

ANA CAROLINE CUNHA MESSIAS

ANÁLISE DE ANTICORPOS IgM ANTI-PGL-I EM CASOS DE  
HANSENÍASE E CONTATOS INTRADOMICILIARES NO ESTADO DO  
PARÁ

BELÉM

2017

ANA CAROLINE CUNHA MESSIAS

ANÁLISE DE ANTICORPOS IgM ANTI-PGL-I EM CASOS DE  
HANSENÍASE E CONTATOS INTRADOMICILIARES NO ESTADO DO  
PARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a  
Faculdade de Biologia, como requisito parcial  
para a obtenção de grau de Licenciada em  
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado.  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

BELÉM

2017

ANA CAROLINE CUNHA MESSIAS

ANÁLISE DE ANTICORPOS IgM ANTI-PGL-I EM CASOS DE  
HANSENÍASE E CONTATOS INTRADOMICILIARES NO ESTADO DO  
PARÁ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a  
Faculdade de Biologia, como requisito parcial  
para a obtenção de grau de Licenciada em  
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Avaliador: Prof. Dr. Moises Batista da Silva  
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Avaliador: Prof. Dr. Josafá Gonçalves Barreto  
Campus Castanhal - UFPA

BELÉM

2017

Epígrafe

“Seu foco determina sua realidade.”

Qui-Gon Jinn, Star Wars: Episódio I - A Ameaça Fantasma.

## Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha família. Nossos laços são mais do que genéticos ou físicos, por isso, longe ou perto estamos e estaremos sempre unidos. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

As instituições e aos órgãos Colorado State University, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa, Ordem de Malta, Secretaria de Estado de Saúde Pública, The Heiser Fund of the New York Community Trust, The James William Fulbright Scholar to Brazil e Universidade Federal do Pará pelo suporte e fomento direto ou indireto para a realização do trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado, aos professores Dr. John Stewart Spencer, Dr. Josafá Gonçalves Barreto e Dr. Moises Batista da Silva, as doutorandas Angélica Rita Gobbo e Raquel Carvalho Bouth, e a todos os alunos e técnicos do Laboratório de Dermato Imunologia UEPA/UFPA/MC pelas orientações e contribuições científicas.

A todos os pacientes atendidos e seus familiares que voluntariamente aceitaram participar do estudo, o que foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

A minha amada família pelo mais terno e sincero amor. Obrigada mãe, paidastro, meus queridos irmãos Jamilly e Wallace e a minha cunhada Amanda. Sem vocês nada jamais seria possível! Agradeço especialmente ao meu paidrasto por todos os desafios que passamos juntos. As viagens na garupa da bicicleta no sol ou na chuva até o cursinho pré-vestibular jamais serão esquecidas. Muito obrigada!

Aos meus amigos científicos Brennda Farinha e Leonardo dos Santos pelas conversas sobre ciência, vida e futuro. Vocês me inspiram a não desistir de ser cientista.

Aos meus amigos e ao professor Elias de Souza da escola E.E.F.M. Prof. José Alves Maia por sempre me incentivarem a investir e acreditar nos meus sonhos.

E aos meus amigos de graduação Layla Schneider e Felipe Castro pelo companheirismo e apoio nos momentos difíceis.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Modelo esquemático dos componentes da superfície celular do *M. leprae*. LAM: Lipoarabinomanana; LM: Lipomanana; PDIM: Micocerosoico de Fitiocerosol Dimicocerosato; PGL-I: Glicolípido Fenólico I; PIMs: Fosfatidilinositol Manosidases; PL: Fosfolípido; TMM: Micólico de Trealose Monomicolato. Fonte: adaptado de Vissa & Brennan (2001).

Figura 2. Modelo esquemático da estrutura molecular do antígeno Glicolípido Fenólico I. Fonte: adaptado de Vissa & Brennan (2001) e Spencer & Brennan (2011).

Figura 3. Modelo esquemático da interação entre o *M. leprae* e a célula de Schwann.  $\alpha$ -dystroglycan:  $\alpha$ -distroglicana; LAMA2: Subunidade de Laminina Alfa 2; LBP21: Proteína de Ligação de Laminina 21; PGL-I: Glicolípido Fenólico I. Fonte: adaptado Misch et al. (2010).

Figura 4. Modelo esquemático dos possíveis danos nos nervos periféricos devido ao tropismo do *M. leprae* por células de Schwann. Fonte: adaptado de adaptado Misch et al. (2010).

Figura 5. Distribuição geográfica dos casos novos com hanseníase registrados em 2015. Fonte: adaptado de WHO (2016).

Figura 6. Localização geográfica das áreas selecionadas no estado do Pará. Fonte: LDI.

Figura 7. Comparação da secreção de anticorpos anti-PG-I. Em A, comparação entre os grupos caso e contato. Em B, comparação entre os grupos caso\* (pacientes que já estavam notificados no SINAN-SVS/MS), caso novo (pacientes diagnosticados clinicamente pela equipe) e contato. *Cut-off* para positividade de 0,295 de densidade óptica.

Figura 8. Comparação da secreção de anticorpos anti-PGL-I de acordo com Índice de Desenvolvimento Humano Municipal das 7 áreas analisadas. *Cut-off* para positividade de 0,295 de densidade óptica. IDHM: Índice de Desenvolvimento Humano Municipal.

Tabela 1. Esquemas terapêuticos de acordo com a classificação operacional.

Tabela 2. População de estudo.

Tabela 3. Classificação dos pacientes avaliados pela equipe multidisciplinar.

Tabela 4. Características dos casos novos diagnosticados pela equipe multidisciplinar.



## RESUMO

A hanseníase pode gerar incapacidades físicas se não for diagnosticada e adequadamente tratada. E apesar da diminuição da taxa de detecção de casos novos no estado do Pará nos últimos anos, o estado ainda caracteriza-se como hiperendêmico para hanseníase em menores de 15 anos. Essa patologia possui diagnóstico essencialmente clínico, havendo dificuldade no reconhecimento das formas iniciais, pois as lesões são discretas e com sutis alterações de sensibilidade, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias e ferramentas laboratoriais que auxiliem nesse diagnóstico. Dessa forma, analisamos a produção de anticorpos IgM anti-Glicolípido Fenólico I (PGL-I) em casos de hanseníase e contatos intradomiciliares no estado do Pará. No estudo foram selecionados randomicamente 385 indivíduos, sendo 124 casos de hanseníase (41 casos que já estavam registrados no sistema de notificação, e 83 casos novos diagnosticados através de busca ativa), e 261 contatos intradomiciliares para a quantificação de anticorpos IgM anti-PGL-I pela técnica ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). No momento do diagnóstico 13,2% dos casos novos apresentaram algum grau de incapacidade física sugerindo que esses indivíduos possivelmente não foram diagnosticados nas unidades básicas de saúde, a tempo de prevenir a evolução da doença e o desenvolvimento de incapacidades. E ao quantificar os anticorpos IgM anti-PGL-I foi observado que a titulação não diferiu entre os grupos (casos e contatos), possivelmente devido à alta exposição da população paraense ao agente *Mycobacterium leprae*. Além do acompanhamento clínico sugere-se o acompanhamento dos níveis de anticorpos IgM anti-PGL-I em contatos intradomiciliares. A análise do número de casos novos com algum grau de incapacidade e das titulações de IgM anti-PGL-I, demonstram que a redução da taxa de detecção no estado do Pará pode ser devido a uma possível falta de diagnóstico, em consequência do negligenciamento em diferentes graus de responsabilidade.

Palavras-chave: Hanseníase, *Mycobacterium leprae* e PGL-I.

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HANSENÍASE.....	1
1.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	4
1.3. TRATAMENTO.....	6
1.4. EPIDEMIOLOGIA.....	7
1.5. TESTES IMUNOLÓGICOS.....	8
2. JUSTIFICATIVA.....	10
3. OBJETIVOS .....	11
3.1. GERAL .....	11
3.2. ESPECÍFICOS .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	12
4.2. QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PGL-I.....	13
4.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5.1. CASOS NOVOS DIAGNOSTICADOS.....	16
5.2. QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PGL-I.....	18

6. CONCLUSÕES.....	21
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
8. ANEXO.....	27

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos, caracterizada por manchas hipocrômicas, eritematosas ou nódulos infiltrados na pele com alteração de sensibilidade (tátil, térmica e/ ou dolorosa) e pelo comprometimento dos nervos periféricos com alterações sensitivas, motoras e/ou autonômicas (BRASIL, 2016a; WALKER; LOCKWOOD, 2006). Sua transmissão se dá através das vias respiratórias superiores entre indivíduos doentes e susceptíveis, assim quanto mais íntimo e prolongado for o contato com os pacientes maior é a probabilidade de transmissão e contágio (BAKKER et al., 2004).

O principal agente etiológico da hanseníase é a bactéria intracelular obrigatória *Mycobacterium leprae*, descoberta pelo médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873 (FITNESS; TOSH; HILL, 2002). Esse patógeno é um bacilo Gram-positivo álcool-ácido resistente, cuja parede celular é constituída por peptídeoglicanos presentes sobre a membrana plasmática associados à glicoproteínas arabinomananas e galactanas que se ligam a ácidos micólicos formando um folheto externo de pseudo bicamada lipídica. Muitas moléculas do folheto externo ligam-se a fosfolípidos e fosfatidilinositóis, e formam uma região similar a uma cápsula (Figura 1). O lipídio predominante na parede celular e que confere especificidade imunológica ao patógeno é o Glicolipídio Fenólico I (PGL-I), molécula composta por um fitiocerol, com duas cadeias de ácidos micossericos, ligado a um trissacarídeo, através de um radical fenólico (SCOLLARD et al., 2006; VISSA; BRENNAN, 2001) (Figura 2).

A sobrevivência do parasita é dependente da sua invasão na célula hospedeira. O *M. leprae* infecta principalmente macrófagos e células de Schwann (BODDINGIUS, 1974), que são as células responsáveis pela mielinização e manutenção do metabolismo energético axonal do sistema nervoso periférico (MEDEIROS et al., 2016). O bacilo interage com as células de Schwann através do antígeno PGL-I e da Proteína de Ligação de Laminina 21 que

ligam-se com a Cadeia  $\alpha 2$  de Laminina-2 e  $\alpha$ -dístroglicana localizadas na membrana da célula de Schwann, facilitando a invasão da célula hospedeira (NEAL; GASQUE, 2016; RAMBUKKANA, 2001) (Figura 3).

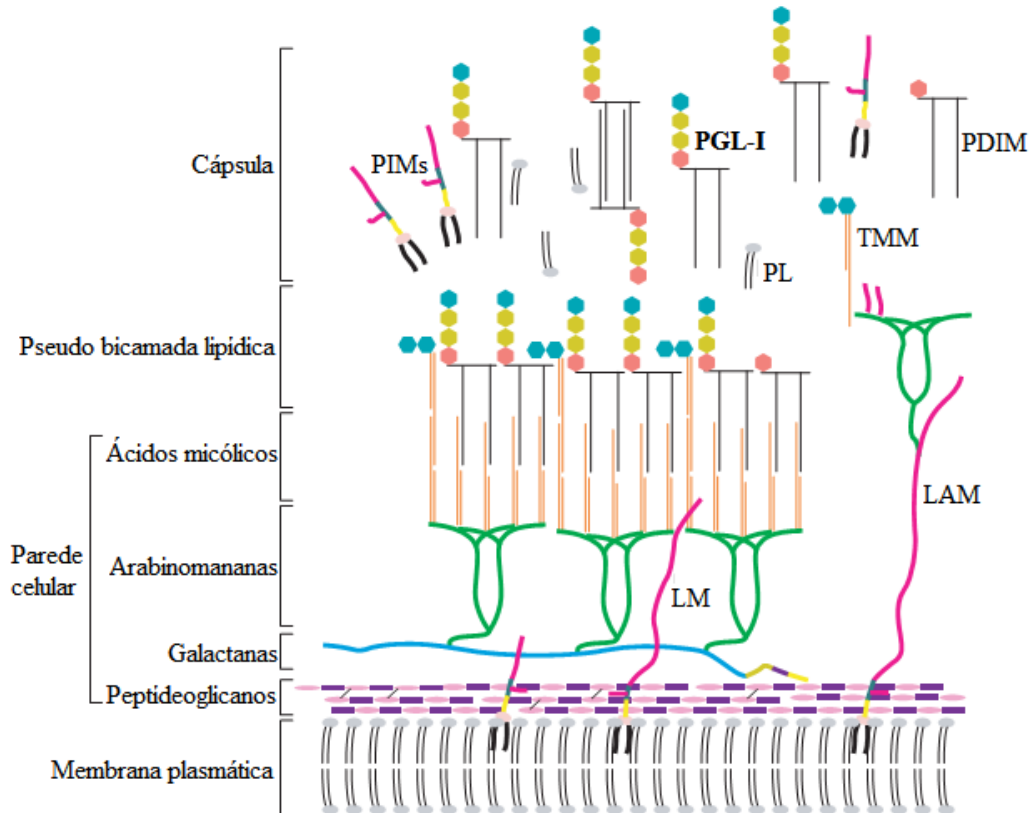


Figura 1. Modelo esquemático dos componentes da superfície celular do *M. leprae*. LAM: Lipoarabinomanana; LM: Lipomanana; PDIM: Micocerosoico de Fitiocerosol Dimicocerosato; PGL-I: Glicolípido Fenólico I; PIMs: Fosfatidilinositol Manosidasas; PL: Fosfolípido; TMM: Micólico de Trealose Monomicolato. Fonte: adaptado de Vissa & Brennan (2001).

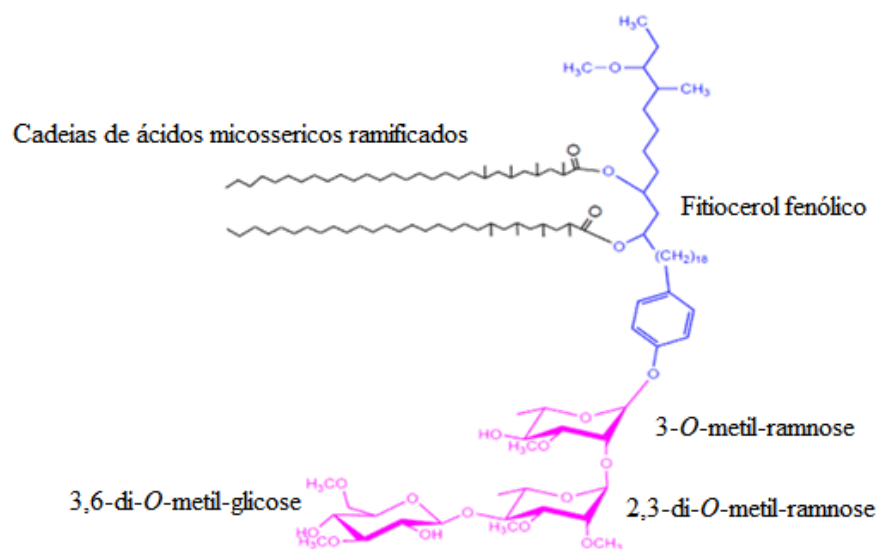


Figura 2. Modelo esquemático da estrutura molecular do antígeno Glicolípido Fenólico I. Fonte: adaptado de Vissa & Brennan (2001) e Spencer & Brennan (2011).

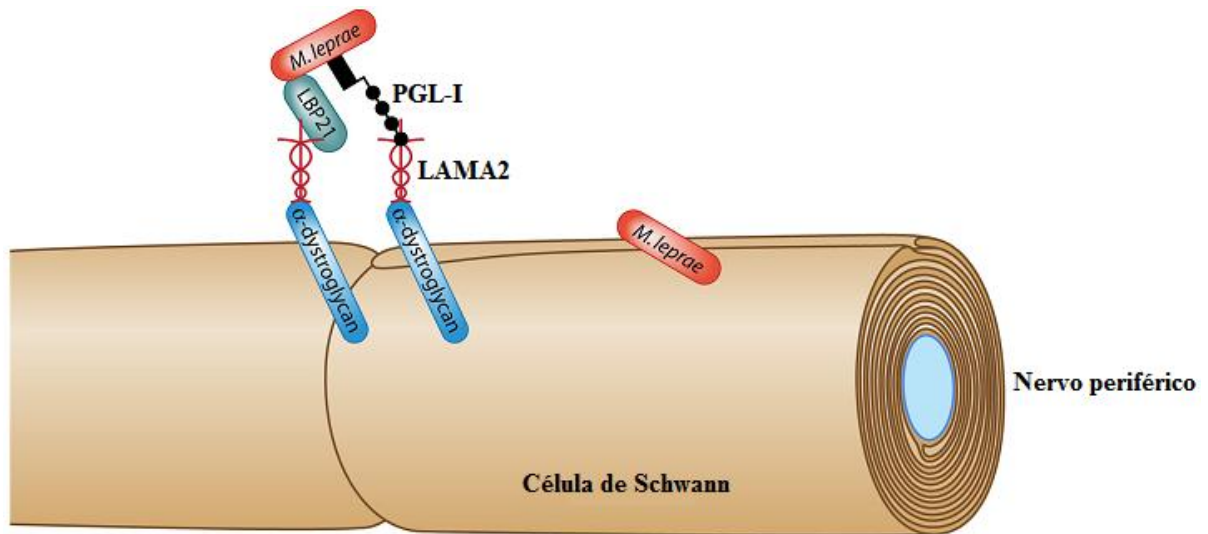


Figura 3. Modelo esquemático da interação entre o *M. leprae* e a célula de Schwann.  $\alpha$ -dystroglycan:  $\alpha$ -dístroglicana; LAMA2: Subunidade de Laminina Alfa 2; LBP21: Proteína de Ligação de Laminina 21; PGL-I: Glicolípido Fenólico I. Fonte: adaptado Misch et al. (2010).

A infecção das células de Schwann ocasiona danos como isquemia, apoptose ou desmielinização nos nervos periféricos e conseqüentemente leva às características clínicas da doença (SAINI et al., 2017). Diferentes mecanismos patogênicos são apontados como responsáveis pelos danos neurais, são eles: a interferência bioquímica do *M. leprae* no metabolismo das células parasitadas, os danos mecânicos devido ao influxo de células e líquido e/ ou os danos ocasionados pela resposta imune (SPIERINGS et al., 2000) (Figura 4).

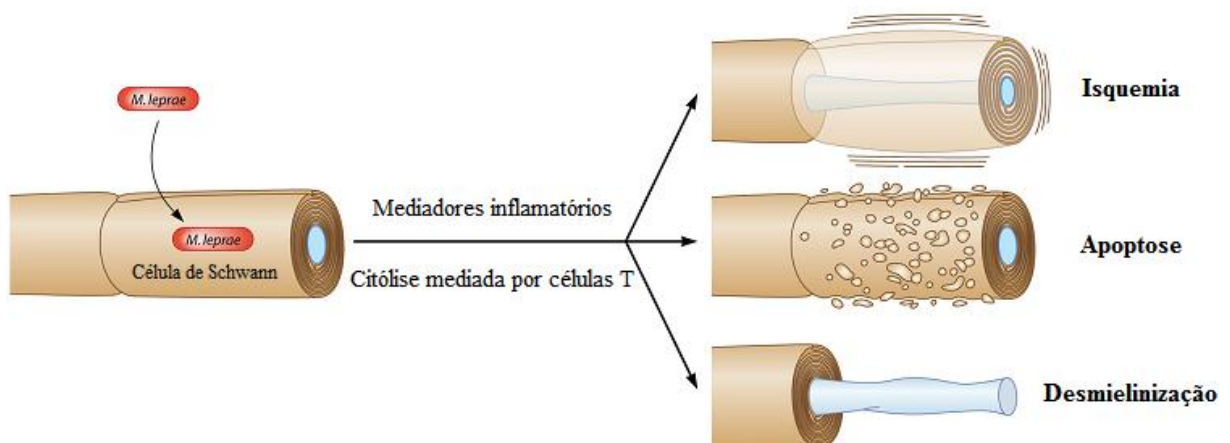


Figura 4. Modelo esquemático dos possíveis danos nos nervos periféricos devido ao tropismo do *M. leprae* por células de Schwann. Fonte: adaptado de adaptado Misch et al. (2010).

## 1.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A hanseníase apresenta um amplo espectro clínico, relacionado com a resposta imune do hospedeiro (NATH; SAINI; VALLURI, 2015), que ao tentar conter a invasão e infecção bacteriana ou seu desenvolvimento, contribui para a origem da doença (ESQUENAZI et al., 2015). O seu diagnóstico é essencialmente clínico, com base na presença de lesões na pele com alteração de sensibilidade, comprometimento dos nervos periféricos e/ou detecção de bacilo álcool ácido resistente em raspado intradérmico (baciloscopia) ou em biópsia cutânea ou de nervo periférico sensitivo (histopatologia) (BRASIL, 2016a; PINHEIRO et al., 2011).

Os pacientes são classificados de acordo com a classificação de Madri (1953) ou de Ridley & Jopling (1966) segundo critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos, havendo uma forma inicial denominada indeterminada (I) que pode evoluir para 5 grupos: tuberculoide (TT), dimorfo-tuberculoide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-virchowiano (DV) e virchowiano (VV). E para fins de tratamento e operacionalização a Organização Mundial da Saúde (OMS) divide os pacientes I e TT em paucibacilares (PB) e os pacientes DT, DD, DV e VV em multibacilares (MB) (DUTHIE et al., 2011) conforme o número de lesões na pele e/ou presença de bacilos no raspado intradérmico, onde os PB apresentam até cinco lesões e/ou baciloscopia negativa e os MB mais do que cinco lesões na pele e/ou baciloscopia positiva (BRASIL, 2016a).

O perfil patológico demonstrado pelos pacientes nas diferentes formas clínicas está relacionado ao padrão de resposta imune predominante em cada indivíduo. A imunidade celular é mediada primordialmente pelos linfócitos T (LT CD4<sup>+</sup> e LT CD8<sup>+</sup>) em colaboração com as células do sistema imune inato. Os Linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou LT auxiliares (Th) após serem ativados e diferenciados em distintos subtipos efetores desempenham um papel importante na resposta do hospedeiro através da secreção de citocinas, fatores de transcrição específicos e alterações epigenéticas (LUCKHEERAM et al., 2012). Acredita-se que a resistência ao *M. leprae* pode estar associada ao perfil de resposta Th1, que confere proteção contra agentes patogênicos intracelulares (CARUSO et al., 1999; DOCKRELL et al., 2000).

Os pacientes PB apresentam imunidade celular com predomínio de células T do subtipo pró-inflamatório (Th1) que se caracterizam pela secreção das citocinas interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina (IL)-2 que contribuem para a diminuição no número de bacilos do *M. leprae*. Em contraste, pacientes MB apresentam resposta imune caracterizada por células T do subtipo Th2 com a secreção das citocinas IL-4 e IL-10, que são anti-inflamatórias e pela produção elevada de anticorpos os quais não são capazes de conferir proteção ao *M. leprae* e seus antígenos, conseqüentemente os pacientes MB possuem baixa imunidade celular e elevada carga bacilar. (SINSIMER et al., 2010).

As respostas Th1 e Th2 não explicam completamente a resposta do hospedeiro frente ao *M. leprae*. As formas DT, DD e DV apesar de serem classificadas operacionalmente como MB são imunologicamente dinâmicas (FONSECA et al., 2017). Estudos recentes sugerem que células T do subtipo Th17 podem constituir um terceiro grupo na hanseníase, podendo ser uma via alternativa para os pacientes incapazes de montar uma resposta Th1 ou Th2 ou nos quais ainda não houve a definição de um polo (SAINI; RAMESH; NATH, 2013). Além disso, esse grupo de células vêm demonstrando apresentar uma função protetora contra a infecção pelo *M. leprae* devido potencializar a produção de IFN- $\gamma$ , sendo mais frequente nas formas TT e DT. Células T regulatórias, também demonstram desempenhar funções importantes na determinação imunológica, pois células T regulatórias que secretam a citocina Fator de Transformação de Crescimento  $\beta$  podem suprimir os LT efetores e estão elevadas em pacientes VV, o que pode explicar a anergia observada nessa forma (SADHU et al., 2016).

Uma outra manifestação clínica denominada primariamente neural (NP) também ocorre. A forma NP caracteriza-se pelo envolvimento assimétrico dos nervos periféricos, podendo apresentar-se como anestesia e/ ou alteração na força muscular, e pela ausência de manifestações cutâneas (FONSECA et al., 2017). Sua classificação em PB ou MB depende de fatores neurológicos, imunológicos e histopatológicos.

Em 2008 foi descrito outro agente etiológico para hanseníase, o *M. lepromatosis* responsável por uma forma clínica VV difusa, também conhecida como hanseníase difusa de Lucio ou Latapi predominantemente observada em pacientes no México ocidental e no Caribe. Essa manifestação clínica foi inicialmente descrita por Lucio e Alvarado em 1852 e por Latapi e Chevez-Zamora em 1948, ambos no México (HAN et al., 2008, 2012), sendo caracterizada por invasão e proliferação do patógeno no endotélio com oclusão vascular e/ ou



vasculite, infiltração cutânea difusa não modular e sem formação de placas, e lesões cutâneas que frequentemente em um estágio avançado podem tornarem-se ulceradas, o que é denominado fenômeno de Lucio, facilitando o desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias e sepse (REA; JERSKEY, 2005; VARGAS-OCAMPO, 2007).

### 1.3. TRATAMENTO

Os pacientes com hanseníase são tratados com poliquimioterapia (PQT) de acordo com a sua classificação operacional (Tabela 1), esse esquema terapêutico foi implementado em 1982 pela OMS e consiste na administração de clofazimina, dapsona e rifampicina (WHO, 1982). Indivíduos que não podem realizar o tratamento com clofazimina e dapsona utilizam antibióticos como claritromicina, minociclina e ofloxacina. Como o tratamento através da PQT é longo e por apresentar efeitos colaterais, como o escurecimento da pele provocado pela clofazimina, a adesão e a conclusão do tratamento são dificultados (WALKER; LOCKWOOD, 2006).

Tabela 1. Esquemas terapêuticos de acordo com a classificação operacional.

Classificação <sup>1</sup>	Adulto	Criança
PB	RFM dose mensal de 600 mg com administração supervisionada.	RFM dose mensal de 450 mg com administração supervisionada.
	DDS dose mensal de 100 mg supervisionada e dose diária de 100 mg autoadministrada.	DDS dose mensal de 50 mg supervisionada e dose diária de 50 mg autoadministrada.
MB	RFM dose mensal de 600 mg com administração supervisionada.	RFM dose mensal de 450 mg com administração supervisionada.
	DDS dose mensal de 100 mg supervisionada e dose diária de 100 mg autoadministrada.	DDS dose mensal de 50 mg supervisionada e dose diária de 50 mg autoadministrada.
	CFZ dose mensal de 300 mg com administração supervisionada e dose diária de 50 mg autoadministrada.	CFZ dose mensal de 150 mg com administração supervisionada e dose de 50 mg autoadministrada em dias alternados.

<sup>1</sup>De acordo com a Organização Mundial da Saúde (1982). PB: paucibacilar; MB: multibacilar; RFM: rifampicina; DDS: dapsona; CFZ: clofazimina. Fonte: Adaptado de Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública : manual técnico-operacional - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis (2016).

A oferta de doses mensais supervisionadas proporciona a oportunidade de acompanhar o tratamento, assim como educar o paciente sobre a necessidade de completar o tratamento para obter conseqüentemente alta por cura. A educação e reabilitação socioeconômica também são fatores importantes, pois devido o estigma físico, social e bíblico, que ainda é existente, os pacientes diagnosticados podem ser marginalizados (LOCKWOOD; SUNEETHA, 2005).

Apesar da contribuição da implantação do tratamento com PQT na década de 80 para a diminuição da prevalência da doença, as taxas de detecção de casos novos ainda permanecem altas, indicando que a interrupção da transmissão do *M. leprae* não será atingida apenas com o tratamento dos pacientes (PINHEIRO et al., 2011). Além disso, casos de resistência a um ou mais medicamentos utilizados vêm sendo observados (DA SILVA ROCHA et al., 2012; MATSUOKA, 2010). E há outros fatores que podem está associados a manutenção da hanseníase, como as condições socioeconômicas regionais e sub-regionais.

#### 1.4. EPIDEMIOLOGIA

Em muitos países a hanseníase ainda é um problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. No ano de 2015 foram registrados 210.758 casos novos (3,78/100.000 habitantes) no mundo, 81% desses casos foram detectados no Brasil (13%), na Índia (60%) e na Indonésia (8%) (Figura 5). Depois da Índia, com 127.326 casos novos detectados em 2015, o Brasil ocupa o segundo lugar mundial com 26.395 casos detectados em 2015, com redução de 4.669 casos quando comparado ao ano de 2014 com 31.064 casos novos detectados (WHO, 2016).

No país, na região Norte e no estado do Pará, tem sido observado uma tendência de redução na taxa de detecção de casos novos. Em 2015 na região Norte do país a taxa de detecção foi de 29,65/100.000 habitantes e no estado do Pará essa tendência (2003 com taxa de 29,37/ 100.000 habitantes a 2015 com taxa de 14,07/ 100.000 habitantes), culminou em 2015 na alteração seu perfil epidemiológico, de área hiperendêmica para área de muito alta endemia de acordo com o banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação da Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (SINAN-SVS/MS)

(BRASIL, 2016b). Porém, em relação a taxa de detecção em menores de 15 anos, um marcador epidemiológico indicativo de transmissão recente do *M. leprae*, o estado é caracterizado como uma área hiperendêmica com taxa de 13,3/ 100.000 habitantes (BRASIL, 2013, 2016b).

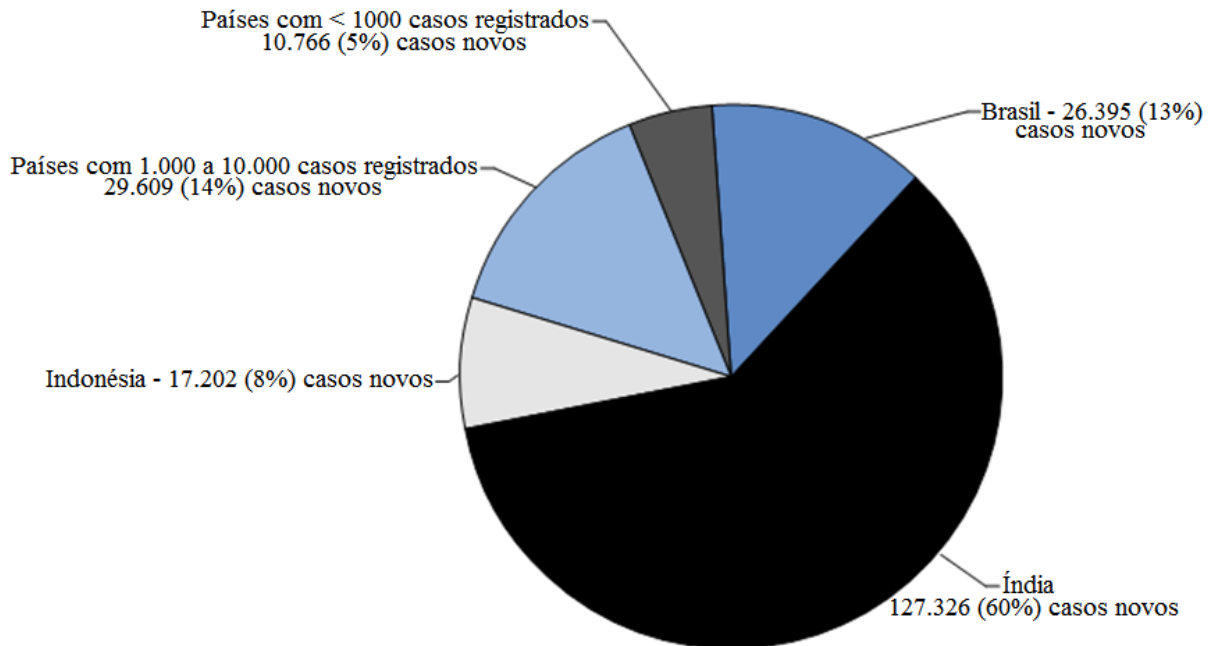


Figura 5. Distribuição geográfica dos casos novos com hanseníase registrados em 2015. Fonte: adaptado de WHO (2016).

### 1.5. TESTES IMUNOLÓGICOS

Durante a evolução da doença, devido ao tropismo do *M. leprae* pelas células de Schwann pode ocorrer o desenvolvimento de incapacidades físicas (deficiências e deformidades) graves, como lagofalmo (incapacidade de fechar os olhos), garras (dedos das mãos e/ou pés curvados ou dobrados) e reabsorção óssea (degeneração ou necrose óssea), se o paciente não for corretamente diagnosticado e adequadamente tratado com PQT (WALKER; LOCKWOOD, 2006). Dessa forma, se faz necessário o realizar o diagnóstico das formas iniciais da doença, o que possibilita realizar intervenções antes do aparecimento de incapacidades físicas. Nesse sentido, testes imunológicos vêm sendo utilizados como exames complementares para auxiliar no diagnóstico da hanseníase.

A reação de Mitsuda consiste em um teste baseado na injeção intradérmica do *M. leprae* atenuado para verificar a capacidade de elaboração de uma resposta imune celular eficiente através da formação de granuloma com diâmetro igual ou superior a 5 mm em até 28 dias. O teste geralmente apresenta positividade em indivíduos PB (granuloma com diâmetro  $\geq$  5 mm), enquanto que nos MB é negativo (granuloma ausente ou com diâmetro  $<$  5 mm). Este ensaio apresenta baixa especificidade à hanseníase, podendo gerar resultados falso-positivos em áreas endêmicas para hanseníase e tuberculose cujo agente etiológico é outra micobactéria, o *M. tuberculosis* (GELUK et al., 2012; PINHEIRO et al., 2011).

Com o desenvolvimento de estudos referentes à genômica, lipidômica e proteômica do *M. leprae*, têm sido possível a identificação de moléculas antigênicas que possam ser possíveis alvos para o diagnóstico inicial da hanseníase (DOCKRELL et al., 2000; GELUK et al., 2008). Nesse âmbito, vários antígenos do *M. leprae* vêm sendo estudados, a fim de indicar biomarcadores que possam contribuir para o diagnóstico da hanseníase em testes de imunidade celular e/ ou humoral.

Um dos antígeno do *M. leprae* que vem sendo investigado é o LID-1, uma molécula sintetizada a partir da fusão das proteínas ML0405 e ML2331 (DUTHIE et al., 2007), as quais demonstram estimulam respostas celular e humoral específicas para *M. leprae* (SAMPAIO et al., 2011). Em testes de imunidade humoral, é sugerido que a detecção de anticorpos anti-LID-1 pode evidenciar entre os contatos que residem com pacientes, aqueles que desenvolverão a doença. (DUTHIE et al., 2007), porém mais estudos devem ser realizados.

O principal antígeno investigado para hanseníase é o PGL-I. Os ensaios que detectam a presença de anticorpos IgM anti-PGL-I, (HUNTER; BRENNAN, 1981; SPENCER; BRENNAN, 2011) contribuem na identificação de pacientes MB, porém a aplicabilidade para os PB é limitada em virtude da baixa ativação da resposta imune humoral nesta forma clínica (DUTHIE et al., 2007). Apesar disso, a sorologia anti-PGL-I auxilia na identificação de indivíduos com risco mais elevado de desenvolver a doença, e em combinação com os parâmetros clínicos contribui para a classificação e monitoramento clínico dos pacientes (CARVALHO et al., 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

O contato contínuo com pacientes MB representa um risco de 8-10 vezes de desenvolver a doença, enquanto que para PB é de 2-4 vezes (PINHEIRO et al., 2011), esse risco está relacionado com a carga bacteriana do caso, a qual é mais elevada em MB (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). Nesse âmbito, diagnosticar e tratar casos com hanseníase, principalmente MB, é essencial para diminuir a cadeia de transmissão da doença, pois ao iniciar o tratamento os pacientes param de transmitir bacilos (PINHEIRO et al., 2011). No entanto, devido ao diagnóstico primordialmente clínico e evolução lenta da doença, há dificuldade no reconhecimento das formas iniciais, pois as lesões são discretas e com sutis alterações de sensibilidade. Assim, comumente os pacientes são diagnosticados apenas quando apresentam características clínicas evidentes e/ ou incapacidades físicas. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de estratégias e ferramentas laboratoriais que auxiliem no diagnóstico precoce.

A busca ativa é uma estratégia que vem demonstrando contribuir para identificação de casos novos, de possíveis focos ativos de circulação e transmissão do *M. leprae* e/ ou identificação de áreas com endemia oculta (BARRETO et al., 2011). A triagem sorológica e o acompanhamento de contatos, também representam uma estratégia útil para a detecção e controle (BARRETO et al., 2015; SALGADO et al., 2016), visto que esses indivíduos apresentam um risco maior de desenvolver a doença em comparação com população em geral (MOET et al., 2004). Diante disso, o presente estudo analisou a produção de anticorpos IgM anti-PGL-I em pacientes e contatos intradomiciliares no estado do Pará.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GERAL**

Analisar a produção de anticorpos IgM anti-PGL-I em casos de hanseníase e contatos intradomiciliares no estado do Pará.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

- Comparar a produção de anticorpos IgM anti-PGL-I entre casos e contatos.
- Relacionar a produção de anticorpos IgM anti-PGL-I em casos e contatos com a epidemiologia da doença no estado do Pará.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

No presente estudo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 26765414.0.0000.0018), uma equipe multidisciplinar, composta por médicos especializados em hanseníase, fisioterapeutas, biomédicos, técnicos de laboratório e técnicos de informação e outros profissionais, além de alunos de graduação e pós-graduação do Laboratório de Dermato Imunologia UEPA/UFPA/MC, avaliou 385 indivíduos em seis cidades do estado do Pará (Acará, Breves, Castanhal, Redenção, Santarém e Senador José Porfírio), e em um distrito administrativo da cidade de Belém (Mosqueiro), capital do estado (Figura 6). Sendo avaliados 83 indivíduos no Acará, 23 em Breves, 30 em Castanhal, 37 em Redenção, 82 em Santarém, 15 em Senador José Porfírio, e 115 em Mosqueiro.

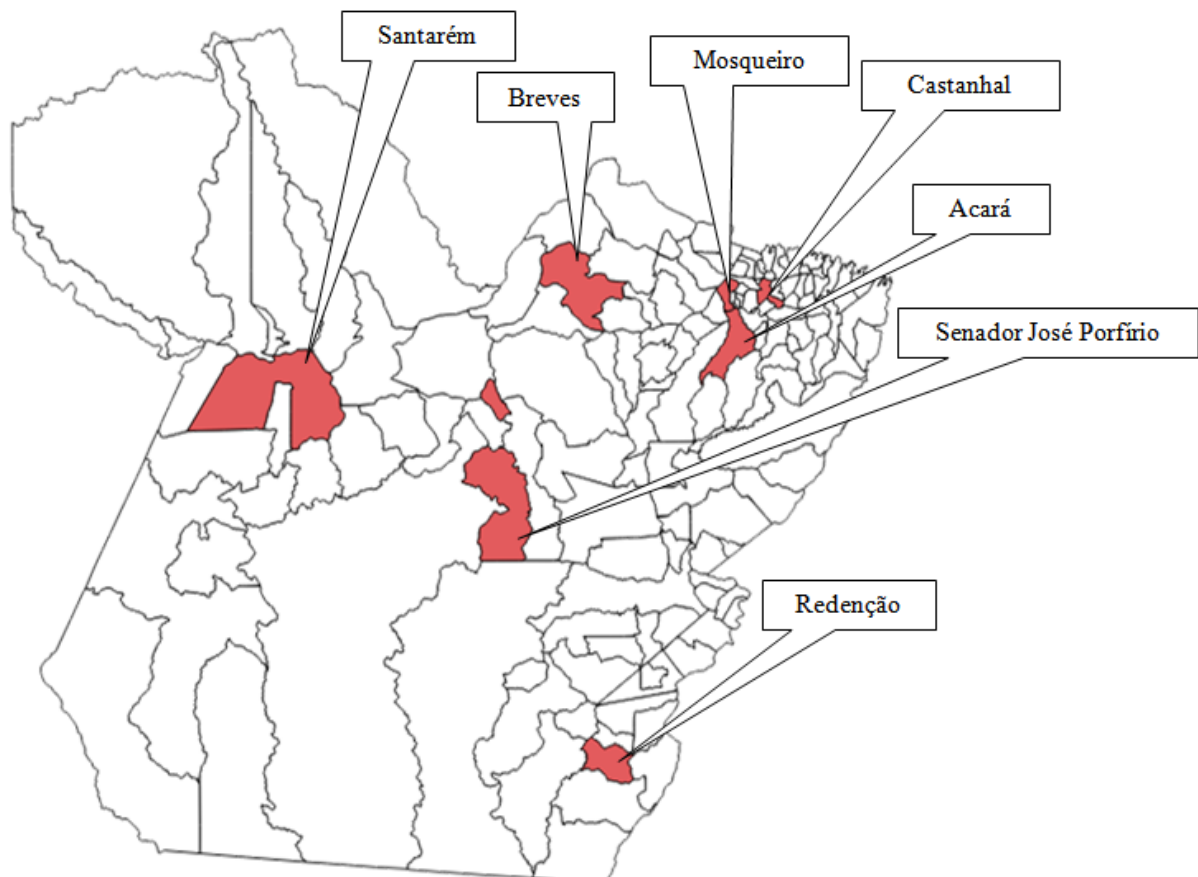


Figura 6. Localização geográfica das áreas selecionadas no estado do Pará. Fonte: LDI.

Os 385 indivíduos analisados foram agrupados em dois grupos: casos e contatos. O grupo casos compreende 41 pacientes que já estavam notificados no SINAN-SVS/MS, selecionados eletronicamente e diagnosticados no período de 2004 a 2015, e 83 casos diagnosticados pela busca ativa da equipe. E o grupo contato, composto por indivíduos que moram na mesma residência de um paciente, mas que não apresentam sinais ou sintomas clínicos da doença, inicialmente esse grupo foi formado por 344 indivíduos, entretanto, quando um contato foi diagnosticado clinicamente com hanseníase, ele foi incluído no grupo casos, dessa forma, no grupo contatos foram analisados 261 indivíduos (Tabela 2).

Tabela 2. População de estudo.

<b>Grupo (n)</b>	<b>Integrantes (n)</b>
Casos (124)	Casos já diagnosticados (41) e casos novos (83)
Contatos (261)	Contatos intradomiciliares sem sinais ou sintomas clínicos (261)

n: número de indivíduos.

A avaliação dos indivíduos ocorreu através da visita ao domicílio dos casos selecionados a partir do SINAN-SVS/MS, com auxílio de agentes comunitários de saúde locais. Na residência dos pacientes a equipe multidisciplinar avaliou os casos selecionados e seus contatos intradomiciliares. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo) antes da inclusão no estudo e coleta de material biológico.

O diagnóstico dos novos pacientes ocorreu com base em sinais clínicos, portanto, todos realizados por um médico especializado. Os pacientes diagnosticados foram classificados de acordo com a forma clínica segundo a classificação de Madri (1953) ou de Ridley & Jopling (1966) e na forma NP. Esses casos novos, também foram encaminhados para a realização de tratamento no município local de acordo com a classificação operacional da OMS (1982).

#### 4.2. QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PGL-I

Os anticorpos IgM anti-PGL-I foram quantificados por técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) através da molécula sintética Dissacarídeo Natural-



Octil-Albumina de Soro Bovino (ND-O-BSA), fornecida gentilmente pelo Dr. Malcolm S. Duthie (Infectious Disease Research Institute, Seattle, EUA). Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubos com EDTA (Polymed, cod. 50203). Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Dermato-Imunologia UEPA/UFGA/MC, localizado no município de Marituba-PA para a realização do ensaio. No laboratório, o plasma foi separado através do processo de centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos (min) e armazenado em *freezer* -80 °C para posterior quantificação dos anticorpos.

Inicialmente 50 mg/poço do antígeno ND-O-BSA diluído em 50 µL de solução de sensibilização (NaHCO<sub>3</sub> a 0,84% + Na<sub>2</sub>CO a 1,06%) foram transferidos para placa de 96 poços por um período de aproximadamente 24 horas a 4 °C. Após esse período, a placa foi lavada com 300 µL/poço de solução de bloqueio (SB) contendo tampão fosfato-salino (PBS) 1X + 1% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich®, cod. A7906-500G, MO-EUA) + 0,05% de Tween 20. Posteriormente esta foi lavada mais 3 vezes com 200 µL/poço de solução de lavagem (SL) contendo PBS 1X + 0.05% de Tween 20. Em seguida, 300 µL/poço de SB foram inseridos a placa por 1 hora a temperatura ambiente (TA). Então, 1 µL de plasma diluído em 300 µL/poço foram adicionados, em duplicata, aos seus respectivos poços e no branco. Após incubação de 2 horas a TA a placa foi lavada 3 vezes com 200 µL/poço de SL incubando-se por 10 min a TA, em seguida essa etapa foi realizada novamente. Logo após, foram inseridos 100 µL/poço do anticorpo secundário IgM anti-humano conjugado com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich®, cod. A0420, MO-EUA) (diluído 1:10 000 em SL) incubando-se por 1 hora e 30 min a TA. Depois desse período, a placa foi lavada 3 vezes com 200 µL/poço de SL incubando-se por 10 min a TA, repetindo essa etapa mais uma vez. Em seguida, 100 µL/poço do substrato *o-phenylenediamine dihydrochloride substrate* (OPD) (SIGMAFAST™ OPD *tablet*, cod. P9187, MO-EUA) foram adicionados e após 15 min foi utilizada a solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N para encerrar a reação com o OPD. Posteriormente, a absorbância das amostras foi mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 490 nm por leitor de ELISA (Dinex MRX Revelation, VA-EUA).

Foram consideradas positivas as amostras que obtiverem valor de densidade óptica (DO) final acima de 0,295, *cut-off* estabelecido a partir da mediana mais 3 vezes o desvio padrão da DO de indivíduos sem sinais ou sintomas clínicos para hanseníase ou tuberculose.

A DO final foi obtida a partir da subtração do branco pela média da duplicada de cada paciente:  $[(\text{DO poço I} + \text{DO poço II}) / 2] - \text{DO branco}$ . Como controle positivo foi utilizado plasma de paciente multibacilar VV caracterizado pela alta produção de anticorpos frente ao bacilo, e para o controle negativo plasma de indivíduo residente em área não endêmica para hanseníase.

#### 4.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa Graphpad Prism 6.0<sup>®</sup> (GraphPad *Software*, CA-EUA). O teste empregado foi o Mann-Whitney para averiguar diferenças estatísticas entre os grupos analisados, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CASOS NOVOS DIAGNOSTICADOS

No presente estudo, entre os 124 casos diagnosticados clinicamente com hanseníase, os 41 casos selecionados a partir SINAN-SVS/MS manifestam as formas clínicas I (7 pacientes), TT (6), DT (11), DD (6), DV (6) e VV (5) e os 83 casos novos foram diagnosticados nas formas I (7), TT (5), DT (48), DD (15), DV (3), VV (1) e NP (4) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação dos pacientes avaliados pela equipe multidisciplinar.

Grupo (n)	Classificação	
	Operacional <sup>1</sup> n	Clínica <sup>2</sup> n
Casos* (41)	PB 13 e MB 28	I 7, TT 6, DT 11, DD 6, DV 6 e VV 5
Casos novos (83)	16 PB e MB 67	I 7, TT 5, DT 48, DD 15, DV 3, VV 1 e NP 4

<sup>1</sup>De acordo com a Organização Mundial da Saúde (1982). <sup>2</sup>De acordo com Madri (1953) ou Ridley & Jopling (1966). Caso\*: pacientes que já estavam notificados no SINAN-SVS/MS; Caso novo: pacientes diagnosticados clinicamente pela equipe; n: número de indivíduos; PB: paucibacilar; MB: multibacilar; I: indeterminada; TT: tuberculóide; DT: dimorfo-tuberculóide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-virchowiano; VV: virchowiano; NP: primariamente neural.

A avaliação de contatos consiste em uma estratégia importante na identificação de casos novos (SALGADO et al., 2012; WHO, 2009), pois a proximidade com pacientes é um fator determinante na transmissão da doença (FINE et al., 1997; NOORDEEN, 1995). Assim, sabe-se que o risco de desenvolver hanseníase é maior entre contatos próximos de pacientes, como contatos domiciliares, mas também é significativo nos vizinhos e nos contatos sociais e, em particular, entre os contatos de pacientes MB (DOUGLAS et al., 2004). Nos casos novos diagnosticados pela equipe 19% (16/83) foram classificados em PB e 81% (67/82) como MB.

No país, a Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose de 2016 da Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, ressalta a importância da busca ativa de casos novos em menores de 15 anos (BRASIL, 2016c), pois a identificação de casos novos com hanseníase nessa faixa etária poder sinalizar focos de

transmissão ativos e infecção recente (MEIMA et al., 2004). Nesse sentido, destacamos o diagnóstico de 43% (36/83) dos indivíduos com menos de 15 anos, evidenciando possíveis focos ativos de transmissão e infecção nas áreas analisadas no trabalho. Entre os novos pacientes 34 são indivíduos do sexo masculino e 49 do sexo feminino (Tabela 3).

Quanto ao grau de incapacidade, 11 pacientes apresentaram algum grau de incapacidade (GI), 10 GI 1 e 1 GI 2 (Tabela 3). Embora a maioria dos casos novos não possua incapacidades (GI 0), aqueles com GI 1 ou 2 correspondem a 13,2% (11/83) da população desse grupo e a 2,8% (11/385) do total de indivíduos avaliados ao longo do trabalho. A faixa etária dos pacientes com GI 1 ou 2 (média: 41 anos) varia de indivíduos mais jovens com 9 anos a mais velhos com 81 anos.

Sendo a detecção precoce da doença um passo essencial na prevenção de danos patológicos, na interrupção da transmissão do bacilo e da taxa de detecção de casos novos de hanseníase (GELUK, 2013), o diagnóstico desses 11 casos pode ter sido tardio, visto que a maioria dos pacientes não apresentam incapacidades no início da doença e em virtude do longo período de incubação da bactéria, o qual varia de 2-12 anos (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Tabela 4. Características dos casos novos diagnosticados pela equipe multidisciplinar.

Município (n)	Sexo n (M/F)	Média das Idades n (Variação)	Grau de incapacidade		
			0	1	2
Acará (8)	6/2	24 (7-67)	8	-	-
Breves (5)	2/3	11 (10-14)	5	-	-
Castanhal (0)	-	-	-	-	-
Redenção (4)	3/1	27 (6-53)	3	-	1
Santarém (21)	6/15	36 (8-81)	17	4	-
Senador José Porfírio (4)	2/2	41 (15-63)	3	1	-
Mosqueiro <sup>1</sup> (41)	15/26	19 (6-56)	36	5	-
Total (83)	34/49	25 (6-81)	72	10	1

<sup>1</sup>Distrito administrativo de Belém-PA. n: números de indivíduos; M: masculino; F: feminino.

Nesse sentido, destaca-se que o diagnóstico de 81% (67/82) dos pacientes nas formas MB e de 13,2% (11/83) dos casos novos apresentando algum grau de incapacidade física, sugere que esses indivíduos possivelmente não foram diagnosticados nas unidades básicas de saúde, a tempo de prevenir a evolução da doença e o desenvolvimento de incapacidades. As principais razões para a demora no diagnóstico de pacientes com hanseníase são: a distância entre a moradia e a unidade de saúde, a baixa cobertura dos serviços de saúde, a falta de ferramentas para o diagnóstico laboratorial e a falta de expertise entre os profissionais (SINGH et al., 2016).

## 5.2. QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-PGL-I

Ao realizar a quantificação de anticorpos IgM anti-PGL-I não foi observada diferença estatística entre os grupos casos e contatos, assim como também não houve diferença quando os contatos foram comparados com casos que já estavam registrados no sistema de notificação, ou seja casos já tratados ou em tratamento, e os casos diagnosticados pela equipe (Figura 7).

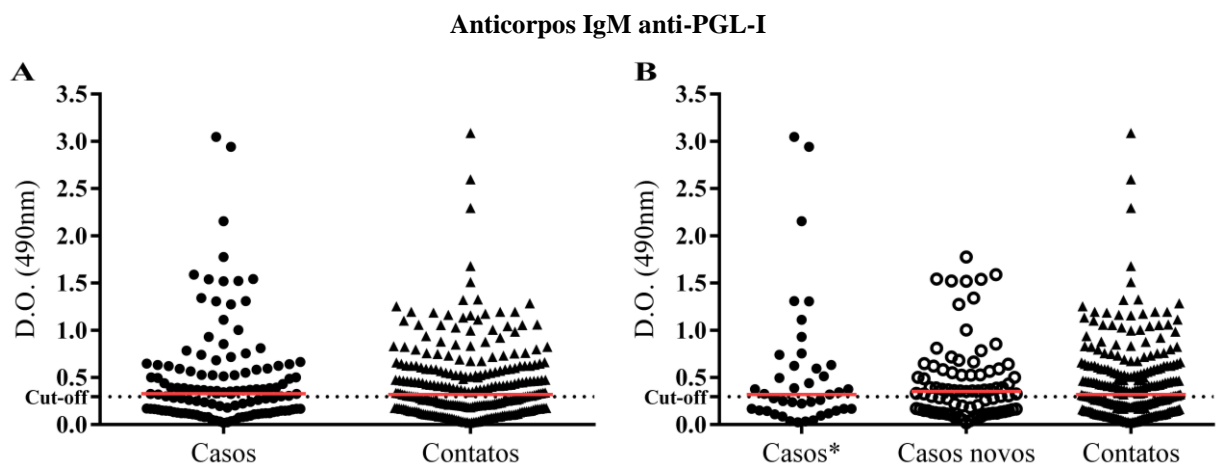


Figura 7. Comparação da secreção de anticorpos anti-PG-I. Em A, comparação entre os grupos caso e contato. Em B, comparação entre os grupos caso\* (pacientes que já estavam notificados no SINAN-SVS/MS), caso novo (pacientes diagnosticados clinicamente pela equipe) e contato. *Cut-off* para positividade de 0,295 de densidade óptica.

Essa semelhança entre casos e contatos, pode ser devido a exposição dos contatos pelo convívio com os pacientes e pela alta exposição da população paraense ao *M. leprae* nas áreas analisadas, onde os indivíduos são rotineiramente expostos ao bacilo, mesmo eles não

convivendo com um paciente diagnosticado clinicamente (FABRI et al., 2015). Além disso, a similaridade dos contatos com os casos que já estavam registrados no sistema de notificação e os casos novos evidencia focos ativos de infecção e a circulação do patógeno (BARRETO et al., 2011). No entanto, apesar da semelhança, contatos com elevada positividade devem ser monitorados, pois a positividade está associada a um risco de adoecer de 8,6 vezes maior em contatos (BRASIL et al., 2003).

Os contatos devem ser examinados, não apenas no momento do diagnóstico de um caso novo, mas também periodicamente, devido ao período de incubação do *M. leprae* ser longo (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). Nesse âmbito, além do monitoramento clínico, o acompanhamento dos níveis plasmáticos de anticorpos anti-PGL-I desses indivíduos pode representar uma estratégia auxiliar para o diagnóstico precoce em contatos intradomiciliares.

Para a hanseníase ser eliminada como problema de saúde pública é necessário uma prevalência de  $<1/10.000$  habitantes. Nesse âmbito, predições matemáticas recentes indicaram em média 44-45 anos para a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte, em consequência principalmente do atraso na realização do diagnóstico e de diferenças regionais e sub-regionais observadas na taxa de transmissão da doença (SMITH, 2016), as quais podem estar relacionadas a fatores socioeconômicos, ambientais e comportamentais (HOUWELING et al., 2016; KERR-PONTES et al., 2006).

De acordo com o Atlas Brasil 2013 do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (<http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/ranking/>) as áreas analisadas no trabalho ocupam segundo o Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) as seguintes posições no estado do Pará: 1º Mosqueiro (Belém), 4º Santarém, 6º Castanhal, 9º Redenção, 127º Senador José Porfírio, 130º Acará e 132º Breves. Ao comparar os níveis de IgM anti-PGL-I entre os municípios com os menores ( $< 100^{\circ}$ ) e os maiores ( $> 100^{\circ}$ ) IDHM, não foi observado correlação da produção de anticorpos com esse índice, ao menos não pela forma de avaliação atual (Figura 8).

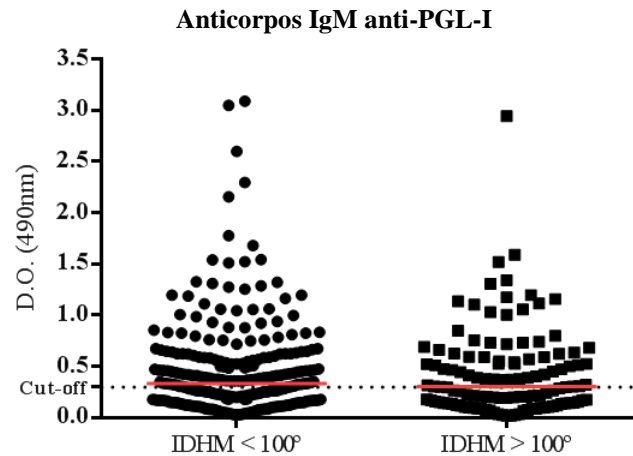


Figura 8. Comparação da secreção de anticorpos anti-PGL-I de acordo com Índice de Desenvolvimento Humano Municipal das 7 áreas analisadas. *Cut-off* para positividade de 0,295 de densidade óptica. IDHM: Índice de Desenvolvimento Humano Municipal.

Contudo, destaca-se que essa semelhança pode ser explicada pela elevada circulação do bacilo na região paraense e pelo estado possuir o 24º IDHM do país (24º/27º) que aliado a uma baixa cobertura do programa saúde da família (54,6%) ([http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape\\_esf.php](http://dab.saude.gov.br/portaldab/ape_esf.php)), que excluí a metade da população dos serviços do programa, dificulta a obtenção de valores mais representativos quanto ao real número de casos no estado. O que ressalta a importância de compreender que a ausência de diagnóstico/ notificação de hanseníase não significa ausência de casos com hanseníase (SALGADO et al., 2016).

## 6. CONCLUSÕES

Além do acompanhamento clínico sugere-se o acompanhamento dos níveis de anticorpos IgM anti-PGL-I em contatos intradomiciliares.

A análise do número de casos novos com algum grau de incapacidade física e das titulações de IgM anti-PGL-I, demonstram que a redução da taxa de detecção no estado do Pará pode ser devido a uma possível falta de diagnóstico, em consequência do negligenciamento em diferentes graus de responsabilidade.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKKER, M. I. et al. Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 1329–1336, 2004.
- BARRETO, J. G. et al. Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 358–70, 2011.
- BARRETO, J. G. et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 527, 2015.
- BODDINGIUS, J. The occurrence of *Mycobacterium leprae* within axons of peripheral nerves . **Acta Neuropathol.(Berl)** , v. 27 , n. 0001-6322, p. 257–270, 1974.
- BRASIL. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública : manual técnico-operacional**. [s.l.: s.n.].
- BRASIL, M. D. S. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. **Boletim Epidemiológico**, v. 44, n. 11, p. 1–12, 2013.
- BRASIL, M. DA S. Registro ativo: número e percentual, Casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2015. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, 2016b.
- BRASIL, M. DA S. Boletim epidemiológico - Hanseníase, verminoses e tracoma têm cura - a experiência de uma campanha integrada. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, v. 47, 2016c.
- BRASIL, M. T. L. R. F. et al. Sorologia Anti PGL-1 e risco de ocorrência de hanseníase em área de alta endemicidade do Estado de São Paulo: quatro anos de seguimento. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 3, p. 262–271, 2003.
- CARUSO, A M. et al. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 9, p. 5407–5416, 1999.
- CARVALHO, A P. et al. Factors associated with anti-phenolic glycolipid-I seropositivity among the household contacts of leprosy cases. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 219, 2015.
- DA SILVA ROCHA, A. et al. Drug and multidrug resistance among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1912–1917, 2012.
- DOCKRELL, H. M. et al. A postgenomic approach to identification of *Mycobacterium leprae*-specific peptides as T-cell reagents. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 5846–5855, 2000.

DOUGLAS, J. T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 5, p. 897–900, 2004.

DUTHIE, M. S. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1400–1408, 2007.

DUTHIE, M. S. et al. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 10, p. 1257–1265, 2011.

ESQUENAZI, D. et al. Correlation between Central Memory T Cell Expression and Proinflammatory Cytokine Production with Clinical Presentation of Multibacillary Leprosy Relapse. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e0127416, 2015.

FABRI, A. D. C. O. C. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.

FABRI, A. D. C. O. C. et al. Integrative literature review of the reported uses of serological tests in leprosy management. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 158–164, 2016.

FINE, P. E. et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **American journal of epidemiology**, v. 146, n. 1, p. 91–102, 1997.

FITNESS, J.; TOSH, K.; HILL, A V. S. Genetics of susceptibility to leprosy. **Genes and immunity**, v. 3, n. 8, p. 441–453, 2002.

FONSECA, A. B. D. L. et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 5, 2017.

FORTUNE, S. M. et al. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10676–10681, 2005.

GELUK, A. et al. Rational combination of peptides derived from different Mycobacterium leprae proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of M. leprae infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 522–533, 2008.

GELUK, A. et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 10, p. 4782–91, 2012.

GELUK, A. Biomarkers for leprosy: would you prefer T (cells)? **Leprosy review**, v. 84, n. 1, p. 3–12, 2013.

GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; SPENCER, J. S. Postgenomic Mycobacterium leprae antigens for cellular and serological diagnosis of M. leprae exposure, infection and leprosy disease. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 402–21, 2011.

HAN, X. Y. et al. A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–864, 2008.

- HAN, X. Y. et al. The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 8, p. 952–959, 2012.
- HOUWELING, T. A J. et al. Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–28, 2016.
- HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v. 147, n. 3, p. 728–735, 1981.
- KERR-PONTES, L. R. S. et al. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: Results of a case-control study. **International Journal of Epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 994–1000, 2006.
- LOCKWOOD, D. N. J.; SUNEETHA, S. Leprosy: Too complex a disease for a simple elimination paradigm. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 3, p. 230–235, 2005.
- LUCKHEERAM, R. V. et al. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- MARTINS, M. V. S. B. et al. Pathogen-specific epitopes as epidemiological tools for defining the magnitude of *Mycobacterium leprae* transmission in areas endemic for leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.
- MATSUOKA, M. Drug resistance in leprosy. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, n. 1, p. 1–7, 2010.
- MEDEIROS, R. C. A. et al. Subversion of schwann cell glucose metabolism by *Mycobacterium leprae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 41, p. 21375–21387, 2016.
- MEIMA, A. et al. The future incidence of leprosy: A scenario analysis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 5, p. 373–380, 2004.
- MISCH, E. A et al. Leprosy and the human genome. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 74, n. 4, p. 589–620, 2010.
- MOET, F. J. et al. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Leprosy review**, v. 75, n. 4, p. 310–326, 2004.
- NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 90–98, 2015.
- NEAL, J. W.; GASQUE, P. The role of primary infection of Schwann cells in the aetiology of infective inflammatory neuropathies. **Journal of Infection**, v. 73, n. 5, p. 402–418, 2016.
- NOORDEEN, S. K. Elimination of leprosy as a public health problem: Progress and prospects. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 73, n. 1, p. 1–6, 1995.
- PENNA, M. L. F.; PENNA, G. O. Leprosy frequency in the world, 1999-2010. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 3–12, 2012.
- PINHEIRO, R. et al. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genet. **Future Microbiol**, v. 6, n. 2, p. 217–230, 2011.

- RAMBUKKANA, A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of mycobacterium leprae. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 21–27, 2001.
- REA, T. H.; JERSKEY, R. Clinical and histologic variations among thirty patients with Lucio's phenomenon and pure and primitive diffuse lepromatosis (Latapi's lepromatosis). **International Journal Of Leprosy**, v. 73, n. 3, p. 169–188, 2005.
- REECE, S. T. et al. ML0405 and ML2331 are antigens of Mycobacterium leprae with potential for diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 3, p. 333–340, 2006.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. . H. Classification of Leprosy According to Immunity. **International Journal of Leprosy**, 1966.
- RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: Epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 464–470, 2011.
- SADHU, S. et al. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.
- SAINI, C. et al. T helper cells in leprosy: An update. **Immunology Letters**, v. 184, p. 61–66, 2017.
- SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, 2013.
- SALGADO, C. G. et al. High Anti – Phenolic Glycolipid-I IgM Titers and Hidden Leprosy Cases , Amazon Region Novel Prion Protein in BSE-affected Cattle , Switzerland. v. 18, n. 5, p. 4–5, 2012.
- SALGADO, C. G. et al. What do we actually know about leprosy worldwide? **Www.TheLancet.Com/Infection**, v. 16, n. 7, p. 778, 2016.
- SAMPAIO, L. H. et al. Immunologically reactive M. leprae antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 26, 2011.
- SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006.
- SINGH, I. et al. Symposium on emerging needs in leprosy research in the post elimination era : The Leprosy Mission Trust India. p. 132–143, 2016.
- SINSIMER, D. et al. Mycobacterium leprae actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 1, p. 293–300, 2010.
- SMITH, R. L. Proposing a Compartmental Model for Leprosy and Parameterizing Using Regional Incidence in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004925, 2016.
- SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 344–57, dez. 2011.

SPIERINGS, E. et al. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: The role of schwann cells, T cells and Mycobacterium leprae. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, n. 4, p. 349–355, 2000.

VARGAS-OCAMPO, F. Diffuse leprosy of Lucio and Latapí: A Histologic study. **Leprosy Review**, v. 78, n. 3, p. 248–260, 2007.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of Mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biology**, v. 2, n. 8, p. reviews1023.1–reviews1023.8, 2001.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, v. 77-78, n. 1, p. 103–121, 2006.

WHO. **Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes** World Health Organization, 1982. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/38984>>

WHO. Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy: 2011-2015. v. 80, n. 4, p. 353–354, 2009.

WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **Weekly Epidemiological Record**, v. 91, n. 40, p. 405–420, 2016.

## 8. ANEXO

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Universidade Federal do Pará - URE Dr. Marcello Candia.**

A equipe de pesquisadores coordenada pelo Professor Dr. Claudio Guedes Salgado está realizando o estudo “**Marcadores epidemiológicos em Hanseníase**”, do qual gostaríamos que seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade participasse e, para isso, precisamos de sua autorização.

O estudo tem por objetivo identificar características relacionadas às pessoas, aos seus modos de vida, ao meio ambiente e à genética do micróbio que causa hanseníase, para entender melhor sobre a transmissão da doença, melhorando sua prevenção e tratamento. As crianças e os adolescentes que participarem deste estudo serão submetidos à coleta de sangue e de raspado intradérmico, realizada por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificar o *Mycobacterium leprae*. Suas casas serão visitadas, para que seja feito um mapeamento dos casos de hanseníase por bairros e ruas.

A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável. A coleta de sangue e de raspado poderão causar dor e pequena reação no local.

A participação nessa pesquisa é voluntária e seu filho participará apenas se você autorizar. Sempre que desejar, será fornecido esclarecimento sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, o participante poderá recusar-se a continuar o estudo e retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Está garantido o cumprimento do que fora informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identificação dos participantes.

Declaração de pais ou responsáveis

Tendo compreendido perfeitamente tudo o eu me for informado, AUTORIZO QUE MEU FILHO(A) \_\_\_\_\_, PARTICIPE DESTE ESTUDO, SEM QUE ISSO TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão dactiloscópica do(a) pai/ mãe ou responsável legal.

Doc: \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_, Data: \_\_/\_\_/\_\_