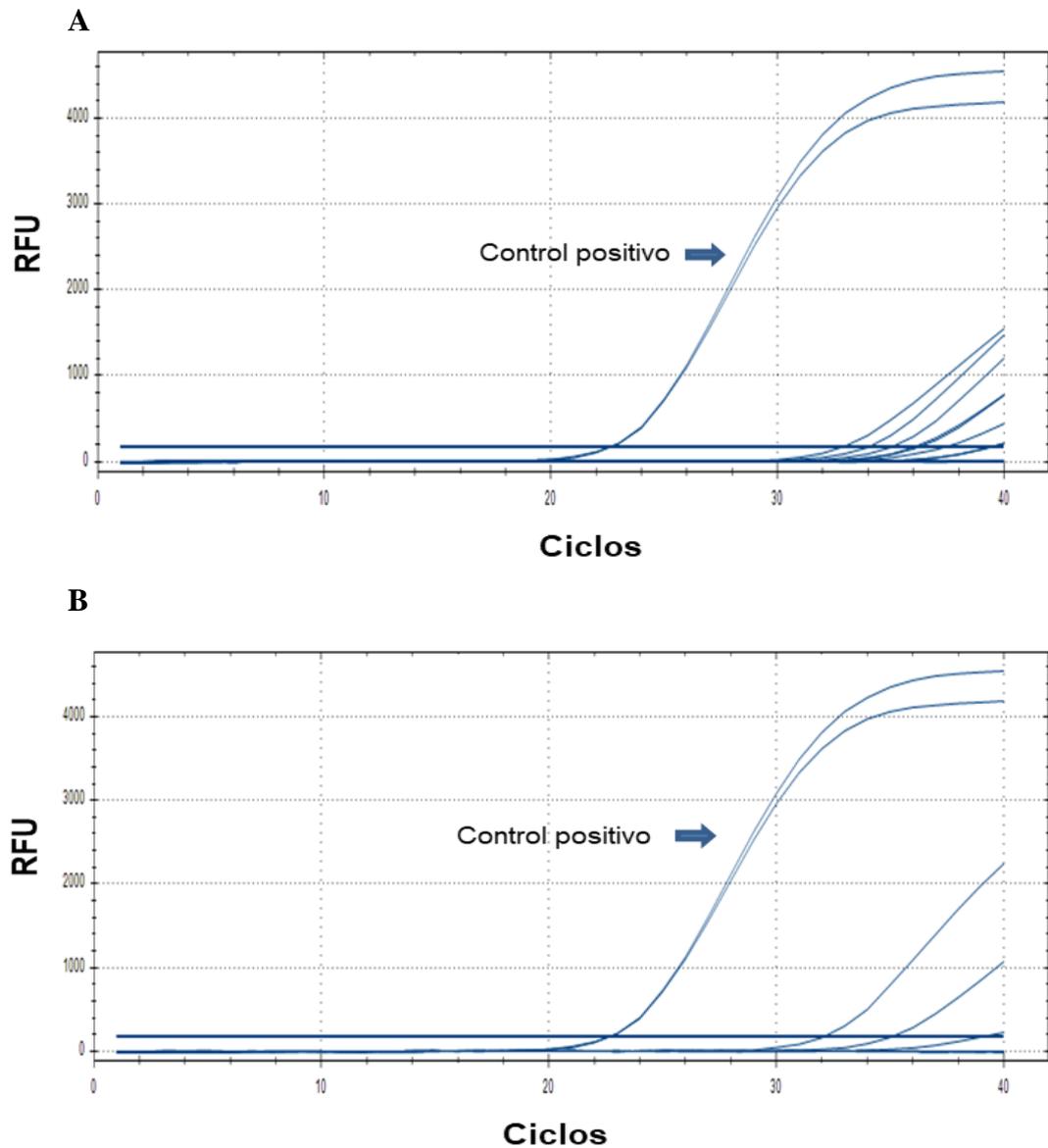
NA: no amplifica

**Tabla 7.** Detección de ADN de *M. leprae* en muestras de sangre de pacientes y contactos

Sujetos de estudio	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa porcentual (%)
<b>Pacientes</b>		
MB	11/16	69
PB	5/7	71
Total	16/23	70
<b>Contactos</b>		
CMB	5/14	36
CPB	2/3	67
Total	7/17	41



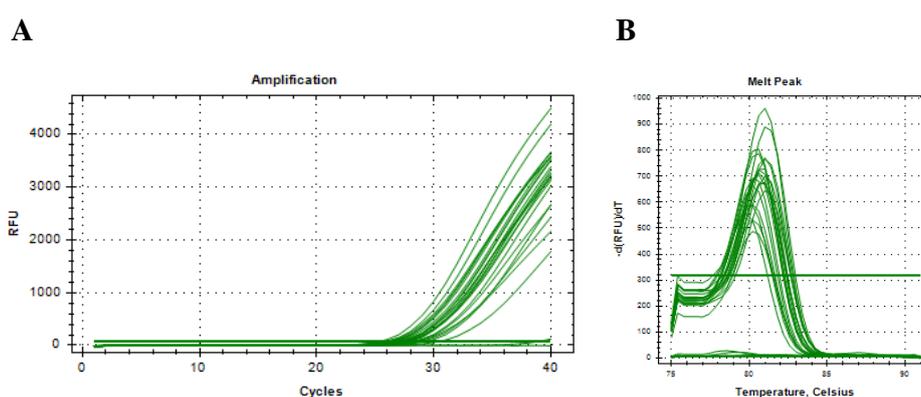
**Figura 20.** Curvas de amplificación obtenidas mediante qRT-PCR con sonda para la evaluación del gen RLEP en muestras de sangre periférica de pacientes con lepra. A) Pacientes MB (n=16) y B) Pacientes PB (n=7). Control positivo con Ct igual a 22.



**Figura 21. Curvas de amplificación obtenidas mediante qRT-PCR con sonda para la evaluación del gen RLEP en muestras de sangre periférica de contactos. A) Contactos de pacientes MB (n=14) y B) Contactos de pacientes PB (n=3). Control positivo con Ct igual a 22.**

#### 4.4. Evaluación de la expresión génica de citocinas del perfil Th1 y Th2

Se realizó RT-qPCR con SYBR Green® para la evaluación de expresiones génicas de citocinas del perfil Th1 y Th2 en sangre periférica de pacientes y contactos. En la reacción, se analizó la curva de *melting* para evaluar la calidad de la reacción de amplificación. En la **Figura 22** se pueden observar las curvas de amplificación y curvas de *melting* ( $T_m$  81,2°C) de pacientes y contactos, respectivamente para el gen *housekeeping* RNaseP humana. Los datos de Ct obtenidos en este ensayo fueron empleados para el cálculo del cambio de expresión génica por el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .



**Figura 22.** Evaluación de expresión génica del gen *housekeeping* RNaseP por RT-qPCR con SYBR Green® en sangre periférica de pacientes y contactos. A) Curvas de amplificación y B) Curvas de *melting* del gen RNaseP, cuyos datos se emplearon para el análisis del cambio de expresión génica de citocinas.

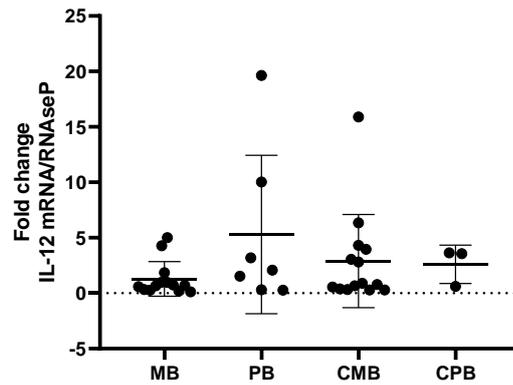
En el análisis de expresión génica de citocinas del perfil Th1, al evaluar el nivel de expresión génica de IFN- $\gamma$  se observó una diferencia estadísticamente significativa en el nivel de expresión génica entre pacientes MB y PB, siendo mayor en pacientes PB ( $p=0,0371$ ). No se observó diferencia estadísticamente significativa entre CMB y CPB en la población estudiada (**Figura 23 A**). En la **Figura 23 B y C** se presentan los niveles de expresión génica en pacientes y contactos según la clasificación clínica, observando un valor por encima de la media entre los pacientes MB clasificados como BL. Así también, entre los contactos MB, uno de ellos cuyo caso índice se clasificó como LL, presentó un nivel de expresión génica por encima de la media de ese grupo. En la **Figura 23 D y E**, se presentan las curvas de amplificación y *melting* con una  $T_m$  de 74°C.



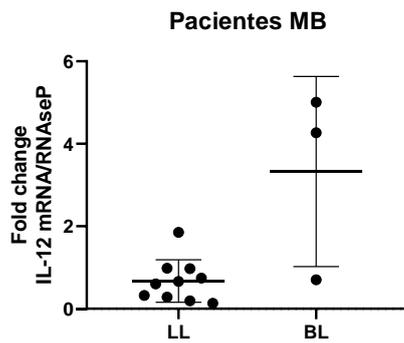
En la **Figura 24 A** se presenta los resultados del análisis del nivel de expresión génica de IL-12. Se observó una tendencia de expresión aumentada en el grupo de pacientes PB en comparación con MB, pero sin significancia estadística. Por otro lado, en la **Figura 24 B**, en el caso de los pacientes BL se observó variabilidad en la expresión en comparación al LL. En la **Figura 24 D y E** se presentan las curvas de amplificación y de *melting* con una Tm de 72,5°C obtenidos en el análisis de esta citocina, con esta población de estudio.

Así también se evaluó la expresión del gen de la citocina IL-1 $\beta$ , en la **Figura 25 A**, el cual no presentó diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes grupos. Sin embargo, se observaron valores *outliers* que diferían de la tendencia del resto de los valores en la cohorte MB, los cuales se pueden observar en la **Figura 25 B y C** de pacientes y contactos respectivamente según la clasificación clínica del paciente, observándose nivel elevado de expresión de este gen en el grupo de pacientes LL y en cuanto a los contactos, el valor atípico se observó en el grupo de contactos de pacientes con BL. En la **Figura 25 D y E**, se presentan las curvas de amplificación y de *melting* con Tm de 76°C.

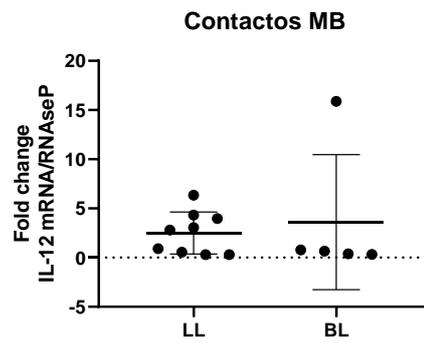
A



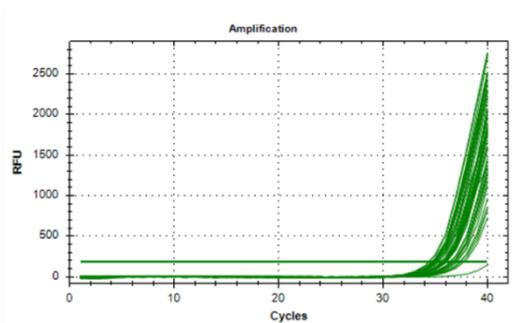
B



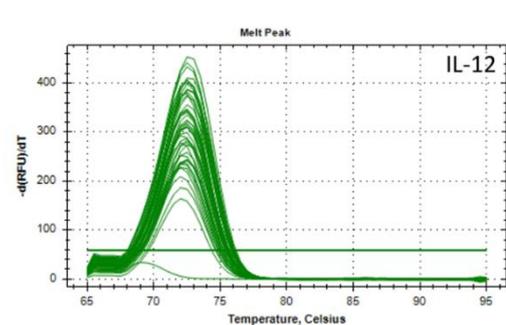
C



D

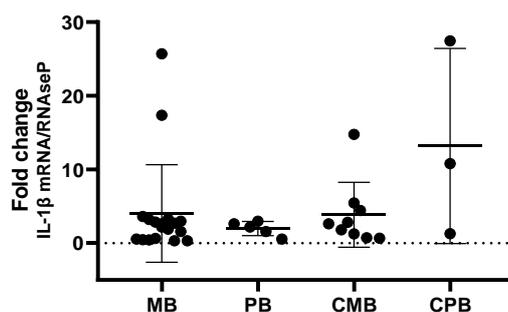


E

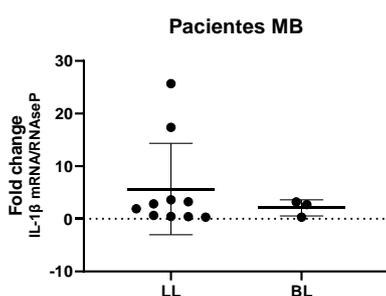


**Figura 24. Evaluación de expresión génica de IL-12 en sangre periférica por RT-qPCR con SYBR Green®.** A) Pacientes y contactos según su clasificación operacional B) Pacientes MB según su clasificación clínica, LL o BL. C) Contactos MB agrupados según la clasificación clínica del paciente, LL o BL. D) Curvas de amplificación E) Curvas de *melting* del producto de amplificación. MB: pacientes multibacilares, PB: pacientes paucibacilares, CMB: contactos de pacientes multibacilares, CPB: contactos de pacientes paucibacilares.

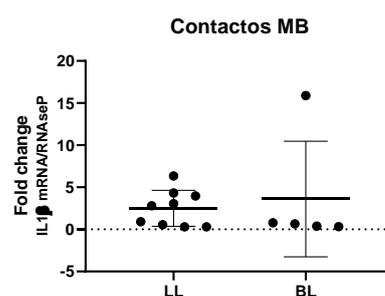
A



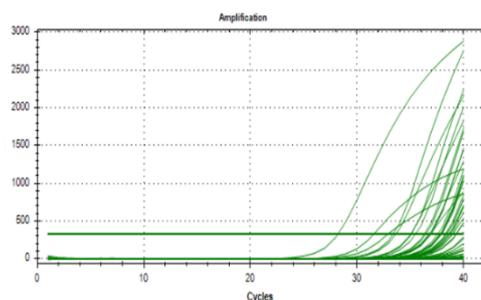
B



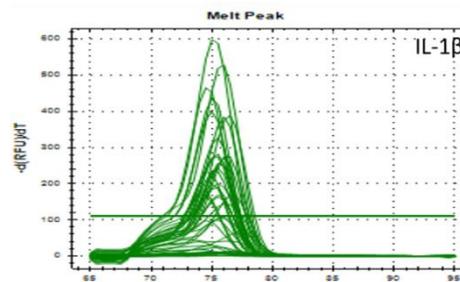
C



D



E

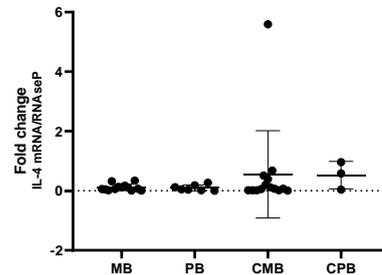


**Figura 25. Evaluación de expresión génica de IL-1 $\beta$  en sangre periférica por RT-qPCR con SYBR Green®.** A) Pacientes y contactos según su clasificación operacional B) Pacientes MB según su clasificación clínica C) Contactos MB D) Curvas de amplificación E) Curvas de *melting* del producto de amplificación. MB: pacientes multibacilares, PB: pacientes paucibacilares, CMB: contactos de pacientes multibacilares, CPB: contactos de pacientes paucibacilares.

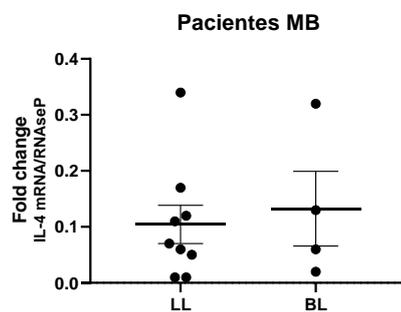
Por otro lado, también se evaluó el cambio en la expresión génica de una citocina del perfil Th2, IL-4. Como se observa en la **Figura 26 A**, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el cambio de expresión del gen de esta citocina entre los diferentes grupos, de hecho en general hubo bajo nivel de expresión de esta citocina en todos los grupos. En la **Figura 26 B y C** se representan estos valores

según la clasificación clínica del paciente. En la **Figura 26 D y E**, se presentan las curvas de amplificación y de *melting* con  $T_m$  de 80°C.

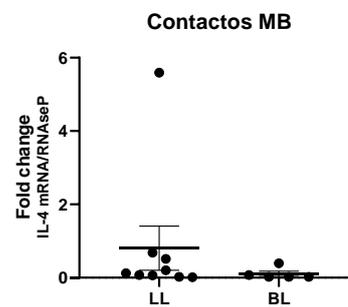
**A**



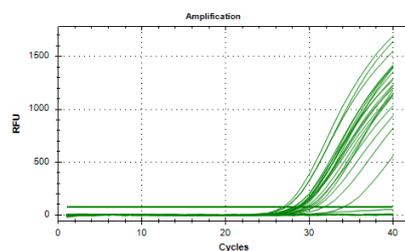
**B**



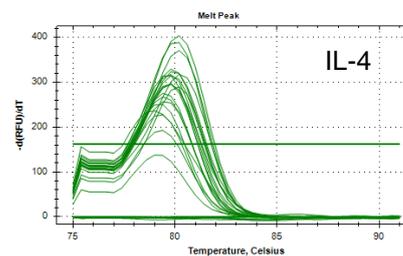
**C**



**D**



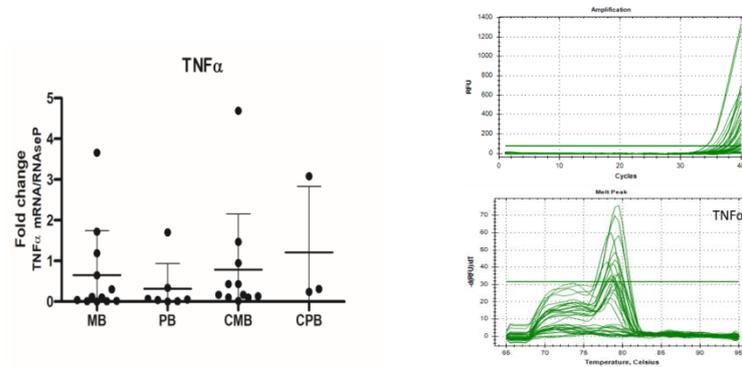
**E**



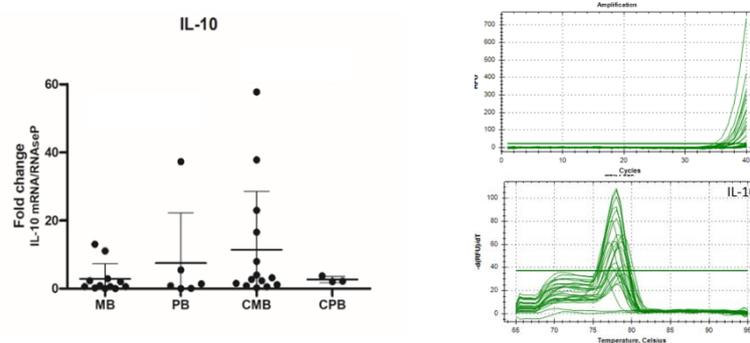
**Figura 26. Evaluación de expresión génica de IL-4 en sangre periférica por RT-qPCR con SYBR Green®.** A) Pacientes y contactos según su clasificación operacional B) Pacientes MB según su clasificación clínica, LL o BL C) Contactos MB agrupados según la clasificación clínica del paciente, LL o BL. D) Curvas de amplificación E) Curvas de *melting* del producto de amplificación. MB: pacientes multibacilares, PB: pacientes paucibacilares, CMB: contactos de pacientes multibacilares, CPB: contactos de pacientes paucibacilares.

También se evaluó el cambio en la expresión génica de las citocinas TNF $\alpha$ , IL-10 e IL-6, las cuales están en proceso de optimización de la reacción para mejorar las curvas de *melting*, pero los resultados preliminares se presentan en la **Figura 27**. Estos resultados no son discutidos en el presente trabajo debido a que los protocolos están en proceso de optimización.

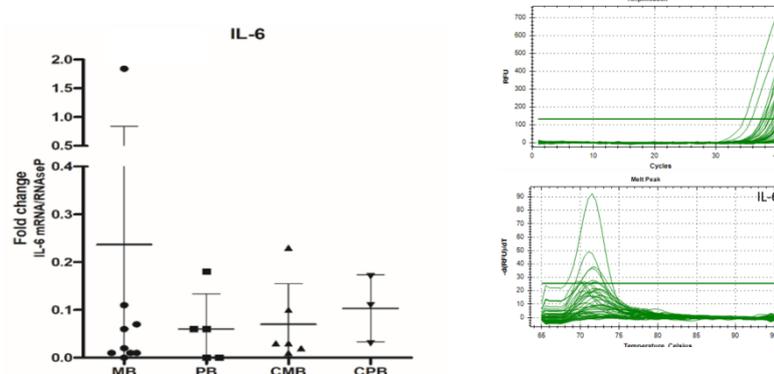
A



B



C

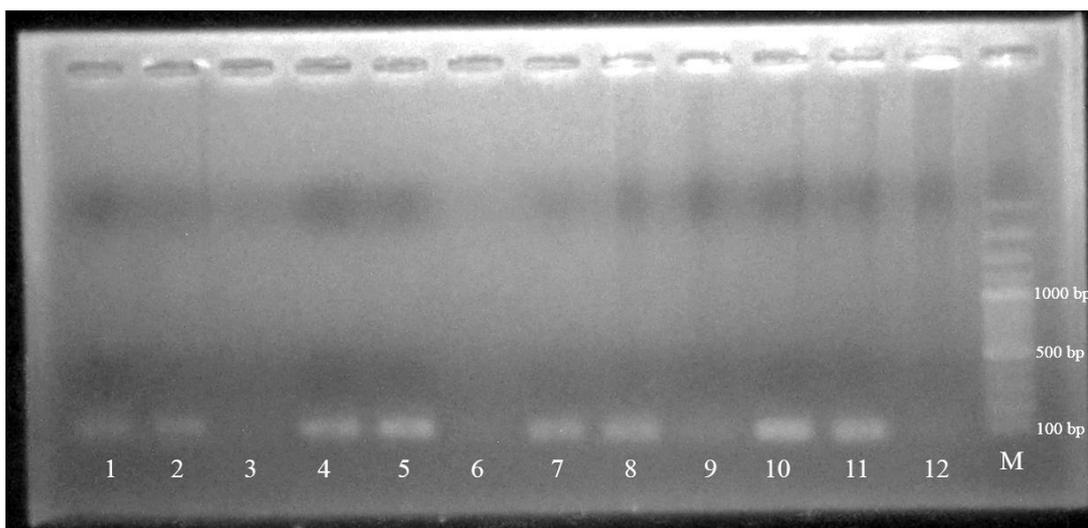


**Figura 27. Evaluación de expresión génica de citocinas en sangre periférica por RT-qPCR con SYBR Green®. A) TNF $\alpha$  B) IL-10 y C) IL-6. Niveles de expresión génica (izquierda), curvas de amplificación y *melting* (derecha) de cada citocina, en pacientes y contactos según clasificación operacional. MB: pacientes multibacilares, PB: pacientes paucibacilares, CMB: contactos de pacientes multibacilares, CPB: contactos de pacientes paucibacilares.**

Como control de calidad, se realizó una corrida de electroforesis en gel de agarosa para verificar el tamaño de algunos productos seleccionados para cada citocina evaluada y descartar la presencia de amplificaciones inespecíficas (**Figuras 28 y 29**). En la **Figura 28** se presenta una imagen de electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, donde se observa una sola banda de aproximadamente 100 bp del producto de amplificación obtenido para cada citocina evaluada IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-4, cercanos a los pb esperados para cada uno, como se observa en la **Tabla 8**. En la **Figura 29** se presenta una imagen de electroforesis en gel de agarosa al 2% en la cual se observa una sola banda para cada gen evaluado IL-1 $\beta$  y RNaseP. Los carriles 1 y 2 corresponden al producto de amplificación de la reacción de la citocina IL-1 $\beta$ , en donde no se observan productos de amplificaciones inespecíficas.

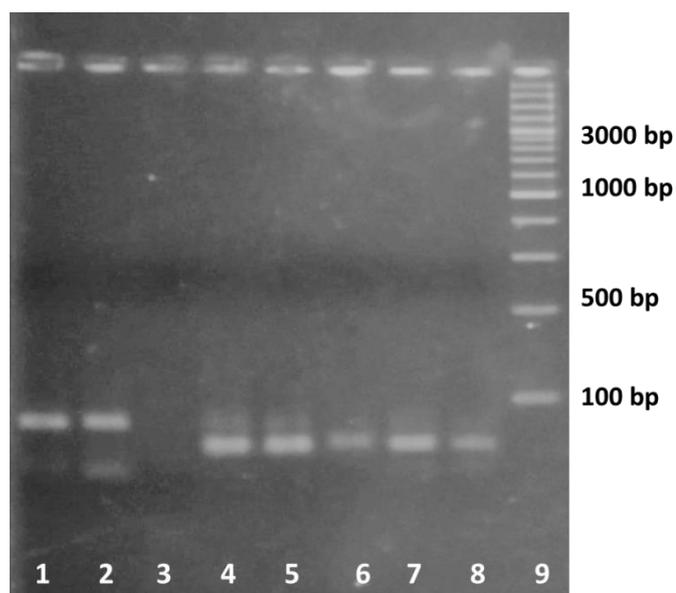
**Tabla 8.** Tamaño de los productos de amplificación en pares de base (bp)

<b>Gen Blanco</b>	<b>Pares de base del producto de amplificación</b>
IFN- $\gamma$	139
IL-12	100
IL-4	70
IL-1 $\beta$	78
RNaseP	65



**Figura 28. Electroforesis en agarosa al 1,5% de los productos de RT-qPCR de citocinas.**

Orden de corrida por carriles: TNF $\alpha$  (1 al 3); IL4 (4 al 6); IFN- $\gamma$  (7 al 9); IL12 (10 al 12); 13 (Marker 100bp). Los carriles 3, 6, 9 y 12 son controles negativos sin templado (NTC). Todos los productos tienen peso molecular cercano a 100bp.



**Figura 29. Electroforesis en agarosa al 2% de los productos de RT-qPCR de IL1 $\beta$  y RNaseP.**

Orden de corrida por carriles: IL1 $\beta$  (1 al 3). El carril 3 es control negativo sin templado (NTC). RNaseP (4 al 6); control positivo RNaseP (7 y 8); 9 (Marker 100bp). IL1 $\beta$  presenta un peso de 78 bp y RNaseP un peso de 65 bp.

Los resultados de qPCR para RLEP, ELISA anti PGL-I, LID-1 y niveles de expresión génica de citocinas se consolidaron en la **Tabla 9** y **10** obtenidos de manera individual para cada paciente y contacto, según la clasificación operacional del caso índice y según la clasificación clínica.

Se puede observar que algunos pacientes MB dieron un resultado negativo para la qPCR de RLEP específica para *M. leprae*, sin embargo fueron serorreactivos para los antígenos PGL-I y/o LID-1 (pacientes 5, 11 y 12) (**Tabla 9**).

Así también se pudo observar que el paciente 16 con clasificación clínica BL, fue positivo para qPCR de *M. leprae* y para las pruebas serológicas, como también presentó aumento en el cambio de la expresión génica de citocinas proinflamatorias, como IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-1 $\beta$ . Por otro lado, el paciente 13, también de clasificación clínica BL, únicamente presentó aumento de expresión relativa de IL-12.

En cuanto a la cohorte PB, los pacientes 22 y 23 no presentaron serorreactividad para antígenos PGL-I y/o LID-1, obtuvieron un resultado positivo para la qPCR de *M. leprae* y mostraron un aumento en la expresión génica de IFN- $\gamma$  e IL-12.

Los pacientes 18 y 19 ambos PB, de clasificación clínica TT y BT respectivamente, tuvieron resultado negativo para qPCR de *M. leprae*, no fueron serorreactivos para las pruebas serológicas, pero presentaron un aumento en el cambio de la expresión génica de IFN- $\gamma$  e IL-12. Con respecto a los contactos, se observaron contactos que fueron positivos para la qPCR de *M. leprae* y no presentaron serorreactividad para ambos antígenos (5, 10, 11, 13 y 15). También se observó que un contacto de paciente MB resultó serorreactivo para PGL-I pero negativo para la prueba de qPCR para *M. leprae* (contacto 4) (**Tabla 10**). En esta tabla también se puede observar que algunos contactos presentaron mayor cambio en la expresión de citocinas del perfil Th1, en especial IFN- $\gamma$  e IL-12, entre los cuales están algunos contactos MB cuyo caso índice presentó alto IB (contactos 1, 5 y 7), bajo IB (contactos 6 y 13) y por último, dos de los 3 contactos PB (contactos 16 y 17). Solo el contacto 7, cuyo caso índice es LL, presentó aumento en el cambio de expresión génica de IL-4.

**Tabla 9.** Resultados de qPCR para RLEP, ELISA anti PGL-I/ LID-1 y niveles de expresión génica de citocinas en pacientes

Clasificación operacional	Clasificación clínica	Paciente	IB	ADN <i>M. leprae</i>		PGL-I Cutoff 0,495		LID-1 Cutoff 0,481		Cambio en la expresión génica de citocinas			
				Ct	Resultado	OD	Resultado	OD	Resultado	IFN- $\gamma$	IL-12	IL-1 $\beta$	IL-4
MB	LL	1	3	34,38	Positivo	2,572	Positivo	1,603	Positivo	0,346	0,60	1,90	0,12
		2	2,5	31,09	Positivo	2,413	Positivo	1,360	Positivo	0,602	1,85	3,26	0,34
		3	3,3	33,9	Positivo	2,623	Positivo	0,712	Positivo	0,230	0,32	17,37	0,05
		4	2	34,01	Positivo	2,589	Positivo	1,593	Positivo	0,367	0,97	0,43	0,07
		5	3	39,22	Negativo	2,215	Positivo	1,052	Positivo	0,033	0,13	0,32	0,01
		6	5	35,4	Positivo	2,298	Positivo	0,818	Positivo	0,564	0,98	3,61	0,11
		7	2,5	34,93	Positivo	2,611	Positivo	1,397	Positivo	0,105	0,19	0,46	0,06
		8	0	29,63	Positivo	0,264	Negativo	0,367	Negativo	0,128	0,74	25,69	0,17
		9	2	31,25	Positivo	2,518	Positivo	0,961	Positivo	0,407	0,66	2,85	0,00
		10	3	33,57	Positivo	1,563	Positivo	0,428	Negativo	0,080	0,28	0,64	0,01
	BL	11	0,6	NA	Negativo	1,194	Positivo	0,553	Positivo	0,000	0,000	0,000	0,000
		12	1	38,82	Negativo	1,894	Positivo	0,309	Negativo	0,230	0,70	2,70	0,13
		13	0,5	NA	Negativo	0,134	Negativo	0,153	Negativo	0,564	5,01	0,32	0,06
		14	0	NA	Negativo	0,271	Negativo	0,143	Negativo	SD	SD	SD	SD
		15	0,2	32,02	Positivo	0,714	Positivo	0,542	Positivo	0,000	0,00	0,000	0,02
		16	1	32,55	Positivo	1,464	Positivo	0,367	Negativo	1,436	4,27	3,22	0,32
PB	TT	17	0	36,87	Positivo	0,565	Positivo	0,273	Negativo	0,1	0,3	1,6	0,1
		18	0	NA	Negativo	0,339	Negativo	0,314	Negativo	2,2	1,5	0,6	0,1
	BT	19	0	NA	Negativo	0,463	Negativo	0,220	Negativo	1,5	10,0	0,0	0,0
		20	0	34,59	Positivo	0,255	Negativo	0,317	Negativo	0,1	0,3	2,2	0,0
		21	0	32,08	Positivo	1,410	Positivo	0,447	Negativo	2,1	3,2	3,0	0,2
	BB	22	0	30,29	Positivo	0,401	Negativo	0,150	Negativo	1,4	2,1	2,6	0,0
		23	0	36,5	Positivo	0,070	Negativo	0,160	Negativo	9,6	19,6	0,0	0,3

NA: no amplifica; SD: sin dato para RNaseP

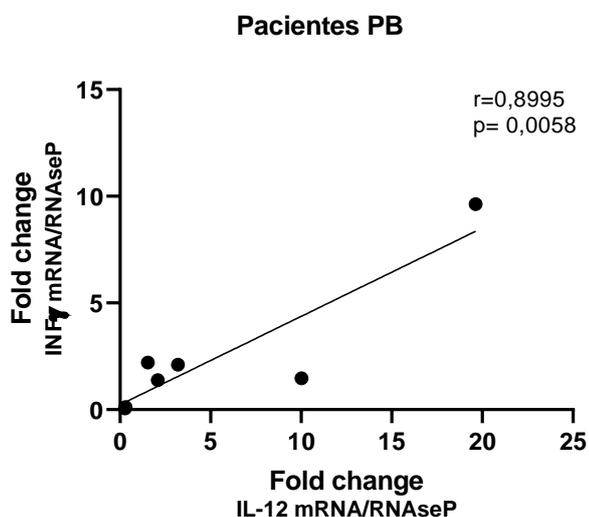
**Tabla 10.** Resultados de qPCR para RLEP, ELISA anti PGL-I/ LID-1 y niveles de expresión génica de citocinas en contactos

Datos del Caso índice			Contacto	ADN <i>M. leprae</i>		PGL-I Cutoff 0,495		LID-1 Cutoff 0,481		Cambio en la expresión génica de citocinas			
Clasificación operacional	Clasificación clínica	IB		Ct	Resultado	OD	Resultado	OD	Resultado	IFN- $\gamma$	IL-12	IL-1 $\beta$	IL-4
MB	LL	3,3	1	NA	Negativo	0,245	Negativo	0,318	Negativo	0,9	2,8	0,0	0,7
		2	2	34,1	Positivo	0,590	Positivo	0,144	Negativo	0,5	0,9	1,3	0,1
		3	3	NA	Negativo	0,221	Negativo	0,178	Negativo	0,1	0,3	0,0	0,0
		0	4	37,51	Negativo	0,612	Positivo	0,166	Negativo	0,4	0,6	5,5	0,1
		2	5	36,31	Positivo	0,184	Negativo	0,203	Negativo	2,1	4,0	14,8	0,5
		0,2	6	39,56	Negativo	0,083	Negativo	0,177	Negativo	0,3	4,3	4,4	0,2
		3	7	NA	Negativo	0,175	Negativo	0,156	Negativo	63,4	6,3	0,0	5,6
		3	8	NA	Negativo	0,132	Negativo	0,155	Negativo	0,0	0,3	0,0	0,0
		2	9	NA	Negativo	0,220	Negativo	0,157	Negativo	0,3	3,1	0,7	0,1
	BL	1	10	36,12	Positivo	0,288	Negativo	0,233	Negativo	0,3	0,8	0,7	0,0
		1	11	32,97	Positivo	0,169	Negativo	0,145	Negativo	0,4	0,7	2,6	0,0
		0,5	12	NA	Negativo	0,290	Negativo	0,228	Negativo	0,1	0,4	2,8	0,1
		0,5	13	35,11	Positivo	0,229	Negativo	0,195	Negativo	4,3	15,9	0,0	0,4
		1	14	NA	Negativo	0,258	Negativo	0,175	Negativo	0,4	0,3	1,8	0,0
PB	TT	0	15	35,11	Positivo	0,392	Negativo	0,175	Negativo	0,4	0,6	1,3	0,0
	BT	0	16	32,12	Negativo	0,452	Negativo	0,207	Negativo	1,6	3,6	10,8	1,0
		0	17	39,13	Negativo	0,163	Negativo	0,089	Negativo	2,1	3,6	27,4	0,6

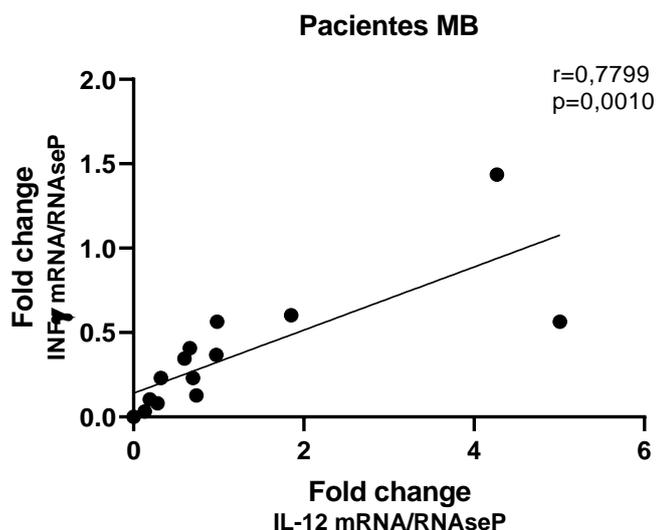
NA: no amplifica

Se realizó un análisis de correlación en las citocinas que mayor cambio de expresión presentaron, IFN- $\gamma$  e IL-12, tanto en pacientes PB (**Figura 30 A**), como en pacientes MB (**Figura 30 B**). Se observó una correlación positiva estadísticamente significativa en cada caso, en PB con un valor de  $p= 0,0058$  y en MB un valor de  $p= 0,0010$ .

A



B



**Figura 30. Correlaciones entre las expresiones génicas de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12.** A) pacientes PB y B) pacientes MB. Se realizó correlación de Pearson con una significancia de  $p<0,05$  para comparar los niveles de expresión génica de ambas citocinas en los diferentes grupos.

## **5. DISCUSIÓN**

La lepra es una enfermedad antigua que aún se considera endémica en algunos países a pesar de la disminución de la prevalencia a nivel mundial (63). Si bien Paraguay no es considerado endémico para esta enfermedad, se siguen registrando alrededor de 300 casos nuevos al año, inclusive en niños, lo cual indica que el patógeno *M. leprae* sigue transmitiéndose de manera activa en nuestro país (56). Se han reportado datos de caracterizaciones demográficas, clínicas y epidemiológicas sobre casos de lepra en Paraguay (64), sin embargo el presente trabajo estudia por vez primera la respuesta inmunológica molecular de los pacientes paraguayos de lepra como también en sus contactos intradomiciliarios. Este estudio puede brindar información importante que ayude a comprender la capacidad de *M. leprae* de modular la respuesta inmunológica del hospedero y a su vez puede tener implicaciones para el desarrollo de estrategias de diagnóstico precoz o terapéuticas que busquen prevenir la transmisión, así como los daños neurales.

Todos los sujetos del presente estudio fueron diagnosticados por expertos del PNCL por métodos clínicos asociados a baciloscopía y en algunos casos histopatología. En el momento del diagnóstico además de la ficha epidemiológica de rutina, tanto pacientes como contactos fueron entrevistados por el equipo científico para coleccionar datos siguiendo una encuesta recomendada por la Fiocruz. Este componente del proyecto ha generado información demográfica, epidemiológica y económico-social valiosa. En el periodo 2018-2020, un total de 222 pacientes asistieron al PNCL, de los cuales 78% fueron hombres. En nuestra pequeña población de estudio también se registraron más casos de esta enfermedad en hombres que en mujeres. Es sabido que la infección es más frecuente entre los hombres que entre las mujeres, que podría deberse a la ocupación y formas de exposición (65). En cuanto a la distribución geográfica, el interior del país fue el de mayor registro de frecuencia de casos, lo cual es esperable, debido a la mayor prevalencia de la enfermedad en regiones tales como San Pedro y Alto Paraná (35), además la lepra es considerada una enfermedad rural (16).

Las características socioeconómicas y epidemiológicas también muestran su impacto en la transmisión de la lepra en nuestro país ya que las variables registradas con mayor frecuencia tanto en pacientes como en contactos intradomicilio están asociadas a un mayor riesgo de lepra, tales como las condiciones de vida hacinadas,

el trabajo manual, el registro de niveles reducidos de ingresos, educación y factores que reflejan condiciones de vida desfavorables (66).

Otro dato resaltante durante la entrevista fue la dificultad de obtener información sobre el estado de vacunación con BCG. Generalmente se lo obtiene a partir de la observación de la cicatriz de BCG y/o la verificación de documentos de vacunación. Se sabe que además de la vacunación sistemática con BCG al nacer para prevenir la tuberculosis, en países endémicos como Brasil, la BCG se recomienda oficialmente para los contactos domésticos de casos de lepra (16), sin embargo no todos los sujetos presentaban cicatriz o el carnet de vacunación en nuestro estudio. Se hace necesario una base de datos nacional digitalizada para mejorar el acceso a este tipo de datos.

Como el diagnóstico de la lepra se basa en la evidencia, se requiere la presencia de al menos una manifestación clínica y posterior confirmación por baciloscopía. Por esta razón el diagnóstico de la lepra del polo lepromatoso o multibacilar es mucho más frecuente que el diagnóstico de la lepra del polo tuberculoide o paucibacilar, cuyo diagnóstico representa un mayor desafío. Un programa de control de lepra que realiza búsqueda activa y seguimiento de contactos consigue aumentar la tasa de detección de paucibacilares (67).

En Paraguay la tasa de detección de casos paucibacilares es nada más que 11% del total de pacientes por año, esto también se vió reflejado en los datos obtenidos en el presente estudio. Además de la dificultad de detección de este tipo de pacientes, durante este proyecto hemos observado componentes económicos y sociales que afectaron el reclutamiento de pacientes.

Durante la búsqueda activa de contactos de casos nuevos, frecuentemente existió una conducta reacia por parte de contactos y familiares de pacientes de consultar de forma preventiva o de control, por miedo al estigma. Además, existe limitación económica para el desplazamiento al PNCL. Estos factores hacen que se detecte la enfermedad en estadio avanzado.

Como este trabajo forma parte de un proyecto macro en el cual se evalúan pacientes posterior al tratamiento, durante el seguimiento de los pacientes y contactos, uno de los contactos de un paciente MB presentó manifestaciones clínicas luego de la finalización del tratamiento de su caso índice, diagnosticándose como un caso de

lepra PB, resaltándose así la importancia del monitoreo de los contactos intradomicilio. El diagnóstico e inicio temprano del tratamiento, antes del avance de la enfermedad a su estadio discapacitante, es uno de los pilares de la campaña de eliminación de la lepra establecida por la OMS (15).

Además de factores epidemiológicos, en este estudio el estado clínico-laboratorial de los pacientes y contactos también fue evaluado. La alta carga bacilar en los pacientes con lepra genera una constante exposición de órganos internos a este microorganismo. El hígado es un órgano que presenta afecciones significativas en esta enfermedad (68). En el presente estudio fueron analizados los niveles de enzimas séricas que reflejan el perfil hepático de pacientes al momento del diagnóstico de la enfermedad, observándose que algunos pacientes, presentaban niveles que superan el valor de referencia de GOT, GPT, GGT y FA, aunque la mayoría presentaron valores dentro del rango. Se ha publicado que algunos pacientes con lepra, especialmente del polo lepromatoso, pueden presentar afectaciones hepáticas debido a la presencia del bacilo, pudiéndose observar alteraciones del nivel de algunas enzimas como GOT y GGT, incluso se han registrado reportes de lesiones granulomatosas en biopsias de hígado mediante estudios histopatológicos (67,69).

El diagnóstico de lepra es un desafío, ya que no existen métodos estándar de oro para diferenciar entre infección y enfermedad. Se han desarrollado muchas técnicas nuevas para diagnosticar la lepra a nivel de campo, de modo que la vigilancia de los contactos se pueda realizar de una mejor manera. Además de intentar eliminar la enfermedad, existe una incidencia cada vez mayor de resistencia a la rifampicina, la clofazimina y la dapsona, por lo que se necesitan mejores algoritmos para el diagnóstico de la lepra (70). Por mucho tiempo la baciloscopía ha sido la única herramienta laboratorial de apoyo diagnóstico. Actualmente existen ensayos inmunológicos (ELISA, tests rápidos) y moleculares (qPCR) que complementan el diagnóstico clínico. En este estudio, por vez primera en Paraguay aplicamos la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos específicos para *M. leprae*, con el fin evaluar la serorreactividad de los pacientes y contactos intradomiciliarios. Se estandarizaron localmente pruebas de ELISA ante el antígeno PGL-I y el LID-1. La serorreactividad del ELISA PGL-I detectada en este estudio piloto fue similar a lo

publicado en otros trabajos, tanto en pacientes MB (81%), PB (28%) como en contactos de pacientes MB (14%).

Se ha demostrado que los contactos domésticos seropositivos de pacientes con lepra tienen tres veces más probabilidades de desarrollar lepra en comparación con los seronegativos (43,71), razón por la cual, fueron notificados al PNCL.

La identificación de los contactos intradomiciliarios de alto riesgo permitirá que los recursos del programa de control estén más enfocados en un seguimiento riguroso de estos contactos para la aplicación correcta de un tratamiento en caso de inicio de síntomas. Por tanto un *screening* serológico con este antígeno podría utilizarse como alerta precoz en contactos domésticos (72,73) especialmente en aquellos cuyo caso índice es un paciente MB y para la detección de individuos con infección subclínica y asintomática por *M. leprae* (74).

Anteriormente se consideraba que la detección de IgM anti PGL-I podría ser buena herramienta en el diagnóstico de la enfermedad tanto multibacilar como paucibacilar (75), pero más adelante se vió que la detección de anticuerpos es especialmente útil para el apoyo en el diagnóstico de lepra MB, no así en pacientes con PB. Lo anteriormente expuesto fue comprobado al observar una baja serorreactividad en pacientes PB (28%), lo cual se correlaciona directamente con el tipo de respuesta inmune que generalmente caracteriza a ese polo de la enfermedad (76). Además de la desventaja mencionada, se han reportado que en áreas endémicas se pueden observar valores elevados de anticuerpos IgM anti PGL-I en individuos que no desarrollan la enfermedad debido a la continua exposición a micobacterias viables (43,44). La prueba de serología anti PGL-I es ampliamente utilizada en países como Brasil, como herramienta auxiliar de diagnóstico, y también se ha encontrado utilidad en el seguimiento del tratamiento de la enfermedad, debido a que los niveles de anticuerpos presentan una tendencia de decaimiento con el tratamiento, así también se ha visto mayor nivel de anticuerpos en pacientes que no han recibido tratamiento (77). Aunque el seguimiento de pacientes escapa a los objetivos trazados para esta tesis, la disminución de los niveles de anticuerpos IgM anti PGL-I también se ha observado en los ensayos serológicos realizados a los pacientes paraguayos posterior al tratamiento (datos mostrados en **Figura 32 Anexo 4**).

Al analizar el nivel de detección de anticuerpos IgG anti LID-1, en comparación al ELISA anti PGL-I observamos una menor serorreactividad en pacientes MB (63%) y una ausencia de serorreactividad en pacientes PB y contactos. A pesar de ello, resulta importante conocer los niveles de serorreactividad ante LID-1 ya que se ha visto en otros estudios que la misma se correlaciona mejor con la aparición de síntomas en pacientes en seguimiento (44).

Si bien la serorreactividad al LID-1 obtenida en este trabajo presentó valores más bajos que algunos reportes de la literatura (46,50), cabe resaltar que esta es la primera vez que se evalúa la utilidad de estos antígenos en la población paraguaya, en donde la situación epidemiológica real de la enfermedad no es clara.

Por otro lado, algunos estudios reportaron menor sensibilidad de esta prueba y sugieren no usar LID-1 como diagnóstico independiente pero sí como herramienta para la detección e identificación de personas con alto riesgo que podrían beneficiarse de un seguimiento o control periódico (78).

Estudios previos han demostrado una correlación entre la serorreactividad ante PGL-I y LID-1 y el índice bacilosκόpio, razón por la cual se los considera un buen marcador de la carga bacteriana (49,79). Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en este estudio, donde se observó un aumento de serorreactividad a medida que aumentaba el índice bacilosκόpio, observándose inclusive un 100% de serorreactividad en aquellos pacientes con índice bacilosκόpio mayor o igual a 2 cruces.

La OMS sugiere que la vigilancia de contactos como una estrategia de control fácil para bloquear la transmisión. Sin embargo, no se pudo reducir la tasa de detección de casos nuevos como se esperaba, por lo que investigaciones recientes se centran en el diagnóstico precoz (80). El uso de Regiones de elementos repetitivos (RLEP) del genoma de *M. leprae* tiene la ventaja de ser sensible como herramienta de apoyo diagnóstico (70). Existen varios materiales biológicos para el diagnóstico molecular de *M. leprae*, entre ellos la sangre, considerada una posible vía del proceso de infección, un paso transitorio de los bacilos, después del ingreso de *M. leprae* a través de la mucosa del tracto respiratorio superior y antes de la alteración del sistema nervioso periférico (81). En ese sentido y continuando con la evaluación

local de posibles herramientas auxiliares de diagnóstico de lepra, se encuentra la prueba basada en método molecular de detección de material genético de *M. leprae*. En este estudio se realizó la detección de ADN de *M. leprae* a partir de muestra de sangre periférica al momento del diagnóstico de pacientes y contactos, evaluando el gen de secuencia de elementos repetitivos RLEP, que resulta menos invasiva que las biopsias de piel. En este estudio se observó un 11/16 (69%) de positividad en pacientes MB, 5/7 (71%) en PB y 7/17 (41%) en el total de contactos. En la literatura se ha publicado una baja tasa de detección de ADN de *M. leprae* en muestras de sangre total, siendo 13%-17% de los pacientes MB, 0% de pacientes PB, pero estos porcentajes aumentaron al analizar muestras de biopsias de piel (100% pacientes MB y 75% pacientes PB) (82,83). Este fenómeno puede explicarse por el hecho de que presumiblemente el bacilo solo se detecta en la sangre durante el corto período en el que migra a las extremidades, que es la ubicación de las condiciones óptimas para la supervivencia de las bacterias y por tanto, existe una mayor probabilidad de detectar material genético de la micobacteria a partir de biopsias de piel (81). En un estudio de Brasil, el método qPCR detectó RLEP en muestras de sangre periférica en 200 casos de lepra no tratados y 826 contactos domésticos (81). Este estudio reveló que, si la PCR era positiva en las muestras de sangre de los casos índice en el momento de la detección, los contactos tenían un mayor riesgo de desarrollar lepra en una fecha posterior (81). En otro estudio se evaluó la efectividad de una prueba de qPCR multiplex, para la detección simultánea de varios genes blanco además de RLEP, tales como 16S-rRNA y sodA observándose un aumento en el porcentaje de positividad, 86% en pacientes PB y 54% en contactos a partir de muestras de sangre, comparada al ensayo monoplex, 46,6% en pacientes PB y 0% en contactos (84). Esta técnica podría futuramente ser aplicada a muestras del presente estudio. Se ha reportado que contactos con PCR positiva en sangre en el momento del diagnóstico de los casos índice también indican un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad (79). En este estudio la qPCR presentó positividad en 2 de 3 contactos PB. A pesar del número bajo de contactos PB que se pudo reclutar, solo 1 resultó no detectable para ADN de *M. leprae*. Se sugiere combinar la PCR con otros marcadores para potenciar el manejo y control de contactos (81), tal como la serología IgM anti PGL-I e IgG anti LID-1, lo cual se respalda nuestra observación de que algunos contactos

que habían dado negativo a la qPCR, eran serorreactivos a PGL-I, como también el caso de un contacto PB, que no presentó serorreactividad ante los antígenos, sin embargo se detectó ADN de la micobacteria en su muestra de sangre. De hecho, se ha visto anteriormente que individuos asintomáticos que resultaron positivo por qPCR de RLEP en muestras de biopsias de piel, años después desarrollaron la enfermedad (85). Una alternativa a ser estudiada en futuros ensayos es la detección de ADN de *M. leprae* en muestras de hisopado nasal en contactos intradomiciliarios, ya que se considera la principal vía de ingreso del patógeno al organismo y también es una muestra de fácil obtención y no invasiva, detectándose *M. leprae* en 89,7% de los casos MB y en 73,3% PB (86).

Como ya fue expresado, reconocer los signos y síntomas de la lepra es un desafío, especialmente en una etapa temprana, por tanto se necesitan herramientas de diagnóstico mejoradas basadas en biomarcadores sensibles y específicos (87). Se ha demostrado anteriormente que patrones de expresión de ARN del huésped discriminan varias etapas de la enfermedad, obteniéndose una firma de genes que codifican mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios de la inmunidad innata, regulados en presencia de reacciones de tipo 1, lo cual progresivamente lleva al daño nervioso (88). Por esa razón, la identificación de genes expresados de manera diferencial en pacientes presentan potencial para el diagnóstico temprano de la enfermedad, como se ha visto con enfermedades causadas por otras micobacterias, como *M. tuberculosis* (89). Considerando el amplio espectro de respuesta inmunológica que presenta la lepra y además la importancia del *background* genético como factor adicional, se evaluó por vez primera en pacientes paraguayos con lepra y contactos intradomiciliarios el nivel de expresión de ARN mensajeros de citocinas del tipo Th1 y Th2 en sangre entera no estimulada en el momento de diagnóstico y antes de iniciar el tratamiento del caso índice. Los perfiles de expresión obtenidos por qPCR fueron agrupados según la clasificación operacional, de manera a evaluar el perfil de respuesta inmune al momento del diagnóstico del caso índice.

Es sabido que el mecanismo efector principal de la inmunidad mediada por células en las infecciones por micobacterias se relaciona con la activación de los linfocitos T y la producción de citocinas del perfil Th1, como IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ , que da como resultado la activación de macrófagos y el reclutamiento de monocitos

circulantes para iniciar la formación granulomatosa a largo plazo y contener la infección (90). Se observó una baja expresión del gen de las citocinas del perfil Th1 IFN- $\gamma$  e IL-12 en pacientes MB en comparación con los pacientes PB, si bien sólo se observó diferencia estadísticamente significativa entre MB y PB con la citocina IFN- $\gamma$  ( $p= 0,0371$ ). También se observó una tendencia de aumento en el cambio de expresión de IL-12 en pacientes PB, en comparación con los MB. Según Martins *et al*, 2012, se espera una disminución del nivel de producción de citocinas del perfil Th1 como IFN- $\gamma$  en personas expuestas a altas cargas bacilares (58). Llamó la atención que entre los pacientes MB que presentaron un mayor cambio de expresión del gen de IFN- $\gamma$  e IL-12 resultaron ser pacientes del polo borderline lepromatoso. Si bien estos son pacientes MB, se sabe que la clasificación borderline es un estado de inmunológicamente inestable y estos pueden virar hacia el polo tuberculoide (TT) como lepromatoso (LL). Por tanto que estos pacientes presenten un aumento en la expresión génica de citocinas del perfil Th1 apuntan hacia el paradigma inmunológico característico de esta enfermedad. Por otro lado, el aumento de la expresión de esta citocina en pacientes PB con respecto a pacientes MB, indicativo de una inmunidad mediada por células efectiva, era un dato esperado una vez que esta respuesta está asociada a pacientes del polo tuberculoide (91). Los resultados presentados en este trabajo son niveles de mRNA que serán posteriormente comparados con el dosaje de las citocinas secretadas en plasma por Luminex®.

Está claro que tanto el trasfondo genético como la respuesta inmune del huésped juegan un papel esencial en el desarrollo y manifestación de la lepra (92). Así también para muchas enfermedades infecciosas, una característica común es que solo una parte de las personas que están expuestas a los patógenos son infectadas y desarrollan síntomas clínicos, y los factores genéticos de los huéspedes se han considerado durante mucho tiempo como un factor importante que contribuye a las variaciones en la susceptibilidad (91, (94). El hacinamiento de familiares es un factor importante de transmisión de la lepra, de ahí la importancia del estudio de contactos de los pacientes con lepra.

En este trabajo, en cuanto a los contactos reclutados al momento del diagnóstico de los casos índices, no hubo diferencia en el cambio de expresión de citocinas del perfil Th1. Dentro del grupo de contactos MB, se observó que los contactos de pacientes

LL presentaron una tendencia a aumentar la expresión de las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-1 $\beta$ , comparando con los contactos de pacientes con lepra borderline. Esto puede deberse al hecho de que por ser contactos de pacientes LL, estos individuos estarían expuestos a alta carga bacilar. Cabe destacar que el seguimiento individual de la respuesta Th1 en CMBs podría resultar interesante, ya que su disminución podría indicar el establecimiento de una infección *per sé*, y no solamente una exposición, con la consiguiente regulación de la respuesta inmune del huésped por parte del bacilo (95).

La lepra constituye un excelente modelo para comprender los mecanismos de regulación del sistema inmunológico que se pueden aplicar a otras enfermedades inflamatorias crónicas en humanos (40). Estudios previos mostraron que en pacientes con lepra lepromatosa se expresan niveles significativamente más bajos de IFN- $\gamma$  y niveles más altos de IL-4 en el sobrenadante del cultivo de células mononucleares de la sangre (PBMC) comparado con individuos sanos con o sin estimulación antigénica (96).

Según la literatura, existe inducción en la producción de citocinas como IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$  en sobrenadante de PBMC que inactivan la respuesta microbicida de los macrófagos, facilitando la supervivencia del bacilo (23,97). En este contexto, existe una regulación negativa de la respuesta Th1 al inhibir la respuesta microbicida de los macrófagos en el polo susceptible de la enfermedad (98,99). Sin embargo, en este estudio en sangre total no se observó un aumento de IL-4 en los diferentes grupos evaluados. Estos resultados, al igual que los resultados obtenidos con las demás citocinas deben ser estudiados aumentando el tamaño de la población y compararlos con los resultados a nivel proteico. Adicionalmente, el hallazgo de biomarcadores en sangre total facilitaría su extrapolación a métodos de diagnóstico rápidos, no así el uso de cultivo de PBMC.

Vale destacar que para interpretar los resultados de expresión génica, muchos estudios se dedican a realizar seguimientos de pacientes con el fin de analizar la respuesta longitudinal en cada individuo y detectar tendencias de comportamiento o perfiles genéticos (*genetic signatures*) (100). La estratificación de los pacientes también puede tener un impacto en la interpretación. Y potencialmente pueden existir pacientes con episodios reaccionales durante el tratamiento que alteran el

perfil inmunológico (61,101). Por otro lado es importante tener en cuenta el tipo de material biológico utilizado para el análisis de la expresión génica. Algunas publicaciones detectaron determinados perfiles de citocinas que se han estudiado en poblaciones específicas de células sanguíneas (95). En este contexto, la interpretación de los perfiles inmunológicos resulta sumamente compleja, sobre todo en una población de tamaño pequeño. En este trabajo se presenta por vez primera una fotografía de un único momento de la expresión relativa de diversos genes asociados a la respuesta inmunológica en sangre total, en diferentes cohortes de individuos paraguayos, por lo que las interpretaciones se deben hacer con cautela.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en base a los resultados obtenidos y en términos de propuesta de nuevos biomarcadores para el desarrollo y pronóstico de la enfermedad en grupos de riesgo, se podría hacer hincapié en la evaluación de la expresión del gen de IFN- $\gamma$ , ya que, a pesar del bajo número de individuos evaluados, presentó diferencia significativa entre PB y MB (Figura 25. A, B y C).

Dado que los contactos de los pacientes con lepra tienen un mayor riesgo de desarrollar lepra que la población general en un área endémica (102), los perfiles de biomarcadores que indiquen este riesgo podrían ayudar a tomar decisiones sobre quién necesitaría tratamiento antibiótico preventivo (103). En nuestro estudio se observó en algunos contactos PB, que no presentaron positividad para las pruebas de qPCR o serología un aumento en el cambio de la expresión de IFN- $\gamma$  e IL-12. Si bien no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre estos grupos, estos genes podrían ser considerados para ser evaluados como posibles blancos de seguimiento para la evaluación de exposición al bacilo en estos grupos de riesgo. Pero como los niveles de expresión de ARN de los genes pueden variar con el tiempo (104), es necesario realizar la evaluación longitudinal del nivel de expresión de estos genes para considerarlos como biomarcadores *per se*.

La generación de inmunidad mediada por células contra la infección intracelular implica la producción de IL-12 (105). Es sabido que un factor inmunológico importante para la polarización hacia una respuesta Th1 consiste en la secreción de IL-12 en el sitio de la infección, correlacionándose con el aumento de expresión de IFN- $\gamma$  en las lesiones de pacientes PB (106). Una correlación similar entre estas

citocinas ( $p=0,0058$ ) se ha detectado en este trabajo, a partir de sangre de pacientes PB, lo cual sugiere una polarización de respuesta del tipo Th1 en estos pacientes.

Durante el curso natural de la enfermedad, los pacientes pueden desarrollar episodios de reacción, como reacción de reversión (RR) y eritema nodoso leproso (ENL). En un estudio donde se analizó el patrón de expresión génica de citocinas en los estados de reacción de la lepra, se observó una correlación en el aumento de expresión de citocinas proinflamatorias, entre ellas IL-12 e IFN- $\gamma$ , sugiriendo que este patrón de respuesta de reactivación inmunológica en los pacientes podría conducir a una respuesta inflamatoria aguda, llevando a episodios reaccionales (107). En este estudio los pacientes MB que hayan presentado un aumento de las citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$ , correlación que es esperada una vez que los pacientes MB inician una respuesta tipo Th1, podrían estar desarrollando posibles eventos de reacción inflamatoria aguda. Vale aclarar que los niveles normalmente bajos de estas citocinas en pacientes LL, se debe posiblemente a la presencia de células T reguladoras, ya que se ha evidenciado que en pacientes con LL estas células pueden facilitar la reducción progresiva de la respuesta de IFN- $\gamma$  específica del patógeno del huésped y la resistencia a la infección, así como contribuir a la tolerancia a la enfermedad del huésped (108).

A pesar de los resultados descritos en el presente trabajo, se requiere mayor número de pacientes para entender mejor el panorama inmunológico de pacientes con lepra y sus contactos. Entre las limitantes registradas en este estudio existe el reclutamiento bajo de pacientes PB y especialmente de contactos de estos casos. Esto principalmente debido a la dificultad para diagnosticar lepra PB. Además de esto, es sabido que la lepra es una de las enfermedades más estigmatizadas en todo el mundo. Esto también se reflejó en el presente estudio, ya que durante el desarrollo del trabajo varios fueron los pedidos de confidencialidad del paciente por temor al conocimiento de sus familiares. Por último el número de casos diagnosticados se redujo con el advenimiento de la pandemia por SARS-CoV-2, acontecimiento que impidió la concurrencia de los pacientes al PNCL durante el año 2020, como también se hizo imposible la realización de la búsqueda activa de los contactos. En esta sección de limitaciones, cabe resaltar también la dificultad para la obtención de datos de vacunación con BCG en los individuos reclutados.

Sin embargo, la fortaleza de este estudio radica en los momentos de toma de muestras ya que todos los pacientes y contactos fueron reclutados en el momento del diagnóstico antes del inicio del tratamiento (tiempo T0, en el cual se enfoca el presente trabajo de tesis) y posterior a la finalización del tratamiento (tiempo T1, el cual engloba el proyecto macro) del caso índice. La toma de muestra controlada nos permitirá tener un primer perfil de tamizaje de la respuesta inmunológica en nuestra población antes y luego del tratamiento.

Dentro de las perspectivas de este estudio se proyecta continuar el proceso de dosaje de citocinas a nivel proteico en sangre no estimulada y en respuesta a la estimulación en sangre de pacientes y contactos, con antígenos específicos de *M. leprae*, al momento del diagnóstico como también al terminar el tratamiento, empleando tecnología multiplex con la plataforma Luminex®. Estos resultados serán comparados con el perfil de expresión génica obtenido. Así también se evaluarán otros genes blancos además de las citocinas. Se pretende aumentar el tamaño de muestras, así también comparar los resultados obtenidos con datos en población brasilera provistos por la contrapartida de la Fiocruz con el fin de tener una estadística más robusta e intentar llegar a conclusiones que se puedan extrapolar a posibles nuevas herramientas de diagnóstico.

## **6. CONCLUSIÓN**

Los pacientes paraguayos que presentan lepra, reflejan características demográficas, clínicas y epidemiológicas que usualmente son descriptos para los pacientes con esta patología. Por esta razón, las personas que cumplan con estas variables socio-demográficas y epidemiológicas, considerando especialmente la zona de residencia, podrían estar en exposición a la micobacteria por vivir en posibles zonas endémicas. Los datos podrán contribuir al control sustancial de la enfermedad, la implementación de estrategias centradas en la detección y el tratamiento temprano en las poblaciones más desfavorables.

Por otro lado, se logró por vez primera aplicar la técnica del ELISA *in house* anti PLG-I y LID-1, así como la prueba de detección de ADN de *M. leprae* mediante qPCR en pacientes y contactos intradomiciliarios paraguayos. Estas técnicas podrían ser útiles como herramientas auxiliares para el diagnóstico de casos de lepra en nuestro país y principalmente útil al Programa Nacional de Control de Lepra en el seguimiento de las poblaciones con mayor riesgo a desarrollar la enfermedad, para un diagnóstico y tratamiento oportuno.

A pesar del pequeño grupo de individuos de estudio, se pudo evaluar el perfil inmunológico a nivel de expresión génica de citocinas, tanto en pacientes como en sus contactos, observando un aumento de la expresión de la citocina IFN- $\gamma$  en pacientes PB. Así también se destaca la casi nula expresión de esta citocina en pacientes MB.

En cuanto a los contactos se observó una tendencia de aumento de citocinas del perfil Th1 IFN- $\gamma$  e IL-12 en contactos de PB principalmente, pero también hubo un aumento en el grupo de contactos LL, que presentan mayor exposición a los bacilos.

## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect* [Internet]. 2015.
2. Garnier T, Monot M, Honore N, Spencer JS, Truman RW, Williams DL, et al. On the Origin of Leprosy. 2003;85(1999):11–4.
3. Robbins G, Mushrif Tripathy V, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS One*. 2009;4(5):1–8.
4. WHO. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. *Wkly Epidemiol Rec*. 2020;95(36):417–40.
5. SHEPARD CC, MCRAE DH. *Mycobacterium Leprae* in Mice: Minimal Infectious Dose, Relationship. *J Bacteriol*. 1965;89(2):365–72.
6. Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: A model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *DMM Dis Model Mech*. 2013;6(1):19–24.
7. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Kapopoulou AP-. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(9):753.
8. Arraes MLB de M, De Holanda MV, Lima LNGC, Sabadia JAB, Duarte CR, Almeida RLF, et al. Natural environmental water sources in endemic regions of northeastern Brazil are potential reservoirs of viable *Mycobacterium leprae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(12):805–11.
9. World Health Organization. WHO | Microbiology: culture in vivo [Internet]. WHO. World Health Organization; 2016 [cited 2021 Feb 21]. Available from: [http://www.who.int/lep/in\\_vivo/en/](http://www.who.int/lep/in_vivo/en/)
10. Brakel WH Van, Post E, Saunderson P, Gopal K. *Leprosy*. Elsevier. 2017;4:391–401.
11. Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity. *Int J Lepr*. 1966;34(3):255–73.
12. WHO. Expert Committee on Leprosy. Eighth report. Vol. 8th report, World Health Organization. 2012.
13. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol* . 2015;33(1):26–37.

14. WHO. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy. World Heal Organ. 2017;1:87.
15. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia mundial para la lepra 2016 – 2020. 2016. 11–13 p.
16. Camacho LAB, Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JAC, Sarno EN. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts : a cohort study. 2008;
17. Furlaneto IP. Age , gender and BCG vaccination status as risk factors for Leprosy in endemic areas of northern. :1–11.
18. Noordeen SK. Elimination of leprosy as a public health problem: Progress and prospects. Bull World Health Organ. 1995;73(1):1–6.
19. Campos M De, Azevedo S, Marques H, Sarri L, Mariana B, Vieira S, et al. Simultaneous analysis of multiple T helper subsets in leprosy reveals distinct patterns of Th1 , Th2 , Th17 and Tregs markers expression in clinical forms and reactional events. 2017;429–39.
20. Modlin RL. Th1-Th2 Paradigm, insights from leprosy. Invest Dermatol. 1994;102:828–32.
21. Salgame P, Yamamura M, Bloom BR, Modlin RL. Evidence for functional subsets of CD4+ and CD8+ T cells in human disease: lymphokine patterns in leprosy. Chem Immunol. 1992;54:44–59.
22. Antonio J, Quaresma S. Leprosy As a Complex infection : Breakdown of the Th1 and Th2 immune Paradigm in the immunopathogenesis of the Disease. 2017;8(November):18–21.
23. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. Mycobacterium leprae actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. Infect Immun. 2010 Jan;78(1):293–300.
24. Sieling PA, Modlin RL. Cytokine Patterns at the Site of Mycobacterial Infection. Immunobiology. 1994;191(4–5):378–87.
25. Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells : Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. 2016;1–16.
26. Rodríguez R, Ribeiro AB, Martin G. Analysis of clinical data and T helper 1 /

- T helper 2 responses in patients with different clinical forms of leprosy. 2017;50(October 2016):208–15.
27. Lienhardt C, Fine PE. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? *Lepr Rev.* 1994 Mar;65(1):9–33.
  28. Bhat RM, Vaidya TP. What is New in the Pathogenesis and Management of Erythema Nodosum Leprosum. *Indian Dermatol Online J.* 2020;11(4):482–92.
  29. Kahawita IP, Lockwood DNJ. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Apr;102(4):329–37.
  30. Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol.* 2015;33(1):46–54.
  31. Salgado CG, Pinto P, Bouth RC, Gobbo AR, Messias ACC, Sandoval TV, et al. miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology. *Front Immunol.* 2018;9:463.
  32. Tal-Singer R, Lasner TM, Podrzucki W, Skokotas a, Leary JJ, Berger SL, et al. Gene expression during reactivation of herpes simplex virus type 1 from latency in the peripheral nervous system is different from that during lytic infection of tissue cultures. *J Virol.* 1997;71(7):5268–76.
  33. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Apr;19(2):338–81.
  34. Lastória JC, Abreu MAMM de. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects--part 2. *An Bras Dermatol.* 2014;89(3):389–401.
  35. PNCL. Manual de Normas y Procedimientos Paraguay 2015 Programa Nacional de Control de Lepra. 2015;
  36. Gama RS, Leite LA, Colombo LT, Fraga LA de O. Prospects for new leprosy diagnostic tools, a narrative review considering ELISA and PCR assays. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20200197.
  37. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem.* 1982 Dec;257(24):15072–8.
  38. Aspinall GO, Chatterjee D, Brennan PJ. The variable surface glycolipids of

- mycobacteria: structures, synthesis of epitopes, and biological properties. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 1995;51:169–242.
39. Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev.* 2011;82(4):344–57.
  40. Díaz Acosta CC, Dias AA, Rosa TLSA, Batista-Silva LR, Rosa PS, Toledo-Pinto TG, et al. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR $\gamma$  cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. Vol. 14, *PLoS Pathogens.* 2018. 1–33 p.
  41. Manca C, Peixoto B, Malaga W, Guilhot C, Kaplan G. Modulation of the cytokine response in human monocytes by *mycobacterium leprae* phenolic glycolipid-1. *J Interf cytokine Res Off J Int Soc Interf Cytokine Res.* 2012 Jan;32(1):27–33.
  42. Richardus RA, van der Zwet K, van Hooij A, Wilson L, Oskam L, Faber R, et al. Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):1–13.
  43. Penna MLF, Penna GO, Iglesias PC, Natal S. Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases : Systematic Review and Meta- analysis. 2016;1–11.
  44. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP V, Martelli CMT, et al. Use of Protein Antigens for Early Serological Diagnosis of Leprosy □. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(11):1400–8.
  45. Mizoguti D, Hungria EM, Freitas AA, Oliveira RM, Cardoso LPV, Costa MB, et al. Multibacillary leprosy patients with high and persistent serum antibodies to leprosy IDRI diagnostic-1/LID-1: Higher susceptibility to develop type 2 reactions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(7):914–20.
  46. Herwanto N, Rosita C, Prakoeswa S, Izumi S, Duthie MS, Agusni I, et al. Potential for serodiagnosis of Indonesian leprosy patients by detecting antibodies against LID-1. 2019;11:19–21.
  47. Maria M, Souza D, Netto EM, Nakatani M, Duthie MS. Utility of recombinant proteins LID-1 and PADL in screening for *Mycobacterium leprae* infection

- and leprosy. 2014;1–7.
48. Reece ST, Ireton G, Mohamath R, Guderian J, Goto W, Gelber R, et al. ML0405 and ML2331 Are Antigens of Mycobacterium leprae with Potential for Diagnosis of Leprosy. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(3):333–40.
  49. Amorim FM, Nobre ML, Ferreira LC, Nascimento LS, Miranda AM, Monteiro GRG, et al. Identifying Leprosy and Those at Risk of Developing Leprosy by Detection of Antibodies against LID-1 and LID-NDO. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):1–17.
  50. Marçal PHF, Fraga LA de O, de Mattos AMM, Menegati L, Coelho A da CO, Pinheiro RO, et al. Utility of immunoglobulin isotypes against LID-1 and NDO-LID for, particularly igG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(5):1–8.
  51. Chen X, You Y, Yuan Y, Yuan LC, Zhang Y, Id WY. Evaluation of antigen-specific immune responses for leprosy diagnosis in a hyperendemic area in China. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;1–16.
  52. Oliveira C, Fabri C, Paula A, Carvalho M, Vieira NF, Bueno IDC, et al. Integrative literature review of the reported uses of serological tests in leprosy management. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(2):158–64.
  53. Douglas JT, Cellona R V, Fajardo TT, Abalos RM, Balagon MVF, Klatser PR, et al. Prospective Study of Serological Conversion as a Risk Factor for Development of Leprosy among Household Contacts. 2004;11(5):897–900.
  54. Burki T. Fight against leprosy no longer about the numbers. *Lancet Infect Dis.* 2011;10(2):74.
  55. Chaitra P, Bhat RM. Postelimination status of childhood leprosy: Report from a tertiary-care hospital in South India. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
  56. Programa Nacional de Control de Lepra MSP y BS. ATENCIÓN DE LA DISCAPACIDAD: PERSPECTIVA DEL PAÍS- PARAGUAY. World Health Organization. 2020. p. 1–37.
  57. Spencer JS, Duthie MS, Geluk A, Balagon MF, Kim HJ, Wheat WH, et al. Identification of serological biomarkers of infection , disease progression and treatment efficacy for leprosy. 2015;107:79–89.
  58. Spencer JS, Hacker MAVB, Martins MVS, Guimara MMS, Costa LS,

- Carvalho FM, et al. Pathogen-Specific Epitopes as Epidemiological Tools for Defining the Magnitude of Mycobacterium leprae Transmission in Areas Endemic for Leprosy. 2012;6(4).
59. Carvalho F, Duppre C, Marques De Rodrigues LS, Alvim MP, Ribeiro-alves M, Pinheiro RO, et al. Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to Mycobacterium leprae specific antigens. 2017;1–16.
  60. Martinez A, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of Mycobacterium leprae viability by use of real-time PCR. J Clin Microbiol. 2009;47(7):2124–30.
  61. Rêgo JL, de Lima Santana N, Machado PRL, Ribeiro-Alves M, de Toledo-Pinto TG, Castellucci LC, et al. Whole blood profiling of leprosy type 1(reversal) reactions highlights prominence of innate immune response genes. BMC Infect Dis. 2018;18(1):422.
  62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Methods. 2001;25(4):402–8.
  63. White C, Franco-Paredes C. Leprosy in the 21st century. Clin Microbiol Rev. 2015 Jan;28(1):80–94.
  64. Aldama A, Rivelli V, Aldama O, Ozecoski D, Gorostiaga G. Lepra Hoy Consideraciones Epidemiológicas del Hospital Nacional . Vol. 1, Revista del Nacional (Itauguá) . scielo ; 2009. p. 27–30.
  65. Alotaibi MH, Bahammam SA, ur Rahman S, Bahnassy AA, Hassan IS, Alothman AF, et al. The demographic and clinical characteristics of leprosy in Saudi Arabia. J Infect Public Health. 2016;9(5):611–7.
  66. Nery JS, Ramond A, Pescarini JM, Alves A, Strina A, Ichihara MY, et al. Socioeconomic determinants of leprosy new case detection in the 100 Million Brazilian Cohort: a population-based linkage study. Lancet Glob Heal. 2019;7(9):e1226–36.
  67. Dhavalshankh GP, Dhavalshankh AG, Gaurkar S. Assessment and Comparison of Liver Functions in Leprosy. 2017;9(5):26–32.
  68. Rao PSS. Liver in Leprosy: Histological and Biochemical Findings. Br Med J.

- 1971;1(5744):307–10.
69. Massone C, Belachew WA, Schettini A. Histopathology of the lepromatous skin biopsy. *Clin Dermatol*. 2015;33(1):38–45.
  70. Prasad PVS, Kaviarasan PK, Kannambal K, Poorana B AR. Recent Advances in Diagnostic Techniques and New Hope Towards Leprosy Elimination in the Post Elimination Era. *J Clin Dermatol Ther*. 2017;4:027.
  71. Barreto JG, Bisanzio D, Frade MAC, Moraes TMP, Gobbo AR, Guimarães L de S, et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC Infect Dis*. 2015;15(1):1–9.
  72. Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol*. 2003;41(5):1991–5.
  73. Bazan-Furini R, Motta ACF, Simão JCL, Tarquínio DC, Marques W, Barbosa MHN, et al. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(5):536–40.
  74. Araújo S, Lobato J, Reis É de M, Souza DOB, Gonçalves MA, Costa AV, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(SUPPL.1):55–9.
  75. Lefford MJ, Hunegnaw M SE. The value of IgM antibodies to PGL-I in the diagnosis of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1991;59(3):432-40.
  76. Espinosa OA, Benevides Ferreira SM, Longhi Palacio FG, Cortela D da CB, Ignotti E. Accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) in Detecting Antibodies against *Mycobacterium leprae* in Leprosy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Infect Dis Med Microbiol = J Can des Mal Infect la Microbiol medicale*. 2018;2018:9828023.
  77. Praputpittaya K, Suriyanon V, Hirunpetcharat C, Rungruengthanakit K, Suphawilai C. Comparison of IgM, IgG and IgA responses to *M.leprae* specific antigens in leprosy. *Asian Pacific J Allergy Immunol*. 1990;8(1):19–25.

78. Frade MAC, de Paula NA, Gomes CM, Vernal S, Bernardes Filho F, Lugão HB, et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):1–12.
79. Limeira OM, Gomes CM, Morais OO De, Cesetti MV, Alvarez RRA. Busca ativa por casos de hanseníase no centro-oeste do Brasil: Avaliação sorológica dos contatos domiciliares assintomáticos antes e após a profilaxia com *Bacillus Calmette-Guérin*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(3):173–7.
80. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Apr;8(4):e2655.
81. Reis EM, Araujo S, Lobato J, Neves AF, Costa A V., Gonçalves MA, et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(5):447–52.
82. Manta FS de N, Leal-Calvo T, Moreira SJM, Marques BLC, Ribeiro-Alves M, Rosa PS, et al. Ultra-sensitive detection of *mycobacterium leprae*: DNA extraction and PCR assays. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(5):1–15.
83. Gama RS, Gomides TAR, Gama CFM, Moreira SJM, de Neves Manta FS, de Oliveira LBP, et al. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):1–6.
84. Pathak VK, Singh I, Turankar RP, Lavania M, Ahuja M, Singh V, et al. Utility of multiplex PCR for early diagnosis and household contact surveillance for leprosy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019;95(3):114855.
85. Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Ozo M. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. 2011;5(10):1–8.
86. Marques LÉC, Frota CC, Quetz J da S, Bindá AH, Mota RMS, Pontes MA de A, et al. Evaluation of 16S rRNA qPCR for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal secretion and skin biopsy samples from multibacillary and paucibacillary leprosy cases. *Pathog Glob Health*. 2018;112(2):72–8.
87. Angst DBM, Pinheiro RO, Vieira JS da S, Cobas RA, Hacker M de AVB, Pitta IJR, et al. Cytokine Levels in Neural Pain in Leprosy. *Front Immunol*.

- 2020;11(January):1–9.
88. Orlova M, Cobat A, Huong NT, Ba NN, Van Thuc N, Spencer J, et al. Gene Set Signature of Reversal Reaction Type I in Leprosy Patients. *PLoS Genet.* 2013;9(7):1–11.
  89. Sutherland JS, Loxton AG, Haks MC, Kassa D, Ambrose L, Lee JS, et al. Differential gene expression of activating Fc $\gamma$  receptor classifies active tuberculosis regardless of human immunodeficiency virus status or ethnicity. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(4).
  90. Spellberg B, Edwards Jr. JE. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clin Infect Dis.* 2001 Jan 1;32(1):76–102.
  91. Tió-Coma M, van Hooij A, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Banu S, Khadge S, et al. Whole blood RNA signatures in leprosy patients identify reversal reactions before clinical onset: a prospective, multicenter study. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–12.
  92. Paschoal D. Update on Genetics of Leprosy. *J Anc Dis Prev Remedies.* 2014;02(01):1–6.
  93. Vannberg FO, Chapman SJ, Hill AVS. Human genetic susceptibility to intracellular pathogens. *Immunol Rev.* 2011 Mar;240(1):105–16.
  94. Shields ED, Russell DA, Pericak-Vance MA. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *J Clin Invest.* 1987 Apr;79(4):1139–43.
  95. Marçal PHF, Gama RS, Pereira de Oliveira LB, Martins-Filho OA, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. Functional biomarker signatures of circulating T-cells and its association with distinct clinical status of leprosy patients and their respective household contacts. *Infect Dis poverty.* 2020 Dec;9(1):167.
  96. Upadhyay R, Dua B, Sharma B, Natrajan M, Jain AK, Kithiganahalli Narayanaswamy B, et al. Transcription factors STAT-4, STAT-6 and CREB regulate Th1/Th2 response in leprosy patients: effect of *M. leprae* antigens. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):52.
  97. Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Jain S, Brooks P, Colston MJ. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. 2000;75:69–76.
  98. Simoes Quaresma JA, de Almeida FAC, de Souza Aarao TL, de Miranda

- Araujo Soares LP, Nunes Magno IM, Fuzii HT, et al. Transforming growth factor  $\beta$  and apoptosis in leprosy skin lesions: possible relationship with the control of the tissue immune response in the *Mycobacterium leprae* infection. *Microbes Infect.* 2012;14(9):696–701.
99. Aarão TL de S, Esteves NR, Esteves N, Soares LP de M, Pinto D da S, Fuzii HT, et al. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. *Microb Pathog.* 2014 Dec;77:66–72.
  100. Zak DE, Penn-Nicholson A, Scriba TJ, Thompson E, Suliman S, Amon LM, et al. A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. *Lancet.* 2016;387(10035):2312–22.
  101. Khadge S, Banu S, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Goulart IM, Thapa P, et al. Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. *BMC Infect Dis.* 2015;15(1):1–12.
  102. Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts and their relevance for targeted interventions. In: *Contacts of Leprosy Patients Occurrence and prevention of the Disease.* Universal Press, Veenendaal The Netherlands; 2007. p. 18–21.
  103. Gillini L, Cooreman E, Wood T, Pemmaraju VR, Saunderson P. Global practices in regard to implementation of preventive measures for leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 May 4;11(5):e0005399–e0005399.
  104. Karlovich C, Duchateau-Nguyen G, Johnson A, McLoughlin P, Navarro M, Fleurbaey C, et al. A longitudinal study of gene expression in healthy individuals. *BMC Med Genomics.* 2009;2:1–16.
  105. Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K, et al. A Role for IL-12 Receptor Expression and Signal Transduction in Host Defense in Leprosy. *J Immunol.* 2001;167(2):779–86.
  106. Stefani MMA, Martelli CMT, Gillis TP, Group and the BLS. In Situ Type 1 Cytokine Gene Expression and Mechanisms Associated with Early Leprosy Progression. *J Infect Dis.* 2003 Oct 1;188(7):1024–31.
  107. Moraes MO, Sampaio EP, Nery JAC, Saraiva BCC, Alvarenga FBF, Sarno EN. Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. *Br J*

Dermatol. 2001;144(1):175–81.

108. de Macedo CS, Lara FA, Pinheiro RO, Schmitz V, de Berrêdo-Pinho M, Pereira GM, et al. New insights into the pathogenesis of leprosy: Contribution of subversion of host cell metabolism to bacterial persistence, disease progression, and transmission. *F1000Research*. 2020;9.

## **8. ANEXOS**

### 8.1.ANEXO 1

#### **Estimulación de sangre entera no fraccionada con antígenos específicos de *M. leprae* y controles.**

Dentro del marco de la caracterización de la respuesta inmunológica molecular de pacientes y contactos se llevaron a cabo ensayos de estimulación con antígenos con el fin de evaluar la respuesta humoral y celular en futuros experimentos. El ensayo de estimulación fue realizado con sangre fresca anticoagulada con heparina, dentro de las dos horas desde el momento de extracción, utilizando diferentes antígenos micobacterianos remitidos al IICS por la Fiocruz-Brasil y son: sonicado de *M. leprae*, el antígeno ML1419 y un pool de péptidos sintéticos con respuesta Th1 y Th2, cuya descripción y concentración empleada se encuentra detallada en la **Tabla 11**, así también fue empleado como control positivo de estimulación el antígeno SEB, por ser un mitógeno. Para la estimulación se emplearon juegos de 5 tubos los cuales consistían en: NIL (tubo sin estímulo), ML SON (tubo con sonicado de *M. leprae*), Pool (tubo con pool de péptidos sintéticos), MIT (tubo con enterotoxina estafilococcica B o SEB) y ML1419 (tubo con antígeno ML1419). El procedimiento de estimulación consistió en agregar 1 mL de sangre heparinizada dentro de cada tubo que contenía cada uno de los antígenos, dejando un tubo de sangre sin estimular por antígeno indicado (NIL) y posterior a 24 horas de incubación a una temperatura de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  y al 5% de  $\text{CO}_2$  para la proliferación celular, posteriormente el plasma fue separado del paquete celular, siendo así alicuotado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuro procesamiento para el dosaje de citocinas por sistema Luminex. Las células fueron purificadas, fijadas y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuros experimentos de citometría de flujo.

**Tabla 11.** Características de péptidos empleados para la estimulación de sangre

<b>Antígenos</b>	<b>Concentración final</b>
Sonicado de <i>M. leprae</i>	10 ug/mL
ML1419	5 ug/mL
Pool de 12 péptidos sintetizados <i>in vitro</i>	10 ug/mL por péptido

<b>Péptidos</b>	<b>Genes</b>
p51	ML1057
p52	ML1057
p56	ML0308
p59	ML0398c
p61	ML0398c
p65	ML1419c
p67	ML1419c
p68	ML1419c
p69	ML1419c
p70	ML1420
p71	ML1553
p73	ML1829

## 8.2. ANEXO 2

Tabla 12. Valores de hemograma y hepatograma de los pacientes al momento del diagnóstico

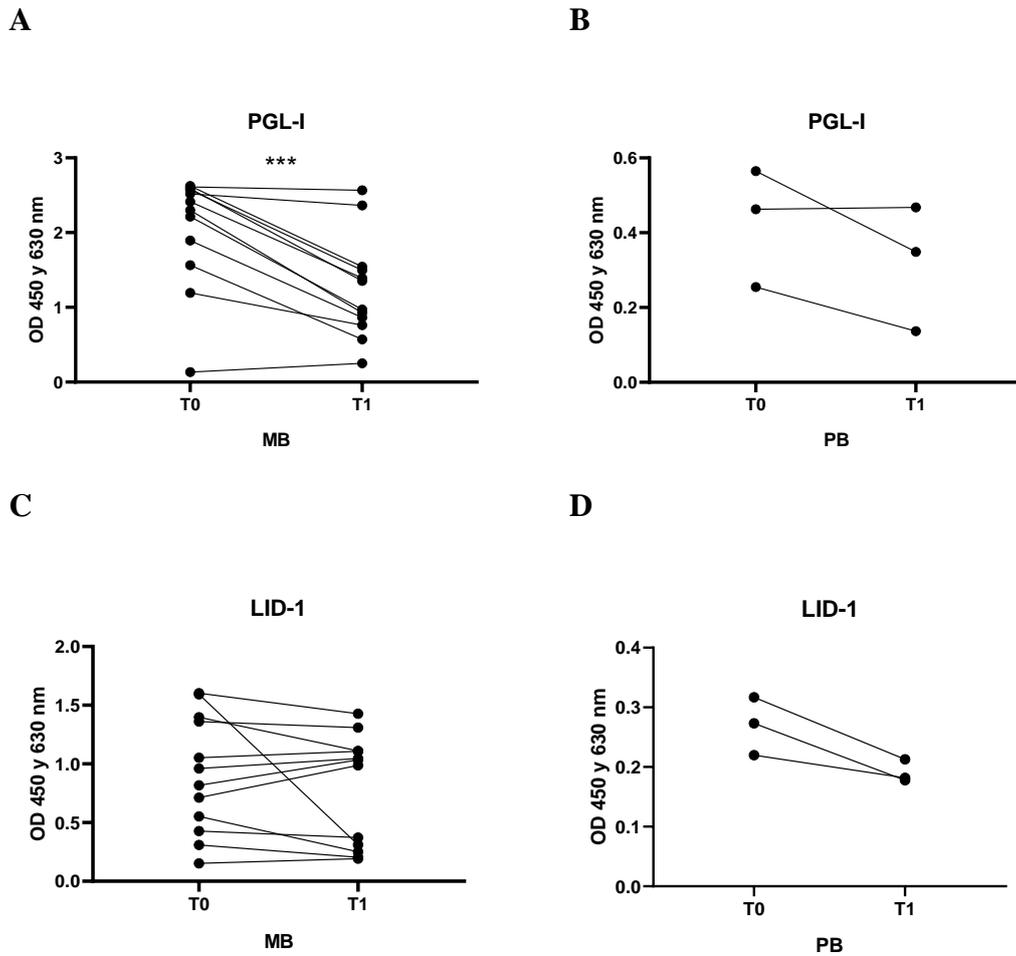
Paciente	HEMOGRAMA			HEPATOGRAMA						
	Glob Blancos	Neutrófilos	Linfocitos	GOT/AST U/L	GPT/ALT U/L	FA U/L	BT mg/dL	BD mg/dL	BI mg/dL	γGT U/L
1	7000	64%	33%	34	6	60	0,18	0,10	5,82	11
2	5600	66%	32%	5	6	34	0,2	0,1	5,80	20
3	7600	64%	35%	20	16	45	0,54	0,24	15,46	43
4	7000	64%	34%	23	20	67	0,91	0,31	19,09	18
5	6700	60	38%	23	12	61	1,03	0,28	10,97	26
6	5300	58%	41%	17	11	60	0,28	0,14	10,72	18
7	7500	50%	46%	23	44	109	0,37	0,18	43,63	31
8	6300	72	28%	16	10	47	0,65	0,2	9,35	5
9	8300	76	23%	19	16	19	0,56	0,17	15,44	100
10	6700	72	27%	42	13	76	1,09	0,48	11,91	24
11	6800	63	34%	41	51	78	0,46	0,18	50,54	0,1
12	7100	67	30%	23	13	68	0,56	0,2	12,44	25
13	12200	77	18%	7	8	103	0,5	0,19	7,50	46
14	6700	78	20%	12	15	34	0,42	0,15	14,58	9
15	5900	81	19%	23	21	88	0,49	0,15	20,51	18
16	4570	66%	29%	29	21	80	0,75	0,21	20,25	28
17	7250	73,20%	15%	27	11	73	0,43	0,19	10,57	16
18	7800	72	27%	37	22	72	0,71	0,23	21,29	14
19	5420	57%	28%	20	14	89	0,73	0,27	13,27	34
20	12670	69	29%	33	27	256	0,44	0,24	26,56	86
21	7700	72	26%	10	9	102	0,45	0,2	8,55	17
22	6600	53	44	20	27	89	1,06	0,3	0,76	35

## 8.3.ANEXO 3

Tabla 13. Valores de hemograma y hepatograma de contactos al momento del diagnóstico del caso índice

Contacto	HEMOGRAMA					HEPATOGRAMA				
	Glob Blancos	Neutrófilos	Linfocitos	GOT/AST U/L	GPT/ALT U/L	FA U/L	BT mg/dL	BD mg/dL	BI mg/dL	γGT U/L
1	9400	56%	42%	17	9	64	0,44	0,16	0,28	9
2	11900	74%	23%	8	9	96	0,26	0,2	0,06	18
3	7700	58%	40%	21	18	109	0,42	0,2	0,22	14
4	7900	63%	36%	30	39	172	0,37	0,16	38,63	26
5	6300	56%	42%	21	25	94	1,2	0,38	23,8	9
6	4500	59%	40%	20	14	66	0,67	0,23	13,33	14
7	8200	66%	32%	16	19	47	0,45	0,16	18,55	14
8	5800	56	43	15	25	87	0,64	0,19	24,36	16
9	7990	63%	29%	29	13	91	0,32	0,13	12,68	22
10	6350	73%	23%	29	15	100	0,23	0,1	14,77	24
11	7340	63,10%	28,40%	28	38	59	0,4	0,17	37,6	16
12	2830	53,80%	32,70%	13	13	69	0,54	0,21	12,46	48

## 8.4. ANEXO 4



**Figura 31. Niveles de anticuerpos anti PGL-I y anti LID-1 en el seguimiento de pacientes con lepra.** Evaluación de los niveles de anticuerpo de pacientes con lepra antes (T0) y después del tratamiento. A) PGL-I en pacientes MB B) PGL-I en pacientes PB C) LID-1 en pacientes MB D) LID-1 en pacientes PB.