



**UFBA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PÉQUISA GONÇALO MONIZ



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA  
HANSENÍASE EM ÁREA HIPERENDÊMICA DO ESTADO DO  
MARANHÃO.**

**GRACIOMAR CONCEIÇÃO COSTA**

**Salvador - Bahia  
2014**



**UFBA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PÉSSQUISA GONÇALO MONIZ



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA  
HANSENÍASE EM ÁREA HIPERENDÊMICA DO ESTADO DO  
MARANHÃO.**

**GRACIOMAR CONCEIÇÃO COSTA**

Orientador: Prof. Dr. Jackson Maurício Lopes Costa  
Co-orientadora: Profa Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do título de Doutor.

**Salvador - Bahia  
2014**

Costa, Graciomar Conceição

Aspectos clínico-epidemiológicos e imunológicos da hanseníase em área hiperendêmica do estado do Maranhão / Graciomar Conceição Costa. – Salvador, 2014.

111f.

Impresso por computador (Fotocópia)

Orientador: Jackson Maurício Lopes Costa.

Co-orientadora: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-graduação em Patologia, 2014.

1. Hanseníase – Epidemiologia – Maranhão 2. Hanseníase – Imunologia 3. Citocinas 4. Quimiocinas I. Título.

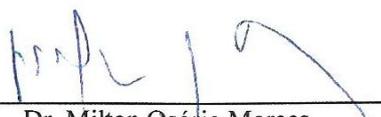
CDU 616-002.73

“ASPECTOS CLINICO-EPIDEMIOLÓGICOS DA HANSENÍASE EM ÁREA HIPERENDÊMICA DO ESTADO DO MARANHÃO”.

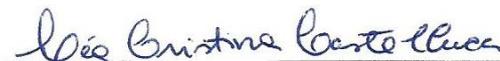
GRACIOMAR CONCEIÇÃO COSTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Milton Osório Moraes  
Coordenador geral adjunto de programas de pós  
graduação da FIOCRUZ



Dra. Lea Cristina de Carvalho Castellucci  
Pesquisadora Associada  
UFBA



Dr. George Mariane Soares Santana  
Professor adjunto  
UFRB



Dr. Sergio Marcos Arruda  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ



Dr. Jackson Mauricio Lopes Costa  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

A todos os que contribuíram de alguma forma na construção deste trabalho quero agradecer e deixar o melhor do meu reconhecimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jackson Costa, pela orientação, oportunidade e paciência.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Nascimento, por ter aberto o espaço do Laboratório de Imunofisiologia - LIF/UFMA para execução integral deste trabalho no Maranhão. E ainda, pelos ensinamentos e fundamental contribuição em minha carreira acadêmica, desde a graduação.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia por proporcionar minha formação acadêmica.

Ao Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase - CREDESH/UFU, na pessoa da Dra. Isabela Goulart, pela oportunidade de participar de sua equipe de trabalho em projeto realizado no Maranhão, à qual esta Tese esteve vinculada.

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFMA, na pessoa da Dra. Silma Pereira, por toda dedicação e gerenciamento do grande projeto.

Aos profissionais médicos, enfermeiros, farmacêuticos, biólogos, técnicos de enfermagem e acadêmicos que contribuíram com o projeto.

As prefeituras de Açailândia, Imperatriz e São Luís, por partilhar dos ideais da pesquisa.

A todos os pacientes que prontamente participaram do estudo e gentilmente doaram amostras biológicas para realização deste trabalho.

Aos pesquisadores do LIF, os quais me acompanharam em cada etapa da realização deste trabalho: graduandos Elza Moraes e Arlyson Igor Balata, Msc. Thiare Fortes, Msc. Mayara Cristina e Dra. Ana Paula Azevedo.

Aos amigos, de perto e de longe, pelos indelévels momentos e apoios inestimáveis.

A minha família, sempre presente e vivaz no cumprimento de mais uma etapa de minha vida.

E a Deus, sem O qual eu nada sou.

## RESUMO

A hanseníase ou mal de Hansen (MH), causada pelo patógeno *Mycobacterium leprae*, ainda constitui um problema de saúde pública no Brasil, e em especial no Maranhão. A doença é hiperendêmica em 77 municípios do Estado. A resposta imune ao patógeno de indivíduos dessas regiões permanece obscuro podendo contribuir na manutenção da hiperendemia. Por isso, este estudo teve por objetivo caracterizar o perfil clínico-epidemiológico e imunológico de pacientes infectados por *M. leprae*, e de seus contatos, procedentes de área hiperendêmica. Para o desenvolvimento deste trabalho foi realizado um estudo transversal em três municípios de Açaílândia, Imperatriz e São Luís, no período 2009 a 2012. Pacientes e contatos foram clinicamente avaliados e tiveram os dados epidemiológicos coletados. Uma amostra de sangue foi obtida para realização das sorologias para detecção de anticorpos IgM anti-PGL1 pelos testes de ELISA e ML-Flow, e dosagem de citocinas e quimiocinas. A análise descritiva demonstrou que a maioria dos pacientes eram adultos, do gênero masculino, diagnosticados principalmente com as formas intermediárias da doença (60%). Incapacidades físicas foram detectadas em 35% dos casos, a maioria da forma multibacilar (MB). Os contatos de pacientes MB, em idade adulta, do sexo feminino, de convívio intradomiciliar e com parentesco de primeiro grau com os pacientes foram maioria. Anticorpos anti-PGL1 foram encontrados em 42,6% dos casos e 12% dos contatos pelo ML-Flow. E ainda em 36,8% dos casos e 12,5 % dos contatos pela técnica do ELISA. A concordância dos testes foi moderada, porém significativa ( $K=0,423$ ). A soropositividade ao PGL1 está associada às variáveis epidemiológicas de casos, principalmente. Observou-se que casos e contatos apresentam alta produção de IL-17A. Pacientes MB e contatos possuem altas concentrações séricas de IL-6. Os da forma virchowiana tem reduzida produção de TGF- $\beta$ 1. CXCL9 e CXCL10 foram evidentes nos MB, enquanto CXCL8 estava presente em contatos. Os aspectos avaliados confirmam o caráter hiperendêmico e a manutenção de fatores de riscos para o adoecimento de contatos. O perfil imunológico observado abre perspectivas para o conhecimento e elucidação da patogenia em regiões de grande circulação do *M. leprae*.

Palavras chave: Hanseníase, hiperendemia, epidemiologia, sorologia, citocinas, quimiocinas

## ABSTRACT

Leprosy, caused by the pathogen *Mycobacterium leprae*, it is a public health problem in Brazil yet, especially in Maranhão. The disease is hyperendemic in 77 counties of the State. Immune response to the pathogen of individuals in these regions remains unclear and may be contributing to maintenance of high endemicity. Therefore, this study aimed to characterize epidemiological and immunological profile of patients infected with *M. leprae*, and their contacts, from hyperendemic regions. Cross-sectional study was accomplished in Açailândia, Imperatriz and São Luís counties, 2009-2012. Patients and contacts were clinically evaluated and had their epidemiological data collected. A blood sample was obtained for performing serological tests IgM anti-PGL1 detection by ELISA and ML-Flow and measurement of cytokines and chemokines. Descriptive analysis showed that most patients were adults, male, diagnosed with intermediate forms mainly (60%). Physical disabilities were detected in 35% of cases, most of multibacillary form (MB). The contacts were MB patients in adult age, female, household and first-degree kinship. PGL1 antibodies were found in 42.6% of cases and 12% of contacts by ML-Flow, 36.8% of cases and 12.5% of contacts by the ELISA procedure. Concordance tests was moderate but significant ( $K = 0.423$ ). PGL1 seropositivity is associated with epidemiologic features of cases, mostly. It was observed that patients and contacts present high IL-17A production. MB patients and contacts have high IL-6 serum concentration. Patients with lepromatous form had reduced TGF- $\beta$ 1 production. CXCL9 and CXCL10 were apparent in MB, while CXCL8 was present in contacts. The evaluated aspects confirm high endemicity and maintenance of risk factors for contact illness. Immune profile observed opens perspectives to understanding and elucidation of pathogenesis in regions where *M. leprae* has large circulation.

Keywords: Leprosy, hyperendemic, epidemiology, serology, cytokine, chemokine

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Taxa global de prevalência da hanseníase em 2012 .....	16
<b>Figura 2</b> - Municípios prioritários para vigilância da hanseníase em 2010.....	18
<b>Figura 3</b> - Esquema representativo dos componentes básicos da parede celular do <i>M. leprae</i> . .....	22
<b>Figura 4</b> - Mapa do estado do Maranhão .....	34
<b>Figura 5</b> - Distribuição da concentração de citocinas (pg/mL), segundo a classificação operacional.....	56
<b>Figura 6</b> - Distribuição da concentração de citocinas (pg/mL) segundo a forma clínica .....	57
<b>Figura 7</b> - Distribuição da concentração de citocinas (pg/mL), segundo o número de cicatriz vacinal nos casos e contatos .....	58
<b>Figura 8</b> - Distribuição da concentração de quimiocinas (pg/mL), segundo a classificação operacional.....	60
<b>Figura 9</b> - Distribuição da concentração de quimiocinas (pg/mL) segundo a forma clínica...	61
<b>Figura 10</b> - Distribuição da concentração de quimiocinas (pg/mL), segundo o número de cicatriz vacinal dos casos e contatos.....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características das formas clínicas da escala de Ridley & Jopling.....	20
<b>Tabela 2</b> - Municípios do Maranhão com os maiores números de casos novos de hanseníase detectados nos anos de 2009 a 2013.....	31
<b>Tabela 3</b> - Características sociodemográficas dos casos e contatos de pacientes com hanseníase .....	42
<b>Tabela 4</b> - Características clínicas dos casos de hanseníase .....	43
<b>Tabela 5</b> - Caracterização clínica dos contatos de pacientes com hanseníase .....	44
<b>Tabela 6</b> - Características sociodemográficas de casos e contatos segundo a classificação operacional dos casos de hanseníase .....	45
<b>Tabela 7</b> - Caracterização clínica dos casos de hanseníase segundo a classificação operacional.....	46
<b>Tabela 8</b> - Caracterização clínica dos contatos segundo a classificação operacional dos casos de hanseníase.....	47
<b>Tabela 9</b> - Resultado geral dos testes imunológicos para a confirmação do diagnóstico em casos e contatos.....	48
<b>Tabela 10</b> - Associação do ELISA antiPGL-1 às características sociodemográficas de casos e contatos de hanseníase .....	49
<b>Tabela 11</b> - Associação do ELISA antiPGL-1 às características clínicas dos casos .....	50
<b>Tabela 12</b> - Associação do ELISA antiPGL-1 às características clínico-epidemiológicas dos contatos .....	51
<b>Tabela 13</b> - Associação do ML-Flow antiPGL-1 às características sociodemográficas de casos e contatos de hanseníase .....	52
<b>Tabela 14</b> - Associação do ML-Flow antiPGL-1 às características clínicas dos casos .....	53
<b>Tabela 15</b> - Associação do ML-Flow antiPGL-1 às características clínico-epidemiológicas dos contatos .....	54
<b>Tabela 16</b> - Concordância entre os resultados dos testes ELISA e ML-Flow para detecção de IgM antiPGL-1 .....	55
<b>Tabela 17</b> - Coeficiente de correlação de Spearman (r) para a concentrações de citocinas entre os pacientes paucibacilar, multibacilar e contatos.....	59
<b>Tabela 18</b> - Coeficiente de correlação de Spearman (r) da concentração de quimiocinas em pacientes paucibacilar e multibacilar.....	64
<b>Tabela 19</b> - Coeficiente de correlação de Spearman (r) da concentração de citocinas e quimiocinas em pacientes paucibacilar, multibacilar e contatos .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> / Análise de variância
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> / Albumina de Soro Bovino
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i> / Ensaio Citométrico de Esferas Ordenadas
CCL2	Quimiocina padrão CC ligante 2
CCL20	Quimiocina padrão CC ligante 20
CCL5	Quimiocina padrão CC ligante 5
CD	Coefficiente de detecção
CD	Cotovelo direito
CD4 <sup>+</sup>	<i>Cluster of differentiation 4</i> / Grupamento de diferenciação 4
CD8 <sup>+</sup>	<i>Cluster of differentiation 8</i> / Grupamento de diferenciação 8
CE	Cotovelo esquerdo
cMB	Contato de multibacilar
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)
cPB	Contato de paucibacilar
CR	<i>Complement receptor</i> / Receptor do sistema complemento
CR3	<i>Complement receptor 3</i> / Receptor do tipo 3 do sistema complemento
CREDESH	Centro de Referência Nacional em Dermatologia e Hanseníase
CXCL10	Quimiocina padrão CXC ligante 10
CXCL16	Quimiocina padrão CXC ligante 16
CXCL8	Quimiocina padrão CXC ligante 8
CXCL9	Quimiocina padrão CXC ligante 9
DD	Dimorfo-dimorfo
DO	Densidade Óptica
DT	Dimorfo-tuberculóide
DV	Dimorfo-virchowiano
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> / Ensaio imunoenzimático
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCAP	<i>Flow Cytometric analysis programs</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> / Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> / Fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
Hab	Habitante
I	Indeterminada
IB	Índice baciloscópio

IDH	Índices de desenvolvimento humano
IE	Índice ELISA
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17A	Interleucina 17A
IL-17F	Interleucina 17F
IL-2	Interleucina 2
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> / Óxido nítrico sintetase induzível
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i> / Proteína 10 induzida por interferon-gama
JD	Joelho direito
JE	Joelho esquerdo
Km	Quilômetro
L	Lesão
LBP21	<i>Laminin-binding protein 21kDa</i> / Proteína de ligação a laminina de 21kDa
LD	Lóbulo direito
LE	Lóbulo esquerdo
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	Multibacilar
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i> / Proteína quimiotática de monócito 1
MH	Mal de Hansen
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> / Complexo Principal de histocompatibilidade
MIG	<i>Monokine induced by interferon-gamma</i> / Monocina induzida por interferon-gama
mL	Mililitro
ML-Flow	<i>M. leprae lateral flow test</i> / Teste de fluxo lateral para <i>M. leprae</i>
mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
N	Normal
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i> / Fosfato dinucleotídico de nicotinamida e adenina
ng	Nanograma

NK	Natural killer
nM	Nanômetro
NO	<i>Nitric oxide</i> / Óxido nítrico
NOS2	Nitric oxide synthase II / Óxido nítrico sintase II
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	<i>O-phenylenediamine dihydrochloride</i> / Dihidrocloridrato de o-fenilenediamina
PB	Paucibacilar
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> / Solução Salina Tamponada em Fosfato
PDIM	<i>Phthiocerol Dimycocerosate</i> / Ftiocerol dimicocerosato
PE	<i>Phycoerythrin</i> / Ficoeritrina
pg	Picograma
PGL-1	<i>Phenolic glycolipid 1</i> / Glicolipídio fenólico 1
pH	Potencial hidrogeniônico
PIM	<i>Phosphatidylinositol mannoside</i> / fosfatidil inositol manosídeo
PQT	Poliquimioterapia
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i> / Quimiocina expressa e secretada por células T normais e regulada após ativação
RR	Reação reversa
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
STAT-3	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> / Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição 3
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming growth factor beta</i> / Fator beta de transformação e crescimento 1
Th1	<i>T helper 1</i> / T auxiliar 1
Th17	<i>T helper 17</i> / T auxiliar 17
Th2	<i>T helper 2</i> / T auxiliar 2
Th3	<i>T helper 3</i> / T auxiliar 3
TLR	<i>Toll-like receptors</i> / Receptores tipo <i>Toll</i>
TMM	<i>Trehalose monomycolate</i> / Monomicolato de trealosa
TNF	<i>Tumor necrosis factors</i> / Fator de necrose tumoral
Tr1	Célula T regulatória do tipo 1
Treg	Célula T regulatória
TT	Tuberculóide-tuberculóide
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VV	Virchowiano-virchowiano
$\chi^2$	Qui-quadrado
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	4
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	6
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	7
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	8
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
2.1 Histórico da hanseníase .....	14
2.2 Epidemiologia.....	16
2.3 Aspectos clínicos .....	18
2.4 Interação parasito-hospedeiro.....	21
2.5 Imunopatologia.....	23
2.6 Diagnóstico clínico e laboratorial.....	27
2.7 Profilaxia e controle.....	28
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	32
4.1 Geral .....	32
4.2 Objetivos Específicos .....	32
<b>5 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	33
5.1 Tipo de estudo .....	33
5.2 Área de estudo .....	33
5.3 Critérios de inclusão e exclusão da amostra.....	34
5.4 Coleta de dados.....	35
5.5 Coleta de amostras biológicas .....	36
5.5.1 Raspado dérmico .....	36
5.5.2 Biópsia de pele .....	36
5.5.3 Sangue periférico.....	36
5.6 Teste de Mitsuda.....	37
5.7 Testes sorológicos .....	37
5.7.1 Determinação de IgM antiPGL-1 pelo ML-Flow.....	37
5.7.2 Determinação de IgM antiPGL-1 por ELISA .....	38
5.7.3 Quantificação de citocinas e quimiocinas .....	38
5.8 Análise dos dados e tratamento estatístico .....	40

<b>6 RESULTADOS</b> .....	41
6.1 Aspectos clinicoepidemiológicos .....	41
6.2 Características clinicoepidemiológicas segundo a classificação operacional .....	44
6.3 Caracterização clinicoimunológica.....	48
6.3.1 Relação do ELISA antiPGL-1 com as variáveis do estudo .....	49
6.3.2 Relação do ML-Flow antiPGL-1 com as variáveis do estudo.....	51
6.3.3 Concordância dos testes diagnósticos.....	54
6.3.4 Relação das citocinas com a classificação clínica .....	55
6.3.5 Relação das quimiocinas com a classificação clínica.....	59
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	65
7.1 Caracterização clinicoepidemiológica .....	65
7.2 Caracterização clinicoimunológica.....	74
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	84
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85
<b>ANEXOS</b> .....	103

## 1 INTRODUÇÃO

A hanseníase ou mal de Hansen (MH), é uma doença infectocontagiosa causada pelo patógeno intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae*. Apesar dos avanços no entendimento da doença, a mesma continua sendo um problema de saúde pública mundial (WHO, 2014). Em 2013, o relatório estatístico da Organização Mundial de Saúde (OMS) reportou 115 países com novos casos de MH, sendo a maioria do Sudeste Asiático, Continente africano e da América Latina (WHO, 2013). Mesmo após inúmeras campanhas de erradicação a nível global, a hanseníase continua longe de ser eliminada, caracterizando-se como doença de populações negligenciadas (RANQUE et al., 2007; LINDOSO e LINDOSO, 2009). Atualmente, doze países, entre eles o Brasil, são responsáveis por 95% da carga mundial de MH em termos de prevalência e casos novos detectados por ano (WHO, 2013).

A doença atinge preferencialmente pele e nervos periféricos, com surgimento de lesões cutâneas e alterações da sensibilidade tátil, térmica e da dor (BRITTON e LOCKWOOD, 2004; EICHELMANN et al., 2013). A transmissão ocorre principalmente pelas vias aéreas superiores, e parece estar intimamente relacionada com o contato direto dos saudáveis com os doentes e com a resposta imunológica individual (GOULART et al., 2008; MODLIN, 2010). Porém, os mecanismos pelos quais os bacilos migram das regiões de exposição para os tecidos ainda não foram totalmente elucidados.

De uma forma geral, os patógenos intracelulares desenvolveram estratégias para modular a resposta imune do hospedeiro de forma a criar um nicho adequado para a sua sobrevivência e perpetuação (ALTER et al., 2011). Após a introdução de *M. leprae* nas células alvo, o organismo do hospedeiro irá reconhecer e desencadear respostas imunológicas específicas, definindo assim o curso da infecção (MENDONÇA et al., 2008).

O amplo espectro de manifestações clínicas observado no MH é resultado dos diferentes tipos de resposta imunológica que o hospedeiro pode desenvolver. Nos pacientes tuberculóides, os linfócitos respondem aos antígenos de *M. leprae*, desencadeando a resposta do tipo Th1, produzindo citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN- $\gamma$ ), cuja resposta exacerbada pode acarretar danos no tecido-alvo, causando lesões na pele e/ou nos nervos (WEERDENBURG et al., 2010). Por outro lado, os linfócitos dos pacientes virchowianos não respondem aos antígenos de *M. leprae*, tendo deficiência na produção de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando a resposta do tipo Th2, produzindo principalmente IL-4, IL-5 e IL-13, que estão envolvidos na resposta imune humoral (LOCKWOOD, 2006).

Baseados nessas observações, Ridley e Jopling (1966) desenvolveram um sistema de classificação mundial para os pacientes de hanseníase, agrupando-os em: virchowiano (VV), dimorfo-virchowiano (DV), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-tuberculóide (DT), tuberculóide (TT) ou indeterminadas (I). Para simplificação do diagnóstico e melhor direcionamento do tratamento poliquimioterápico (PQT), a OMS definiu as formas em Paucibacilar (PB) e Multibacilar (MB) de acordo com o número de lesões cutâneas observadas (WHO, 2000). Os pacientes com até cinco lesões são classificados como PB e os que apresentam mais de cinco lesões como MB (BRASIL, 2002).

A complexidade dos aspectos imunológicos, celulares e genéticos da infecção por *M. leprae* ainda não permitiram a consolidação de uma ferramenta de diagnóstico padrão, a qual seria um marco para erradicação da doença (SCOLLARD et al., 2006). Atualmente o diagnóstico é feito pelo exame clínico dermatoneurológico, utilizado para localização de possíveis lesões ou alterações na sensibilidade ou alargamento de nervos, e alternativamente pela baciloscopia, cuja sensibilidade é baixa (BAPTISTA et al., 2006). Diante deste fato é necessária a utilização de técnicas mais específicas, que possibilitem a realização do diagnóstico nas formas precoces da doença, e para o monitoramento de grupos de risco, como os contatos (GOULART e GOULART, 2008).

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Histórico da hanseníase**

A hanseníase ou mal de Hansen (MH), parece ser uma das doenças mais antigas do mundo que se tem conhecimento. Registros arqueológicos datam a existência da doença no período calcolítico (Idade do Cobre), cerca de 2000 a.C. (ROBBINS et al., 2009). Referências textuais relatam a doença no antigo Egito (HULSE, 1972), na China e na civilização grega, romana e povos celtas (MARIOTTI et al., 2005). Esqueletos com características peculiares, as chamadas *facies leoninas* (erosão da maxila e da espinha nasal) também foram encontrados em escavações no oeste asiático (BLAU e YAGODIN, 2005) e em leprosários da idade média na Dinamarca, Hungria, Itália e República Checa (MANCHESTER, 1984).

Acredita-se que o MH tenha surgido no sudeste do Continente Asiático (região da atual Índia) e que tenha se espalhado para Europa com o retorno das tropas de Alexandre, o Grande, após a conquista da Pérsia. Na Europa, a doença tornou-se um grave problema de saúde pública durante toda a Idade Média (MONOT et al., 2005).

Nesse período, o MH era mutiladora, os pacientes acometidos apresentavam muitas deformidades, sustentando a hipótese de que a forma lepromatosa da doença era predominante. Os pacientes eram forçados à segregação, viviam em aldeias separadas ou em leprosários, pois acreditava-se que a doença era altamente contagiosa (TAYLOR et al., 2000; LIKOVSKY et al., 2006).

O declínio no aparecimento de novos casos da doença na Europa, observado a partir do século XVI, pode ser explicado pela variação na patogenicidade de organismos causadores de doenças infectocontagiosas ou pela alta mortalidade dos indivíduos coinfectados por *M. tuberculosis* e *M. leprae*, o que era bastante comum na época (DONOGHUE et al., 2005). Além disso, a segregação de grande parte dos portadores da doença e sua exclusão do convívio doméstico, assim como a redução da população das cidades e o aumento nos padrões sócioeconômicos também justificam a redução dos índices do MH no continente Europeu, assim como o não reestabelecimento da doença (BROWNE, 1975).

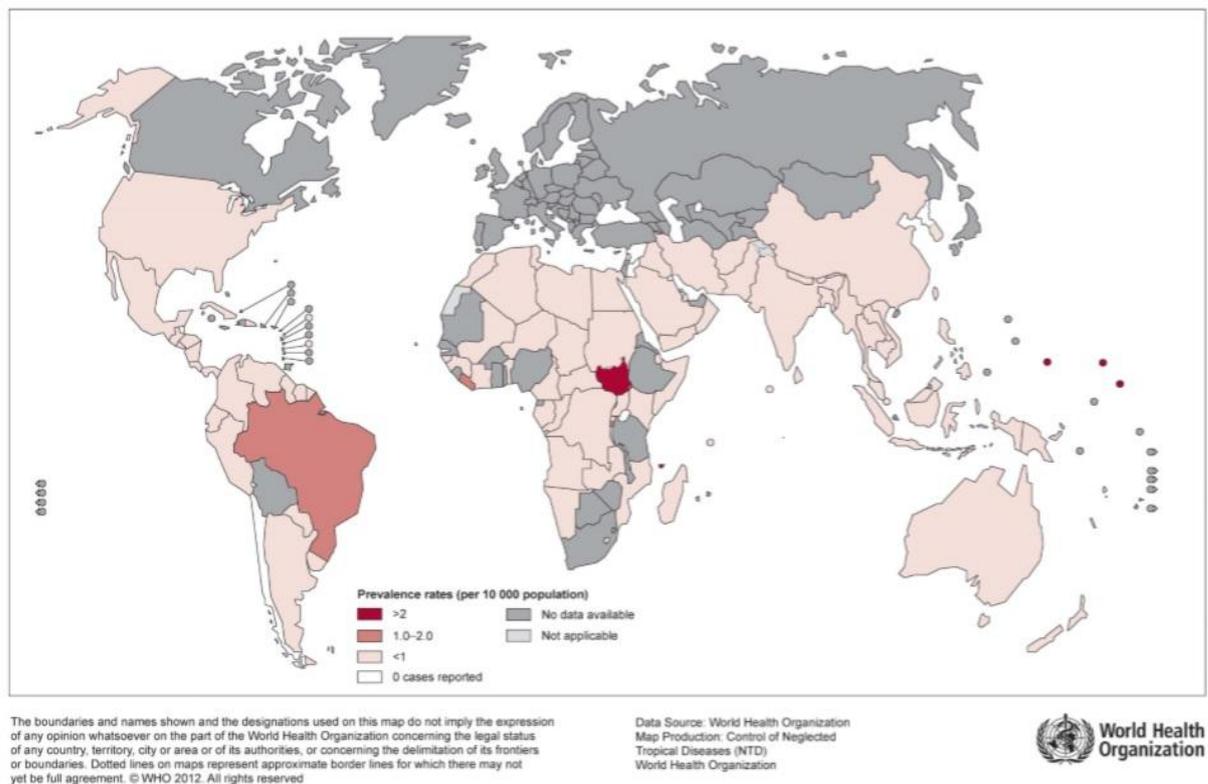
No Continente Americano, a doença foi introduzida pelos colonizadores, pois não há vestígios de MH nos povos indígenas nativos. O tráfico de escravos parece ser outro foco de expansão do MH nas colônias, pois havia focos da endemia hansênica na Ásia e África (EIDT, 2004). Os primeiros casos notificados da doença no Brasil foram em 1600, na então capital da colônia: Rio de Janeiro. A expansão do MH parece ter acompanhado a marcha de colonização, sendo introduzidos focos da doença em todo o país (YAMANOUCHI et al., 1993).

Em 1867, Danielssen e Boeck foram os primeiros pesquisadores a contradizerem os dogmas da doença na época, afirmando que o MH não era transmitido por proximidade com o doente e que tampouco era hereditária (BROWNE, 1975). Anos mais tarde, em 1873, o físico Gerhard Armauer Hansen anunciou resultados de sua investigação, onde atribuía a um micro-organismo em forma de bastão, observado em lesões dos acometidos, a causa da doença (MONOT et al., 2005).

Por muito tempo, o MH permaneceu incurável. Mesmo com o avanço no descobrimento do agente etiológico, somente em 1940 a dapsona e seus derivados foram introduzidos para o tratamento da doença (WHO, 2014). Atualmente, os países do “Novo Mundo” são os mais afetados pela patologia. Mesmo com a intervenção e auxílio da OMS, o MH ainda está longe de ser erradicada em muitos países, indicando que o parasita vai continuar sua coexistência ao lado do hospedeiro.

## 2.2 Epidemiologia

No mundo, o MH é endêmico em Angola, Brasil, China, Etiópia, Índia, Indonésia e em mais dez países. A detecção global de novos casos diminuiu em 23% de 2005 a 2010, desde então, o número de casos novos vem permanecendo estável. Em 2012 foram registrados cerca de 232 mil casos da doença, e até o final do primeiro trimestre de 2013, o registro global já era de aproximadamente 189 mil casos. Embora esses números, detectados anualmente, estejam caindo progressivamente em muitos países, no Brasil, Índia e Indonésia permanecem ainda elevados com caráter de alta endemicidade. Juntos, esses três países representam 85% dos novos casos registrados em 2012 (WHO, 2013; 2014).



**Figura 1** - Taxa global de prevalência da hanseníase em 2012. Fonte: WHO, 2014.

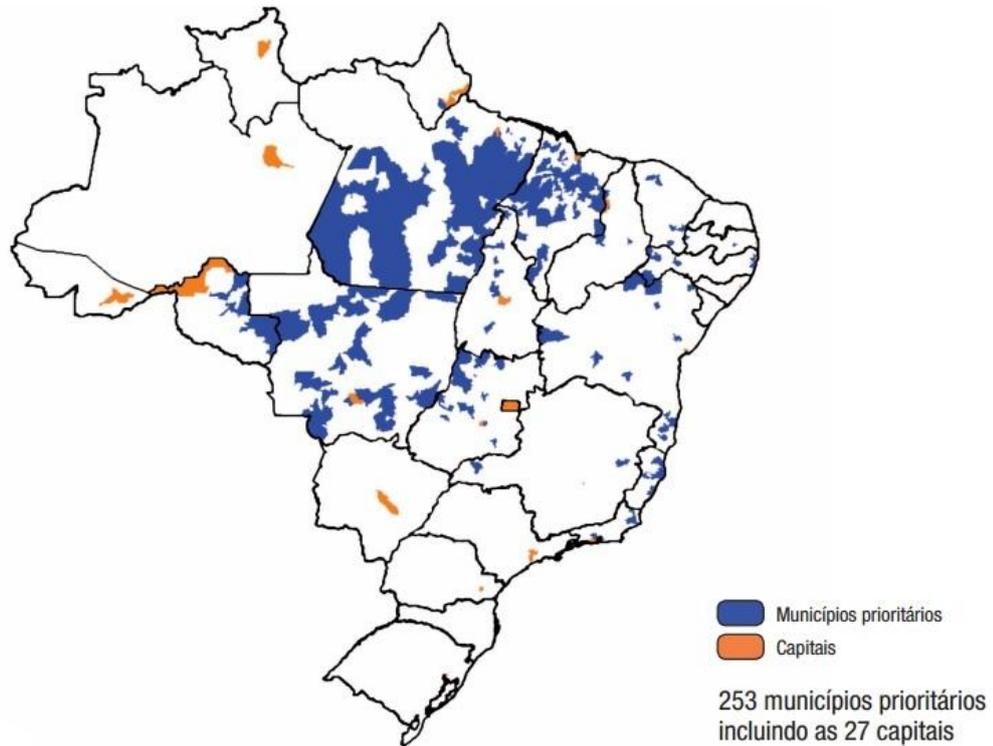
O Brasil apresenta a situação mais graves da América Latina. O total de casos no registro ativo foi de 30.135 no ano de 2013. A cada ano são diagnosticados cerca de 30.000 novos casos da doença no país, e a taxa de prevalência atual gira em torno de 1,51/10.000 habitantes, superior, portanto, a um caso por 10.000 habitantes, meta estabelecida pela OMS para o controle da doença (WHO, 2013; BRASIL, 2014) (Figura 1).

Durante a 44ª Assembléia Mundial de Saúde promovida pela OMS, em 1991, o Brasil, assumiu o compromisso de eliminar o MH como problema de saúde pública. A meta, que deveria ter sido atingida em 2000, não foi cumprida. A doença foi eliminada em 108 dos 122 países onde, em 1995, era considerada endêmica (BRASIL, 2003). Em 1999, na cidade de Abdijan, Costa do Marfim, em reunião promovida pela OMS, o Brasil ratificou o compromisso para eliminar a hanseníase até 2005, comprometendo-se a alcançar o índice nacional de menos de um doente para cada 10 mil habitantes (BRASIL, 2005). Porém, novamente, a meta não foi atingida, sendo estabelecido em 2006 um novo plano nacional de eliminação até o ano de 2010, onde o indicador de prevalência pontual foi substituído pelo indicador de detecção de casos novos. O foco de ação estaria centrado em regiões identificadas em *clusters*, os quais consistiam em áreas de maior risco da doença, alocados espacialmente, com base no coeficiente de detecção (CD) de casos novos por município. Os 10 clusters mais prováveis abrangiam 1.173 municípios do país (BRASIL, 2008b).

No entanto, em 2009, diante da perspectiva do não cumprimento da meta, o Brasil abandonou o compromisso firmado com a OMS, e estabeleceu sua própria estratégia de ação para eliminação do MH até o ano de 2015 (FORMENTI, 2009; BRASIL, 2012). A meta atual de eliminação baseia-se essencialmente no aumento da detecção precoce e na cura dos casos diagnosticados, tendo como parte da estratégia a busca ativa de casos em escolares e seus contatos. Foram estabelecidos áreas geográficas de risco de maior endemicidade representadas por um conjunto de 253 municípios (Figura 2). Tais municípios concentravam 56% dos casos novos diagnosticados em 2010, bem como 67% dos casos novos em crianças (<15 anos). Os municípios prioritários estão localizados principalmente nos estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará e Rondônia (BRASIL, 2012).

Grande parte desses casos está no estado do Maranhão, que possui CD de 55,54/100.000, o terceiro maior do país, ficando atrás apenas do Mato Grosso (80,34/100.000) e Tocantins (73,43/100.000) (BRASIL, 2013), todos pertencentes à Amazônia Legal, onde a doença apresenta-se de forma endêmica devido as grandes barreiras físicas e sociais que dificultam o acesso aos serviços de saúde oferecidos pelos municípios.

O Maranhão possui 77 municípios prioritários para o MH, com coeficiente de prevalência (CP) > 20 casos/10.000 hab., o que lhes confere um caráter hiperendêmico. Cerca de 84% da população do Estado encontra-se em municípios com mais de cinco casos de MH por 10.000 habitantes (MARANHÃO, 2012).



**Figura 2** - Municípios prioritários para vigilância da hanseníase em 2010. Fonte: BRASIL, 2012.

Nos últimos vinte anos, a ampliação da cobertura da poliquimioterapia padrão da OMS (PQT/OMS), para tratar pacientes com MH, mudou drasticamente a situação da doença como problema de saúde pública em todo o mundo. Dos 122 países endêmicos em 1985, apenas 16 continuam apresentando coeficiente de prevalência acima de um caso por 10.000 habitantes (WHO, 2013). No Brasil, após a introdução da poliquimioterapia (PQT) para tratamento a prevalência caiu, porém a incidência permanece alta (BRASIL, 2013). A prevalência oculta pode ser muito maior que a incidência, assinalando uma endemia não incluída nos cálculos da eliminação almejada (SBD, 2005).

### 2.3 Aspectos clínicos

A hanseníase tem uma ampla diversidade de manifestações clínicas, o que determinou uma necessidade de classificação. Este procedimento é útil não só para o diagnóstico mas, também, para avaliação da progressão da doença, implementação terapêutica e monitoramento de características epidemiológicas, regionais e globais (LOCKWOOD et al., 2007). Várias classificações já foram propostas no passado, como as de Manila (1931), Cairo (1938), Rio de Janeiro (1946), Havana (1948) e de Madri (1953). No entanto, a sua

aceitação e utilização nem sempre foram consensuais e universais (MASSONE e BRUNASSO, 2012).

Em 1966, Ridley e Jopling propuseram a classificação que ainda hoje é amplamente utilizada no mundo, tanto na prática clínica quanto na literatura científica, por sistematizar melhor as várias formas da doença ao juntar as características clínicas, histopatológicas, bacteriológicas e imunológicas (RIDLEY e JOPLING, 1966; LOCKWOOD et al., 2007).

Essa classificação propõe um entendimento doença de maneira polar, que está intimamente relacionado com o tipo de resposta imunológica dos indivíduos frente ao bacilo (FOSS, 1997; ARAÚJO, 2003). Em pólos opostos, encontram-se as duas formas estáveis da doença, a forma virchowiana e a tuberculóide, separadas por três formas intermediárias denominadas dimorfo-dimorfo, dimorfo-virchowiana e dimorfo-tuberculóide, que, por serem instáveis, evoluem para uma das formas polares através de episódios clínicos, ocasionais ou recidivos, chamados de estados reacionais (RIDLEY e JOPLING, 1966). As características dessas formas clínicas estão resumidas na Tabela 1.

Existe também a forma indeterminada que corresponde ao início da doença, sendo considerada a primeira manifestação clínica da hanseníase. Essa forma é caracterizada por uma área de hipoestesia, delimitada ou não por uma lesão visível, que pode ser única ou em pequeno número, sendo comum a presença de máculas hipocrômicas ou discretamente eritematosas e mais secas do que a pele circunjacente. As lesões apresentam limites imprecisos, sem relevo ou atrofia. Pode ocorrer cura espontânea, desenvolvimento lento, ou ainda, involução com ressurgimento tardio com características clínicas definidas dentro do espectro da doença, de acordo com a capacidade do indivíduo em montar uma resposta imunológica específica (ARAÚJO, 2003; SCOLLARD et al., 2006).

O Ministério da Saúde do Brasil adotou a classificação de Madrid (1953) para o diagnóstico clínico dos casos, que considera os aspectos morfológicos das lesões cutâneas em quatro formas clínicas: indeterminada, tuberculóide, dimorfa e virchowiana. Entretanto, para fins de tratamento e ampliação da cobertura de diagnóstico, o Brasil segue as recomendações da OMS que utiliza a classificação operacional, baseada no número de lesões. Pacientes com até 5 lesões de pele, são classificados como paucibacilares (PB), enquanto os pacientes com mais de 5 lesões são classificados como multibacilares (MB) (WHO, 2000; BRASIL, 2002; OPROMOLLA e MARTELLI, 2005).

**Tabela 1 - Características das formas clínicas da escala de Ridley & Jopling.**

<b>Formas clínicas</b>	<b>Características</b>
Tuberculóide (TT)	Resistência do hospedeiro e baixa carga bacilar. Doença localizada, lesão cutânea única ou em pequeno número com bordas pronunciadas, hipocrômicas; hipoestesia ou anestesia da face, mãos e pés, com espessamento do nervo adjacente; pacientes com imunidade mediada por células.
Dimorfo-tuberculóide (DT)	Semelhante a TT, porém com lesões numerosas e pequenas, espessamento de nervos periféricos e deformidades de mãos e pés.
Dimorfo-dimorfo (DD)	Numerosas lesões cutâneas foveolares de tamanhos e formas variável (máculas, pápulas, placas), com área central circular, anestésica e hipocrômica, que se difunde na periferia, perdendo seus limites (aspecto de "queijo suíço"); envolvimento generalizado de nervos e deformidades dos membros.
Dimorfo-virchowiano (DV)	Grande número de lesões cutâneas assimétricas, com formas variáveis; baciloscopia positiva.
Virchowiano (VV)	Deficiência da resposta imune celular e infecção generalizada. Presença de pápulas, nódulos e máculas na pele; infiltrado difuso na face, orelhas, nádegas, membros superiores e inferiores; edema periférico, rinite e perda de um terço das sobrancelhas (madarose); envolvimento da membrana da mucosa nasal causando congestão, laringite e rouquidão, perfuração do septo nasal e colapso das cartilagens nasais (nariz em sela); anestesia, ginecomastia, atrofia testicular, ictiose, paralisia de nervos e reabsorção das falanges; baciloscopia positiva.

Fonte: adaptado de Mooney (2009).

Durante o curso da doença ou mesmo durante ou após o tratamento, podem ocorrer surtos inflamatórios conhecidos como reações hansênicas, produzidos por diferentes mecanismos imunológicos, responsáveis por desencadear sérios danos teciduais (GOULART et al., 2002). Essas reações geram grande desconforto ao paciente interferindo na evolução da doença e sendo responsáveis, em grande parte, pela morbidade, dano neural, incapacidades e pela manutenção do estigma do MH (PINHEIRO et al., 2011).

As reações hansênicas podem ser de dois tipos: reação tipo 1 ou reação reversa e reação tipo 2. A reação tipo 1, comum em paucibacilares, caracteriza-se pelo aparecimento de novas lesões (manchas ou placas), infiltração, alterações de cor e edema nas lesões antigas, bem como dor ou espessamento dos nervos. Na reação tipo 2, típica em multibacilares, a manifestação clínica mais frequente é o eritema nodoso hansênico, que se caracteriza por apresentar nódulos vermelhos e dolorosos, febre, dores articulares, dor e espessamento nos nervos, sem alteração das antigas lesões. Embora a região dos nervos periféricos e pele sejam

as mais afetadas nas reações, outros sítios como olhos, trato respiratório superior, fígado, mãos e pés podem ser acometidos (PINHEIRO et al., 2011; LASTÓRIA e ABREU, 2012).

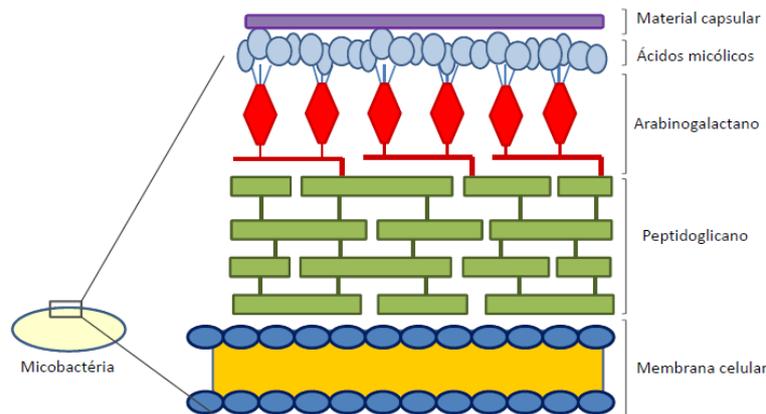
Em todas as suas formas, o MH apresenta um alto potencial incapacitante, mesmo com a baixa virulência do bacilo (MASSONE e BRUNASSO, 2012; VAN BRAKEL et al., 2012). As incapacidades físicas decorrem, principalmente, dos estados reacionais com neurites que não são diagnosticados e tratados adequadamente. As sequelas se manifestam através de paralisia de músculos da face, mãos e pés ou úlceras crônicas, palmar ou plantar, com perda de função sensitiva. O grau de incapacidade física é classificado como grau 0 quando não há alteração de sensibilidade em olhos, mãos e pés. Grau 1, quando há hipoestesia sem deformidade em olhos, mãos ou pés e Grau 2 quando há deformidades em olhos com lagofalmo, ectrópico, opacidade da córnea e triquíase; e deformidades em mãos e pés com lesões ulcerosas, tróficas, absorções digitais, garras e mão ou pés caídos (BRASIL, 2002). São geralmente encontrados, durante o diagnóstico da doença, nas formas virchowianas, com grande quantidade de nervos periféricos espessados, e estão relacionados a um diagnóstico tardio (ALVES et al., 2010). Medidas de prevenção incluem o acompanhamento periódico do paciente e a instituição de corticoterapia quando o dano neural é identificado (BRASIL, 2008a).

## **2.4 Interação parasito-hospedeiro**

O micro-organismo causador do MH, o *M. leprae*, é taxonomicamente classificado como pertencente à família *Mycobacteriaceae*, da ordem *Actinomycetales*. É uma bactéria imóvel, não formadora de esporos, que se apresenta na forma de bacilo, com comprimento entre 1 a 8 µm e diâmetro de 0,3µm. São bactérias gram-positivas, fracamente coradas por álcool ou ácidos (álcool-ácido resistente). Entretanto, pelo método de Fite-Faraco, exibem uma coloração vermelha (SCOLLARD et al., 2006). A reprodução é por bipartição binária, a uma taxa de replicação bastante lenta (aproximadamente 12 dias), que ocorre, principalmente, em macrófagos, células epiteliais e células de Schwann. O fato da localização de lesões em regiões periféricas do corpo sugere que o bacilo possui preferência por áreas de baixa temperatura (BHAT e PRAKASH, 2012; SUZUKI et al., 2012).

Sua membrana plasmática é revestida por parede celular, de cerca de 20nm de espessura e composta por uma pseudobicamada lipídica, assim chamada devido à disposição das moléculas que formam a estrutura da mesma (SCOLLARD et al., 2006). O cerne da parede é composto por peptidoglicano e arabinogalactano ligado a ácidos graxos específicos de micobactérias, os ácidos micólicos (Figura 3). A “camada” mais externa da parede, ou seja,

a cápsula é composta, dentre outros lipídeos por: monomicolatos de trealosa (TMM), por várias moléculas de glicolípídeo fenólico-1 (PGL-1) e de 1-ftiocerol dimicocerosato (PDIM), sendo estes únicos para esta espécie de bactéria e parecem estar relacionados com a patogenicidade (HETT e RUBIN, 2008; AKAMA et al., 2010).



**Figura 3** - Esquema representativo dos componentes básicos da parede celular do *M. leprae*. Adaptado de Hett e Rubin (2008).

Após o sequenciamento e análise do genoma de *M. leprae*, observou-se que menos da metade codifica genes funcionais, dentre os quais, grande parte codifica moléculas da parede celular, entre elas os PGL-1 (COLE et al., 2001). A conservação desses genes, mesmo com a drástica grande redução genômica sofrida pelo parasita, evidencia a importância adaptativa das proteínas capsulares (EIGLMEIER et al., 2001).

A adesão do *M. leprae* à célula do hospedeiro é mediada por proteínas presentes na parede celular do patógeno, nas quais se destacam o PGL-1 e a LBP21 (*laminin binding protein*) (SCOLLARD, 2008). A especificidade pelas células de Schwann dá-se pela afinidade do bacilo à região globular da cadeia  $\alpha 2$  da laminina-2, uma glicoproteína constituinte da lâmina basal das células de Schwann e macrófagos (SOARES DE LIMA et al., 2005; BARKER, 2006). Outros componentes da parede celular parecem induzir a perda da bainha de mielina nas células de Schwann, tornando-as mais suscetíveis à invasão pelo bacilo (RAMBUKKANA, 2004; SCOLLARD, 2008). Entretanto, os mecanismos que promovem a interiorização do patógeno nessas células não estão totalmente elucidados e aceitos, já que o bacilo também tem a capacidade de invadir células não mielinizadas (CHACHA et al., 2009; POLYCARPOU et al., 2013).

O reconhecimento do micro-organismo em macrófagos e células dendríticas é mediado por receptores expressos nos sítios de exposição, sendo estes os responsáveis por desencadear as primeiras respostas do hospedeiro (MENDONÇA et al., 2008). Os principais tipos de receptores são os *toll-like receptors* (TLRs), de lectina do tipo C (manose) e do sistema complemento (CRs), responsáveis pelo reconhecimento de lipídeos da parede celular de *M. leprae* (ASTARIE-DEQUEKER et al., 2010). Glicoproteínas como o PGL-1 são reconhecidos pelo receptor do tipo 3 do sistema complemento (CR3). Lipoglicanos são reconhecidos por receptores de manose (MISCH et al., 2010). Outras estruturas não possuem interação com receptores de membranas, tais como o fosfatidil inositol manosídeo (PIM), mas interferem na fagocitose inserindo lipídeos na membrana dessas células, que provocam um aumento na eficiência da fagocitose mediada pelos receptores (ILANGUMARAN et al., 1995).

A sobrevivência do bacilo após a sua internalização é um passo fundamental para o curso da doença, pois a etapa seguinte envolve proliferação celular e reprodução do patógeno, uma vez que o parasito irá modular as respostas celular e humoral durante o curso da infecção (BARKER, 2006).

## 2.5 Imunopatologia

A interação entre o patógeno e o hospedeiro determina o padrão de resposta imune e a evolução da infecção. No local de entrada do bacilo (mucosa das vias aéreas superiores) as células dendríticas são as primeiras a reconhecê-lo. A ativação de receptores semelhantes a Toll (TLRs) induz a produção de mediadores de imunidade (citocinas e quimiocinas) e indução da expressão de marcadores de ativação de fagócitos, assim como moléculas de MHC classe I e II (PINHEIRO et al., 2011).

O complexo MHC-antígeno é capaz de estimular a diferenciação de linfócitos T, ativando a resposta imune celular (MAEDA et al., 2003). Várias células estão envolvidas nessa resposta, como células T auxiliares CD4<sup>+</sup> e células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> que não somente exercem atividades efetoras diretas como também modulam a resposta imune inata. Células T auxiliares CD4<sup>+</sup> estão subdivididas em quatro subtipos distintos: Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Tregs). Cada subtipo está envolvido na proteção contra tipos específicos de organismos (WEERDENBURG et al., 2010; GELUK et al., 2012).

Células Th1 são essenciais contra micro-organismos intracelulares, a exemplo da micobactéria pela ativação da resposta inflamatória nos macrófagos (D'ELIOS et al., 2011). O *M. leprae*, no entanto, desenvolveu vários mecanismos adaptativos que permitem sua

persistência dentro do corpo humano, e em muitos casos, causando significantes danos aos tecidos. Indivíduos infectados podem ser desde assintomáticos até formas leves ou graves da doença, com diferentes espectros clínicos. O padrão individual de secreção de citocinas influencia a forma clínica da doença e está relacionado com a função dos TLRs. Citocinas Th1 estão relacionadas com a ativação de TLR1 e TLR2 e o perfil Th2 está associado com a inibição da ativação (KRUTZIK et al., 2005).

No padrão de resposta Th1, observa-se uma enorme produção de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 (GOULART e GOULART, 2009). Dentre outras muitas funções, o INF- $\gamma$  promove aumento a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN's) em macrófagos mediante a ativação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS ou NOS2) (SCHRODER et al., 2004; RAHAT e HEMMERLEIN, 2013). Esta mesma citocina pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) via explosão respiratória, catalisada pela NADPH oxidase, que ocorre após a fagocitose (KALYANARAMAN, 2013). Desta forma, as células fagocitárias ativadas por IFN- $\gamma$  tornam-se capazes de limitar o crescimento e a sobrevivência do *M. leprae*, através da ação tóxica das espécies reativas e ativação de células T (VISCA et al., 2002; GELUK et al., 2012). A produção de TNF pelo macrófago em nível local, favorece uma ação sinérgica autócrina para manter o macrófago ativado (GOULART et al., 2002). A produção de IL-2 é responsável pela proliferação e progressão de linfócitos T e pela estimulação de células NK, que possuem atividade citotóxica, atacando macrófagos e células de Schwann infectados pelo bacilo (FOSS, 1997; SCOLLARD et al., 2006).

Os indivíduos com hanseníase TT e DT, formas mais branda da doença, apresentam uma boa resposta imune celular do tipo Th1 e baixa resposta humoral, com poucos bacilos presentes na linfa e nas lesões de pele. Histopatologicamente, estas formas clínicas são caracterizadas pela formação de granulomas. A alta resposta celular permite o controle da infecção mediante a redução dos nichos de replicação da bactéria (WILKINSON e LOCKWOOD, 2005). Apesar do efeito protetor deste tipo de resposta, danos como inflamações granulomatosas na pele e lesões nos nervos periféricos são observados a longo prazo. Os granulomas são normalmente formados quando a resposta imune celular não pode de imediato eliminar o organismo infeccioso, acumulando principalmente macrófagos e células T em torno de células infectadas (LOCKWOOD et al., 2011). Outras citocinas são produzidas em menor quantidade na resposta Th1, mas parecem contribuir para o estado de imunidade ao bacilo, característico desses pacientes (GOULART et al., 2002).

Por outro lado, quando a resposta é do tipo Th2 os pacientes possuem resposta imune celular reduzida, sendo este o fator responsável pela ineficiência na destruição do

bacilo, o que resulta na elevação da carga bacteriana nos nervos periféricos e na pele (MODLIN, 1994). Esse é o tipo de resposta encontrado em pacientes com as formas VV, DV ou ainda DD. A diferenciação de um linfócito T para um perfil Th2 é influenciada, principalmente, pela IL-4, secretada por linfócitos T, mastócitos, eosinófilos e células NK (NATH et al., 2000; ALTER et al., 2011).

Células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estimulando a produção de anticorpos que são importantes no controle de agentes extracelulares. A IL-4 promove a diferenciação de células B e a proliferação de linfócitos Th2. A IL-10 tem um papel supressor inibindo a proliferação de células Th1, reduzindo a expressão de citocinas antibacterianas (como o TNF e INF- $\gamma$ ) e dos antígenos de classe II do MHC, reduzindo desta forma a capacidade de realizar a apresentação de antígenos e, conseqüentemente estimular as células T citotóxicas (MOCELLIN et al., 2003). A IL-10 também estimula a maturação de linfócitos B e a produção de anticorpos, o que resulta na alta resposta humoral, evidenciada nestes pacientes pelos altos níveis de anticorpos circulantes, principalmente de IgM antiPGL-1 (FROTA et al., 2010). Assim, por causa desse papel regulatório, favorecendo a infecção e estimulando a proliferação de células Th2, as células T envolvidas na produção dessa citocina passaram a ser chamadas de Treg (ANTAS et al., 2004; SCOLLARD et al., 2006).

O paradigma Th1/Th2 proposto por Modlin (1994) para explicar a imunopatologia do MH, passou a não ser suficiente para elucidação de uma série de evidências da doença. De forma que maior importância tem sido dada a outras populações celulares no estudo do MH, como células Treg e também as células Th17 (PARK et al., 2005; BETTELLI et al., 2006).

Células Treg tem sido descritas na patogênese de algumas doenças, participando ou controlando a inflamação. Entre os diferentes tipos de células Treg, algumas são formadas no timo (Treg naturais) e outras que se diferenciam na periferia (Treg adaptativas), onde dois subtipos tem sido descritos, Tr1 e Th3 (MELO e CARVALHO, 2009; WORKMAN *et al.*, 2009). Embora estas células ainda estejam em estudo, a IL-10 aparece como indutora da diferenciação de Treg periféricas. Células Treg participam na tolerância imunológica por regular outras células T através da produção de citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ). O TGF- $\beta$  tem sido definido como regulador do desenvolvimento das Tregs, bem como fator essencial na homeostasia das células T na periferia, tolerância a antígenos próprios e diferenciação das células durante a resposta imune (LI e FLAVELL, 2008).

No entanto, o papel da Treg no MH ainda é controverso. Maior frequência de células Treg e expressão de FoxP3<sup>+</sup> foi observado em pacientes TT que em outras formas clínicas (ATTIA et al., 2010). Palermo et al. (2012) descreveram maior número de células

Treg na forma virchowiana, indicando a maior participação dessas células na imunossupressão específica e proliferação bacilar observadas nessa forma clínica da doença. Uma alta frequência na expressão de FoxP3<sup>+</sup>, no entanto, parece ocorrer na reação hansênica tipo 1, não havendo diferença entre as formas clínicas (MASSONE et al., 2010). Apesar do grande progresso em pesquisas no MH, existem ainda muitas lacunas na compreensão dos determinantes envolvidos no estabelecimento dos fenótipos imunológicos da doença, incluindo o papel das células Treg e Th17.

Células Th17 são importantes em um grupo diverso de doenças inflamatórias, incluindo as doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares (WEAVER et al., 2013). As células Th17 produzem uma variedade de citocinas, incluindo IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, GM-CSF, IL-9, IL-10 e IFN- $\gamma$ , que variam, dependendo do ambiente em que a diferenciação ocorre, quimiocinas CCL20 e CXCL16, além de induzirem a ativação de enzimas, como iNOS e a metaloproteinase (KHADER et al., 2007; BEDOYA et al., 2013; WOJKOWSKA et al., 2014). O resultado da ativação do padrão Th17 é um recrutamento de células inflamatórias, em especial de neutrófilos, que possuem um importante papel no controle de bactérias, prevenindo necrose tecidual ou sepse e também de macrófagos, em uma fase mais tardia da inflamação (KIMURA et al., 2007; ROMAGNANI, 2008; WOJKOWSKA et al., 2014).

Acredita-se que células Th17 desempenham um papel importante no estabelecimento de uma resposta imune específica ao *M. tuberculosis*, principalmente através do recrutamento de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  (KHADER e COOPER, 2008; BASSO et al., 2009; WAREHAM et al., 2014). A ausência de células Th17 de memória resulta em uma menor resposta protetora do tipo Th1 (KHADER e COOPER, 2008). O desenvolvimento desse distinto subtipo de células T CD4<sup>+</sup> parece requerer o bloqueio na diferenciação das células Th1 e Th2 (ROMAGNANI, 2008). A IL-6 e TGF- $\beta$  exercem importantes papéis na diferenciação e proliferação desta linhagem celular, sendo este processo regulado por STAT-3, aumentado na presença de IL-23 e antagonizado por IFN- $\gamma$  e IL-4 (KIMURA et al., 2007; PECK e MELLINS, 2010; ZHENG, 2013; TAHERIAN et al., 2014). O papel das células Th17 na resposta imune em pacientes infectados por *M. leprae* permanece indefinido, mas atribui-se a sua potente resposta imune inflamatória o principal mecanismo do dano tecidual (MARTINIUK et al., 2012).

Outra parte dos pacientes não possui uma resposta imune facilmente identificável, classificados como grupo indeterminado (I). Acredita-se que esta seja a forma inicial da

doença, pois os acometidos também não apresentam manifestações clínicas características (GOULART et al., 2002; VIDAL PESSOLANI et al., 2003).

## **2.6 Diagnóstico clínico e laboratorial**

O diagnóstico clínico de hanseníase é baseado no exame físico para identificação de sinais dermatoneurológicos da doença. Antes, porém, do exame físico deve ser coletado informações sobre histórico clínico e epidemiológico. Além das questões rotineiras da anamnese, é fundamental a identificação de lesões na pele (manchas, placas, infiltrações, tubérculos, nódulos) com alterações de sensibilidade, presença de neurites, incapacidades e deformidades, seguido de diagnóstico de estados reacionais, diferencial e classificação do grau de incapacidade (BRASIL, 2002).

Alternativamente, alguns testes laboratoriais como a baciloscopia e exame histopatológico de biópsia de lesão de pele podem auxiliar no diagnóstico do MH (LASTÓRIA e ABREU, 2012). O exame histopatológico de biópsia de lesão de pele baseia-se na análise microscópica de cortes de tecidos corados por hematoxilina-eosina visando identificar presença de granulomas de células epitelióides, agressão neural, vasculite na derme e/ou hipoderme, paniculite, infiltrado celular e espessamento de tecidos (SINGH et al., 2011; LASTÓRIA e ABREU, 2012).

A baciloscopia é um exame microscópico que permite identificar a presença de bacilos nos esfregaços de raspados intradérmicos, corados pela técnica de Ziehl-Neelsen, coletados de lesões, lóbulos auriculares, cotovelos e/ou joelhos ou material de biópsia. A carga bacilar é expressa como um índice baciloscópico (IB) que reflete o número de bacilos por campo microscópico em escala logarítmica (NAIK et al., 2011). Em pacientes tuberculóides a baciloscopia é geralmente negativa, enquanto em virchowianos é positiva. Entretanto, um resultado negativo não afasta o diagnóstico da hanseníase, pois o exame é de baixa sensibilidade para pacientes PB (LASTÓRIA e ABREU, 2012). A realização do exame exige um profissional capacitado e bem treinado, pois a especificidade é de aproximadamente 100%, porém a sensibilidade é em torno de 76% para pacientes MB e 26% para pacientes PB (BHUSHAN et al., 2008). Tanto a baciloscopia quanto o exame histopatológico não são exames preconizados pela OMS para o diagnóstico do MH, por isso não são realizados de forma rotineira pelos serviços de saúde pública no Brasil (WHO, 2005).

A sorologia antiPGL-1 também pode auxiliar no diagnóstico. É um teste específico para MH, pois não apresenta reação cruzada com outras micobactérias, e que se baseia, principalmente, na detecção de anticorpos da classe IgM antiPGL-1 (BÜHRER-

SÉKULA, 2008). No entanto, possui baixa sensibilidade para pacientes PB, pois o nível de anticorpos pode ser muito baixo ou indetectável. A sensibilidade é de até 98% em pacientes MB e de 35% em pacientes PB (MOURA et al., 2008). Os títulos de IgM correlacionam-se ainda com a forma clínica e carga bacilar da doença (SCHURING et al., 2006; LYON et al., 2008). A detecção de anticorpos antiPGL-1 pode ser realizado por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou ainda por um teste rápido no formato de fluxo lateral (ML-Flow), que apresenta como principal vantagem a facilidade de execução em campo, não necessitando de reagentes refrigerados, equipamentos especializados ou mão de obra treinada (SILVA et al., 2008; BÜHRER-SÉKULA et al., 2009).

Testes cutâneos de hipersensibilidade tardia podem ser utilizados como avaliadores da resposta imune celular do MH. Entre eles o melhor avaliado é o teste de Mitsuda ou lepromina que usa extrato bruto de *M. leprae* esterilizado por autoclave. O exame consiste na injeção intradérmica de 0,1 ml de bacilos na face ventral do antebraço, e a leitura da reação é feita após 24 a 28 dias. A solução de Mitsuda contém  $4,0 \times 10^7$  bacilos mortos/por mL (PINHO et al., 1998). O teste de Mitsuda não deve ser utilizado para o diagnóstico da doença, devido a reatividade cruzada com micobactérias ambientais não patogênicas e a vacina BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). O teste de Mitsuda serve como prognóstico e constitui parâmetro para avaliar a presença de resposta imune celular do indivíduo ao bacilo *M. leprae* (DE SOUZA et al., 2007). É positiva nos pacientes tuberculoides, em que há boa resposta imunocelular, negativa nos virchowianos, nos quais essa resposta é deficiente, e mostra graus variáveis de positividade nos dimorfos (LASTÓRIA e ABREU, 2012).

## 2.7 Profilaxia e controle

Não há vacina específica contra *M. leprae*. No entanto, em vários países endêmicos do mundo, inclusive no Brasil, tem sido realizada uma vacinação de rotina com *Mycobacterium bovis* (BCG) para prevenir, por proteção cruzada, a infecção por *M. leprae*. A BCG é aplicada na dose de 0,1 ml em crianças com idade acima de 3 meses, por via intradérmica no braço direito, na altura da inserção inferior do músculo deltóide (BRASIL, 2010a).

Vários estudos mostram a capacidade protetora da BCG contra a forma virchowiana da hanseníase, principalmente (PÖNNIGHAUS et al., 1992; RODRIGUES et al., 2007; DÜPPRE et al., 2008; MERLE et al., 2010). Muitas outras micobactérias foram examinadas para o desenvolvimento de uma potencial vacina contra a hanseníase, porém essas vacinas demonstraram baixo grau de proteção (GORMUS e MEYERS, 2003;

NARANG et al., 2005; DUTHIE et al., 2011). O uso generalizado de uma vacina com bactérias vivas é limitado por preocupações de segurança e pela incapacidade de fabricar grandes lotes reprodutíveis do *M. leprae*, já que é uma bactéria não cultivável em meios de culturas (RAMAN et al., 2009).

O Ministério da Saúde do Brasil recomenda o uso da vacina BCG como prevenção a todos os contatos de paciente com hanseníase desde a década de 70. A vacina BCG deve ser aplicada nos contatos intradomiciliares sem presença de sinais e sintomas de hanseníase no momento da avaliação, independentemente de serem contatos de casos PB ou MB. A aplicação depende da história vacinal, que segue as seguintes recomendações: na presença de uma cicatriz prescrever uma dose, com duas cicatrizes não prescrever nenhuma dose. Na ausência de cicatriz vacinal ou se a informação for duvidosa são aplicadas duas doses com intervalo de 6 meses (BRASIL, 2010a).

Os esforços para o controle da morbidade através da detecção precoce de casos novos e a cura com a quimioterapia são prioridades pela OMS, como principal ferramenta para enfrentar os desafios ainda existentes para a redução da carga da doença, bem como os impactos danosos sobre os indivíduos e suas famílias (WHO, 2006). Há evidências de que a quimioprofilaxia é efetiva em reduzir a incidência do MH, particularmente nos contatos domiciliares (REVEIZ et al., 2009).

A realização do diagnóstico precoce, o início do tratamento poliquimioterápico de forma oportuna e a vigilância dos contatos intradomiciliares, baseada na realização de exame dermatoneurológico e na vacinação com BCG constituem as principais estratégias para o controle da hanseníase no país (BRASIL, 2008b).

### 3 JUSTIFICATIVA

A hanseníase no Brasil continua sendo um problema de saúde pública. Possui nível endêmico, sendo o segundo país do mundo com maior taxa de prevalência (1,51 casos/10 mil habitantes), acima do recomendado pela OMS (<1caso/10 mil habitantes). Apesar da notável diminuição nos CD ao longo dos anos, a detecção de novos casos continua alta e a patologia é considerada hiperendêmica nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do nosso país (BRASIL, 2013).

A manutenção da alta endemia do MH, em certas regiões, pode estar associada a diferentes modos de organização espacial e social, determinando diferentes grupos de riscos relacionados com o adoecimento (LANA et al., 2009). Entre outros fatores que influenciam, acredita-se na existência de uma predisposição genética do indivíduo na resistência ou susceptibilidade à infecção por *M. leprae* (LÁZARO et al., 2010). Se fatores genéticos estão envolvidos na gênese do MH, é possível que casos índices e contactantes consanguíneos, apresentem resposta imunológica semelhante no que tange à manutenção da hiperendemia, cujos achados não estão ainda claramente definidos.

A evolução clínica da infecção por *M. leprae* em um hospedeiro depende do padrão de citocinas no sítio da infecção. Nesse perfil, ferramentas imunológicas tornam-se igualmente importantes no diagnóstico das formas subclínicas, por meio da mensuração de anticorpos. A ausência de manifestações clínicas nos indivíduos infectados assintomáticos é um problema que circunda a epidemiologia do MH, uma vez que o diagnóstico destes indivíduos é fundamental para o controle da doença (FINE, 2007).

Considerado pelo Ministério da Saúde como uma área hiperendêmica, o estado do Maranhão possui 77 municípios prioritários para o MH, sendo uma das áreas com maior risco de detecção da doença no país. Além disso, é o terceiro estado com maior CD de novos casos de MH no país (55,54/100.000 habitantes) e o primeiro da região nordeste em número de casos notificados em 2012 (BRASIL, 2013). Outro grande problema do MH no Estado é a exposição da população infantil ao bacilo. Do total de 3.899 novos casos da doença notificados em 2013, cerca de 10% eram crianças com até 14 anos de idade (BRASIL, 2014). Estes parâmetros refletem a incapacidade de controle da doença e a continuidade na cadeia de transmissão (BARBIERI e MARQUES, 2009).

Açailândia, Imperatriz e São Luís (capital do Estado), são exemplos de municípios hiperendêmicos, e estão entre os dez maiores números de casos novos detectados nos últimos cinco anos no Estado (Tabela 2). Estão localizados geograficamente em regiões

distintas, com diferentes índices de desenvolvimento humano (IDH). Possuem elevados CD da doença, e juntos representam 21% do total de casos detectados em 2013 do Maranhão (BRASIL, 2014).

**Tabela 2** - Municípios do Maranhão com maiores números de casos novos de MH detectados nos anos de 2009 a 2013. Destaque para Açailândia, Imperatriz e São Luís.

	2009	2010	2011	2012	2013
1	<b>São Luís 681</b>	<b>São Luís 731</b>	<b>São Luís 780</b>	<b>São Luís 781</b>	<b>São Luís 536</b>
2	<b>Imperatriz 333</b>	Timon 216	<b>Imperatriz 255</b>	<b>Imperatriz 228</b>	<b>Imperatriz 190</b>
3	Timon 180	<b>Imperatriz 194</b>	Timon 162	<b>Açailândia 155</b>	Santa Inês 145
4	Bacabal 171	Caxias 153	<b>Açailândia 151</b>	Timon 139	São José de Ribamar 134
5	<b>Açailândia 148</b>	Bacabal 137	Santa Luzia 123	São José de Ribamar 136	Coroatá 118
6	Caxias 141	Santa Luzia 133	São José de Ribamar 122	Caxias 134	Caxias 117
7	Codó 134	Codó 129	Caxias 112	Codó 118	Bacabal 112
8	Santa Inês 125	<b>Açailândia 118</b>	Codó 112	Santa Luzia 116	Zé Doca 101
9	Santa Luzia 110	São José de Ribamar 112	Zé Doca 106	Bacabal 104	<b>Açailândia 100</b>
10	São José de Ribamar 106	Itapecuru Mirim 87	Bacabal 93	Santa Inês 92	Timon 95

Fonte: SVS - SINAN. BRASIL, 2014.

Dessa forma, o conhecimento do perfil epidemiológico e imunológico de pacientes e contatos de área hiperendêmica é de grande importância por serem características centrais na dinâmica da infecção, fornecendo informações que poderão identificar fatores que influenciam os elevados CD. E ainda por serem úteis para o desenvolvimento de políticas públicas de saúde, visando auxiliar na redução de novos casos da doença, assim como da sua transmissão, garantindo o controle ao longo dos anos nessas regiões.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Caracterizar o perfil epidemiológico e imunológico em pacientes hansenianos e contatos de área hiperendêmica do Estado do Maranhão.

### 4.2 Objetivos Específicos

I) Descrever os aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos e contatos de pacientes com MH;

II) Caracterizar o perfil da resposta humoral de casos e contatos de pacientes com MH;

III) Relacionar a presença de anticorpos IgM antiPGL-1 aos aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos e contatos de pacientes com MH;

IV) Avaliar a concordância das técnicas imunológicas de diagnóstico para identificação de infecção por *M. leprae*;

V) Comparar a produção sérica de citocinas e quimiocinas da resposta imune inata e adaptativa dos doentes com diferentes formas clínicas da hanseníase e seus contatos.

VI) Comparar a produção sérica de citocinas e quimiocinas em casos e contatos com e sem cicatriz vacinal.

## 5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 5.1 Tipo de estudo

Foi realizado um estudo transversal que analisou dados epidemiológicos resultantes do acompanhamento de coorte de casos de MH e seus contactantes no Estado do Maranhão, no período de 2009 a 2012. O presente estudo foi parte do projeto “Aplicação de tecnologias moleculares, imunológicas e de geoprocessamento para a caracterização epidemiológica, diagnóstico e monitoramento da hanseníase em área hiperendêmica do Maranhão” Edital MCT/CNPq/CT-Saúde/MS/SCTIE/DECIT N°034/2008, o qual foi coordenado pela Dra. Isabela Maria B. Goulart, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em parceria com a Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão, sob n° 23115-003005/2009-36 (ANEXO A).

### 5.2 Área de estudo

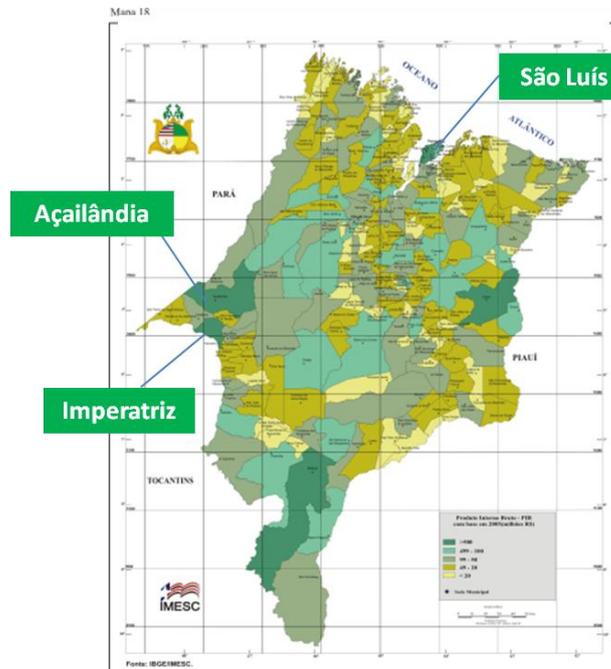
Para o estudo foram selecionados três municípios considerados hiperendêmicos para MH, os quais apresentavam  $CD \geq 40$  casos/100.000 habitantes no banco de registro de casos de MH do SINAN. Foram incluídos nesse estudo, portanto, os municípios de Açailândia, Imperatriz e São Luís (Figura 4).

O município de Açailândia está localizado a Oeste do Estado do Maranhão, a  $04^{\circ} 56' 48''$  S de latitude e a  $47^{\circ} 30' 17''$  W de longitude, com altitude média de 240 metros e território de 5.806,440 km<sup>2</sup>. Possui 104.047 habitantes e uma densidade demográfica de 17,92 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2010).

O município de Imperatriz também está situado a oeste do Estado do Maranhão, localizado a  $05^{\circ} 31' 35''$  S de latitude e a  $47^{\circ} 29' 30''$  W de longitude, com altitude média de 131 metros e território de 1.368,987 km<sup>2</sup>. A cidade é a segunda mais populosa do estado, com 247.505 habitantes e uma densidade demográfica de 180,79 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2010).

São Luís, capital do Estado, está situada ao norte, latitude  $02^{\circ} 31' 47''$  S e longitude  $44^{\circ} 18' 10''$  W. Possui uma área de 834,785 km<sup>2</sup> e uma altitude de apenas 24 metros. Tem a maior população do Estado com 1.014.837 habitantes e densidade demográfica de 1.215,69 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2010). Os três municípios têm em comum o clima tropical úmido. O bioma amazônico é característico das cidades de Açailândia e Imperatriz, enquanto em São Luís predomina o bioma costeiro.

Parte do desenvolvimento desse estudo foi realizado no Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão - UFMA, em São Luís, onde são realizadas pesquisas na área de imunologia daquela instituição.



**Figura 4** - Mapa do estado do Maranhão. Destaque para a localização dos municípios de Açailândia, Imperatriz e São Luís. Fonte: IMESC (2014).

### 5.3 Critérios de inclusão e exclusão da amostra

Foram incluídos no estudo casos de MH clinicamente confirmados, virgens de tratamento, que residiam em área de alta endemicidade previamente selecionada e que tiveram sorologia para IgM antiPGL-1 realizada.

A inclusão dos contatos seguiu os seguintes critérios: ser contato de paciente com MH, residir em uma das áreas selecionadas, apresentar exame dermatoneurológico sem sinais clínicos para MH e ter sorologia para IgM antiPGL-1 realizada.

Para avaliação analítica da sorologia foi utilizado como controle indivíduos adultos considerados saudáveis, sem alteração ao exame dermatoneurológico, com presença de cicatriz vacinal BCG, ausência de co-morbidades, e negativo ao exame ELISA (IgM antiPGL-1).

Foram excluídos pacientes e contatos que não residiam em uma das áreas de estudo, bem como pacientes que já estavam em tratamento. Os contatos que ao exame clínico apresentaram sinais e sintomas suspeitos de MH, passaram, a partir de então, a serem considerados como casos de hanseníase.

#### 5.4 Coleta de dados

Os pacientes foram avaliados por equipe médica, como tendo uma das formas clínicas da hanseníase. Após o diagnóstico clínico foram abordados por protocolo de seguimento (ANEXO B), onde confirmaram sua participação na pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C).

Os critérios para o diagnóstico de MH foram: avaliação dermatoneurológica (número de lesões, número de nervos acometidos, grau de incapacidade), baciloscopia, biópsia de pele e teste de Mitsuda. A classificação operacional dos casos seguiu a recomendada pelo OMS (1985) que classifica os doentes como paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB). Para determinação da forma clínica foi levada em consideração a classificação de Ridley-Jopling (1966) que inclui as formas indeterminada (I), tuberculóide (T), dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-virchowiano (DV) e virchowiano-virchowiano (VV). Foi verificado também os estados reacionais nos pacientes que apresentaram reações no diagnóstico, considerando-se reações tipo 1, a reação reversa (RR), e tipo 2, a reação eritema nodoso hansênico (ENH) (RIDLEY, 1969).

Outros dados coletados por meio da aplicação de ficha epidemiológica dos casos consistiram nas variáveis: sexo, idade, localidade, número de contatos, tempo de doença, tratamento anterior, esquema terapêutico, modo de entrada, modo de detecção, provável fonte de infecção e profilaxia BCG. Foi coletado também amostras de sangue para sorologia antiPGL-1 (ELISA e ML-Flow), dosagem de citocinas e quimiocinas.

Os pacientes foram ainda orientados sobre a necessidade do exame de seus contatos. Foram convocados os indivíduos citados pelo paciente que conviviam no mesmo domicílio ou fora dele, mas que mantiveram contato com o mesmo, diariamente ou esporadicamente. O exame dos contactantes consistiu em avaliação clínica dermatoneurológica e teste de Mitsuda, de acordo com protocolo. Foi feita a verificação da cicatriz vacinal pelo BCG. O contato sem cicatriz ou apenas uma cicatriz vacinal pelo BCG, foi encaminhado para vacinação, depois do resultado do teste intradérmico de Mitsuda. Foi coletado sangue periférico para os testes sorológico (ELISA, ML-Flow, citocinas e quimiocinas).

Os dados epidemiológicos dos contatos foram coletados por meio da aplicação de ficha de seguimento (ANEXO B) abordando as variáveis: sexo, idade, localidade, tempo de exposição, classificação operacional do caso índice, forma clínica do caso índice, tipo de contato, grau de parentesco e profilaxia BCG.

## **5.5 Coleta de amostras biológicas**

### **5.5.1 Raspado dérmico**

Foi realizado, para o exame baciloscópico, o raspado dérmico dos casos de MH. O esfregaço dérmico foi obtido de no mínimo 5 locais e no máximo 7 ( lóbulos das 2 orelhas (LD e LE), os 2 cotovelos (CD e CE), 2 joelhos (JD e JE) e 1 lesão ativa (L)), conforme padronizado pelo Ministério da Saúde. Ao selecionar uma região de cada vez, foi feita a antissepsia e com uma pinça kelly curva e bisturi, coletamos o tecido dérmico que em seguida foi depositado em lâmina de vidro. A coloração usada para o *M. leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), foi a de Ziehl-Neelsen.

A baciloscopia foi realizada pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFMA. O resultado registrado foi baseado no número de bacilos vistos em um campo microscópico médio, utilizando-se objetiva de imersão, e expresso em nosso estudo como positivo ou negativo.

### **5.5.2 Biópsia de pele**

A biópsia de lesão de pele foi coletada para classificação histopatológica dos pacientes segundo os critérios de Ridley e Jopling (1966). Foi realizada, previamente, com assepsia da região com álcool iodado, seguida de anestesia local subcutânea de lidocaína a 2%, sem vasoconstrictor. Foi utilizado *punch* de 4mm, obedecendo às linhas de tensão da pele, retirando-se um fragmento com o mesmo diâmetro, atingindo a hipoderme. A sutura foi feita com mononylon 2-0, pontos separados e curativo. As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia do Hospital Universitário da UFMA para o exame histopatológico.

### **5.5.3 Sangue periférico**

A coleta do sangue periférico foi feita por punção da veia braquial, em sistema Vacutainer<sup>®</sup> (*Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EUA*), com antissepsia prévia com álcool 70%. O sangue foi coletado em tubo de 8 mL com gel separador. As amostras foram mantidas refrigeradas e transportadas ao Laboratório de Imunofisiologia da UFMA, para separação do soro, armazenamento a -80° C e realização de ensaios sorológicos.

## 5.6 Teste de Mitsuda

Para o teste de Mitsuda injetou-se, intradermicamente, 0,1 mL de mitsudina humana na superfície de flexão do antebraço direito, 4 cm abaixo da dobra antecubital. O antígeno consistia em uma suspensão de  $6 \times 10^7$  bacilos/mL mortos pelo calor, produzida pelo Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru, SP. A reação intradérmica foi observada após 4 semanas (21 ou 28 dias após a aplicação), considerando como resultado a medida do diâmetro da induração local, registrada em milímetros (mm). Foi considerado clinicamente positivo aquele que apresentasse uma leitura maior que 3 mm.

A reação de Mitsuda foi descrita levando-se em conta os dados relacionados abaixo:

Negativa: nada observado ou sentido;

Flutuante: pápula menor ou igual a 3 mm de diâmetro;

Positivo: pápula maior que 3 mm de diâmetro sem ulceração;

Ulcerado: nódulo de qualquer tamanho, com ulceração.

## 5.7 Testes sorológicos

### 5.7.1 Determinação de IgM antiPGL-1 pelo ML-Flow

O teste sorológico de fluxo lateral foi realizado segundo a metodologia descrita por Bühner-Sékula et al. (2003), que avalia de forma rápida a quantidade circulante de anticorpos IgM contra antígenos de PGL-1. Após a assepsia, foi coletado amostra de aproximadamente 5  $\mu$ L de sangue do dedo indicador com micropipeta. O sangue foi colocado na janela do dispositivo e acrescido de 130  $\mu$ L de reagente de detecção. As leituras foram realizadas após 5 minutos, sendo considerado positivo quando observado a presença de faixas de coloração avermelhada, uma de teste e outra controle.

O dispositivo imunocromatográfico do teste compreende duas membranas de nitrocelulose, uma superior considerada teste e a inferior de controle. A membrana superior contém uma faixa de antígeno semi-sintético de PGL-1 e a inferior uma faixa com anticorpo IgM humano na zona de teste. O reagente de detecção consiste de uma solução tampão contendo partículas móveis de ouro coloidal vermelho, contendo anti-IgM humano, podendo ser armazenado à temperatura ambiente. O reagente de detecção liga-se aos anticorpos IgM da amostra e juntos movem-se através da membrana até a zona de teste. Se o anticorpo da amostra for específico ao *M. leprae*, ele se liga ao antígeno e uma linha vermelha aparece na

zona de teste, além da controle. Se a amostra não contiver anticorpo IgM específico ao *M. leprae*, apenas a linha controle aparece.

### 5.7.2 Determinação de IgM antiPGL-1 por ELISA

O protocolo para o ELISA utilizando o antígeno PGL-1 nativo seguiu o descrito por Young e Buchanan (1983), com algumas modificações. Para titulação dos níveis de anti-PGL-1 foi realizado o método ELISA indireto padronizado pelo Centro de Referência Nacional em Dermatologia e Hanseníase - CREDESH/UFU-MG.

Para a sensibilização, as placas de microtitulação de 96 poços (*NUNC-Intermed*, Dinamarca) foram incubadas por 1 hora com 50 µL da solução contendo 10,0 µg/ml de PGL-1 + álcool etílico absoluto (1:100), a 37° C. Após a evaporação do álcool foram feitas três lavagens com PBS e as placas foram novamente incubadas com 300 µL/poço da solução de bloqueio contendo PBS -BSA 1%. Decorrido o tempo de bloqueio, foram feitas 3 lavagens com PBS. Após esta etapa, seguiu-se a incubação dos soros diluídos em PBS -BSA 1% por duas horas, a 37°C. Novamente os poços foram lavados com PBS e incubados durante 1 hora a 37°C, com anticorpos murino anti-IgM humano com peroxidase (*Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA*), diluídos em 1: 10000. Após novas lavagens com PBS foi adicionado o substrato OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride, *Sigma Aldrich Co. P.O. St. Louis, MO, EUA*). Seguiu-se um tempo de incubação de 20 minutos para que a reação enzimática ocorresse e, então, foi adicionado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N para interromper a reação. A leitura foi feita no leitor de ELISA SpectraMax<sup>®</sup> Plus384 em 492 nm. Os dados obtidos em densidade óptica foram convertidos em Índice ELISA (IE), considerando positivos aqueles com IE igual ou superior a 1,1 (LOBATO et al., 2011).

### 5.7.3 Quantificação de citocinas e quimiocinas

Foi utilizada a técnica de CBA (ensaio citométrico de esferas ordenadas) para a quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, IFN-γ e TGF-β1 e das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10. Todos os reagentes utilizados foram provenientes de *Kits (Human Th1/Th2/Th17 Cytokine kit, Human TGF-β1 Single Plex Flex e Human Chemokine kit)*, adquiridos da Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, EUA). Os procedimentos foram realizados seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

Alíquotas dos soros foram previamente centrifugadas à 200g por 10 min à temperatura ambiente para precipitação de debris. Em tubos de ensaio foram adicionados 25 µL das amostras dos padrões das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN-γ) ou quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) fornecida pelo fabricante, diluídas seriadamente (1:2). Do mesmo modo adicionou-se 25 µL dos soros a serem testados em tubos previamente identificados. Em seguida foram adicionados a cada tubo 25 µL da solução de *beads* de captura para marcar a produção de cada citocina ou quimiocina. Adicionou-se ainda 25 µL de anticorpo conjugado a PE. Os tubos foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 3 horas protegidos da luz. Após a incubação as amostras foram ressuspenas com 200 µL de solução tampão e centrifugadas a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as amostras foram então ressuspenas em 180 µL de solução tampão antes de sua aquisição.

A quantificação de TGF-β1 foi realizada acidificando previamente o soro a pH 3,0 e neutralizando a pH 7,2 - 7,6 antes dos testes, com objetivo de ativar TGF-β1 latente, conforme recomendações do fabricante. Em tubos de ensaio foi adicionado 25 µL da amostra padrão fornecida pelo fabricante, diluída seriadamente (1:2) ou do soro a ser testado. Em seguida foram adicionados a cada tubo 25 µL da solução de *beads* de captura para marcar a produção de TGF-β1. Os tubos foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente por 2 horas. Após a incubação os tubos foram lavados com 200 µL solução tampão e centrifugados a 200g por 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, adicionou-se 25 µL de anticorpo conjugado a PE em cada tubo. Os tubos foram novamente incubados à temperatura ambiente por 2 horas protegidos da luz. Após o período de incubação procedeu-se nova lavagem e centrifugação, descartando cuidadosamente o sobrenadante. As amostras foram então ressuspenas em 180 µL de solução tampão para posterior aquisição.

A aquisição foi feita em citômetro de fluxo FACScalibur (*Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA*). A calibração do citômetro foi realizada utilizando 3 amostras de referência (*setup beads*), incubadas previamente com FITC ou PE ou ainda sem nenhum reagente revelador, conforme as recomendações do *kit* do fabricante. Após a leitura dos padrões e das amostras os dados foram analisados no *software* FCAP Array™ versão 3.0 (*Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA*), onde os valores foram obtidos por regressão linear múltipla com 5 parâmetros logísticos e expressos em pg/mL.

## 5.8 Análise dos dados e tratamento estatístico

Os dados coletados foram tabulados e codificados em uma base de dados relativos aos casos índices e contactantes, utilizando-se o sistema de processamento de planilhas Microsoft Excel<sup>®</sup> versão 2007 (Microsoft Co., Redmond, WA, EUA). O software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para realização dos testes estatísticos.

Na descrição das características clínicas e epidemiológicas as variáveis foram expressas em frequências absolutas e relativas, assim como em parâmetros estatísticos descritivos de média e desvio-padrão. A associação entre as variáveis foi verificada empregando-se o teste Exato de Fisher, de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) ou ainda Qui-Quadrado com correção de Yates, conforme o número de amostras analisadas, respeitando-se o grau de liberdade de cada variável. Para análise comparativa do testes ELISA e ML-Flow foi empregado o teste de concordância *Kappa*, para expressar a confiabilidade dos testes.

Para a dosagem de citocinas e quimiocinas foi obtida uma amostra não-probabilística, não-aleatória, escolhidas a partir da classificação operacional. Os dados quantitativos gerados foram avaliadas em relação às condições de normalidade, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e D'Agostino & Pearson, antes de serem selecionados os testes para comparação dos grupos. As variáveis foram então expressas como média, desvio padrão ou mediana e erro padrão. Os grupos com distribuição normal foram comparados por ANOVA seguido do teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para determinação de correlação entre as variáveis quantitativas, foram utilizadas a correlação de Pearson ou Spearman.

Na interpretação destes testes estatísticos, foi considerada diferença significativa quando a probabilidade (p) do erro tipo I for  $< 0,05$  ( $< 5\%$ ).

## **6 RESULTADOS**

Durante a execução do trabalho foram registrados 517 pacientes com MH e 2741 contatos. Foram incluídos nesse estudo 2666 indivíduos, correspondendo a 503 casos e 2163 contatos, com uma média de 4,3 (amplitude=10,0) contatos por caso índice. A maioria das variáveis estudadas não apresentaram completude de registro, portanto, diferem no número total de observações. Inicialmente é demonstrada a análise descritiva e exploratória dos dados, onde foram calculadas as frequências das variáveis sociodemográficas e clínicas de casos e contatos. Em seguida é demonstrado os resultados da análise bivariada do perfil epidemiológico de acordo com a classificação operacional dos casos. E finalmente os resultados da relação das características imunológicas segundo as variáveis estudadas.

### **6.1 Aspectos clínico-epidemiológicos**

As características clínicas e sociodemográficas gerais são apresentadas nas tabelas a seguir:

A tabela 3 descreve as características sociodemográficas de casos e contatos de pacientes com MH. Nesta tabela observou-se que mais da metade dos casos era do gênero masculino (53,19%) e constituído em sua maioria por jovens e adultos acima dos 15 anos de idade (88,89%). Metade deles (50,3%) tinha como procedência o município de Imperatriz. Geralmente possuíam mais do que 3 contatos (46,22%). Entre os contatos, no entanto, a maioria era do gênero feminino (59,83%), com predominância de jovens e adultos acima dos 15 anos de idade (67,02%), oriundos, em sua maioria, do município de Imperatriz (45,12%).

**Tabela 3** - Características sociodemográficas dos casos e contatos de pacientes com MH.

Variável	Casos			Contatos		
	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>
<b>Sexo</b>			n=502			n=2161
Masculino	267	53,08	53,19	868	40,13	40,17
Feminino	235	46,72	46,81	1293	59,78	59,83
Ignorado	1	0,20	-	2	0,09	-
<b>Idade (anos)</b>			n=477			n=1977
< 15	53	10,54	11,11	652	30,14	32,98
15 - 30	121	24,06	25,37	587	27,14	29,69
≥ 30	303	60,24	63,52	738	34,12	37,33
Ignorado	26	5,17	-	186	8,60	-
<b>Localidade</b>			n=503			n=2163
Açailândia	83	16,50	16,50	495	22,88	22,88
Imperatriz	253	50,30	50,30	976	45,12	45,12
São Luís	167	33,20	33,20	692	31,99	31,99
Ignorado	0	0,00	-	0	0,00	-
<b>Número de contatos</b>			n=106			
≤ 1	15	2,98	14,15	-	-	-
1 -  3	42	8,35	39,62	-	-	-
> 3	49	9,74	46,22	-	-	-
Ignorado	397	78,93	-			
<b>Total</b>	503	100,00	100,00	2163	100,00	100,00

<sup>1</sup> percentual em relação ao número total de dados coletados.

<sup>2</sup> percentual em relação ao número de dados após a exclusão das informações ignoradas e não registradas no prontuário.

Na tabela 4 podemos constatar que a maioria dos pacientes estava doente há um ano ou menos tempo (57,67%). A classificação operacional predominante foi a paucibacilar (65,5%), sendo ainda detectados 6,2% de casos na forma clínica VV, forma mais grave da doença. Cerca de 10,33% foram classificados na forma inicial da hanseníase (MHI). O esquema terapêutico mais empregado foi o de 6 doses para os casos paucibacilares (64,32%).

Aproximadamente 95% eram casos novos e 6,28% foram diagnosticados através do exame de contatos. A demanda espontânea foi o modo de detecção mais frequente (46,07%). A incapacidade física foi observada em 35,51% dos pacientes examinados. Destes, 9,04% já apresentavam deformidades em Grau II. Observou-se que metade deles (50,43%) nunca havia sido vacinado com BCG. E em relação à baciloscopia, 80,23% foram negativas, porém somente 17,10% tiveram a baciloscopia realizada.

Quando analisamos as perdas de dados, observamos que a baciloscopia possuía o maior percentual de informações ignoradas (82,90%), seguido do número de contatos (78,93%) e tempo de doença (62,43%)

**Tabela 4 - Características clínicas dos casos de MH.**

Variável	Casos		
	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>
<b>Tempo de Doença (anos)</b>			n=189
≤ 1	109	21,67	57,67
1 -  3	49	9,74	25,90
> 3	31	6,16	16,39
Ignorado	314	62,43	-
<b>Classificação Operacional</b>			n=487
Paucibacilar	319	63,42	65,50
Multibacilar	168	33,40	34,50
Ignorado	16	3,18	-
<b>Forma Clínica</b>			n=484
Indeterminado	50	9,94	10,33
Tuberculóide	134	26,64	27,69
Dimorfo-tuberculóide	129	25,65	26,65
Dimorfo-dimorfo	102	20,28	21,07
Dimorfo-virchowiano	39	7,75	8,06
Virchowiano-virchowiano	30	5,96	6,20
Ignorado	19	3,78	-
<b>Esquema Terapêutico</b>			n=426
PQT/PB 6 doses	274	54,47	64,32
PQT/MB 12 doses	139	27,64	32,63
PQT/MB 24 doses	13	2,58	3,05
Ignorado	77	15,31	-
<b>Modo de Entrada</b>			n=392
Caso novo	370	73,56	94,39
Transferência	1	0,20	0,26
Recidiva	9	1,79	2,30
Outros	12	2,39	3,06
Ignorado	111	22,07	-
<b>Modo de Detecção</b>			n=382
Encaminhamento	172	34,19	45,03
Demanda espontânea	176	34,99	46,07
Exame de coletividade	3	0,60	0,79
Exame de contatos	24	4,77	6,28
Outros	7	1,39	1,83
Ignorado	121	24,06	-
<b>Grau de Incapacidade</b>			n=321
Grau 0	207	41,15	64,49
Grau I	85	16,90	26,47
Grau II	29	5,77	9,04
Ignorado	182	36,18	-
<b>Profilaxia BCG</b>			n=462
0	233	46,32	50,43
1	201	39,96	43,51
2	28	5,57	6,06
Ignorado	41	8,15	-
<b>Baciloscopia</b>			n=86
Negativo	69	13,72	80,23
Positivo	17	3,38	19,77
Ignorado	417	82,90	-
<b>Total</b>	<b>503</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>

<sup>1</sup> percentual em relação ao número total de dados coletados.

<sup>2</sup> percentual em relação ao número de dados após a exclusão das informações ignoradas e não registradas no prontuário.

A tabela 5 descreve as características clínico-epidemiológicas dos contatos. A maioria mantinha contato com um caso de MH  $\geq 3$  anos (70,06%). Aproximadamente 3% dos contatos já haviam sido tratados anteriormente da doença, persistindo a mesma, em um caso na família. Cerca de 56% estava convivendo com pacientes multibacilares, principalmente da forma clínica DD (37,81%). A média de contatos entre os multibacilares foi de 6,64, maior que a dos paucibacilares a qual foi de 2,75.

Contatos intradomiciliares foram os mais frequentes (84,33%), e destes 13,4% mantinham contato íntimo. O grau de parentesco mais comum foi o de 1º grau (54,77%). Mais da metade havia sido vacinado ao menos uma vez com BCG (59,23%), e 19% não possuía nenhuma cicatriz vacinal. Ao exame dermatoneurológico 3,21% dos contatos apresentaram alguma alteração.

Quando analisamos a falta de completude dos dados observamos que o tempo de exposição possuía o maior percentual de informações ignoradas (67,28%), seguido do tratamento anterior (30,33%) e exame dermatoneurológico (22,28%).



**Tabela 6** - Características sociodemográficas de casos e contatos segundo a classificação operacional dos casos de MH.

Variável	PB			MB			cPB			cMB		
	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>
<b>Sexo</b>												
Masculino	147	46,08	46,08	111	66,07	66,07	362	41,28	41,28	438	39,28	39,28
Feminino	172	53,92	53,92	57	33,93	33,93	515	58,72	58,72	677	60,72	60,72
Ignorado	0	0,00	-	0	0,00	-	0	0,00	-	0	0,00	-
<b>Idade (anos)</b>												
< 15	40	12,54	12,78	13	7,74	8,02	286	32,61	33,37	355	31,84	33,02
15 - 30	78	24,45	24,92	42	25,00	25,93	252	28,73	29,40	321	28,79	29,86
≥ 30	195	61,13	62,30	107	63,69	66,05	319	36,38	37,22	399	35,78	37,12
Ignorado	6	1,88	-	6	3,57	-	20	2,28	-	40	3,59	-
<b>Localidade</b>												
Açailândia	54	16,93	16,93	25	14,88	14,88	150	17,10	17,10	341	30,58	30,58
Imperatriz	156	48,90	48,90	90	53,57	53,57	445	50,74	50,74	512	45,92	45,92
São Luís	109	34,17	34,17	53	31,55	31,55	282	32,16	32,16	262	23,50	23,50
Ignorado	0	0,00	-	0	0,00	-	0	0,00	-	0	0,00	-
<b>Total</b>	<b>319</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>168</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>877</b>	<b>100,0</b>	<b>100,00</b>	<b>1115</b>	<b>100,0</b>	<b>100,00</b>

PB= paucibacilar; MB= multibacilar; cPB= contato de paucibacilar; cMB= contato de multibacilar.

<sup>1</sup> percentual em relação ao número total de dados coletados.

<sup>2</sup> percentual em relação ao número de dados após a exclusão das informações ignoradas e não registradas no prontuário.

Pudemos constatar que 3% dos PB e 8% dos MB já haviam feito tratamento para MH anteriormente. A forma clínica tuberculóide foi predominante entre os PB (41,96%) e a dimorfo-dimorfo nos MB (41,32%). O esquema terapêutico mais empregado foi o de 6 doses para os PB (93,84%) e 12 doses para os MB (90,30%).

Aproximadamente 95% dos PB eram de casos novos, sendo 8% detectados a partir do exame de contatos. Entre os MB, o número de casos novos foi de 92%, tendo apenas 2% dos casos detectados a partir do exame de contatos. A demanda espontânea e o encaminhamento foram os modos de detecção mais frequente. A incapacidade física foi mais frequente nos MB, chegando a apresentar 14% dos indivíduos com incapacidade grau II. Em relação à vacinação por BCG, observou-se que 51,97% dos PB haviam sido vacinados, enquanto 54,48% dos MB não apresentavam nenhuma cicatriz vacinal (Tabela 7).

**Tabela 7** - Caracterização clínica dos casos de MH segundo a classificação operacional.

Variável	PB			MB		
	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>
<b>Tempo de Doença (anos)</b>						
≤ 1	68	21,32	55,29	40	23,81	62,50
1 -  3	34	10,66	27,64	15	8,93	23,44
> 3	21	6,58	17,07	9	5,36	14,06
Ignorado	196	61,44	-	104	61,90	-
<b>Forma Clínica</b>						
Indeterminado	49	15,36	15,46	1	0,59	0,60
Tuberculóide	133	41,69	41,96	1	0,59	0,60
Dimorfo-tuberculóide	96	30,09	30,28	33	19,65	19,76
Dimorfo-dimorfo	33	10,35	10,41	69	41,08	41,32
Dimorfo-virchowiano	2	0,63	0,63	37	22,02	22,16
Virchowiano-virchowiano	4	1,25	1,26	26	15,48	15,57
Ignorado	2	0,63	-	1	0,59	-
<b>Esquema Terapêutico</b>						
PQT/PB 6 doses	274	85,90	93,84	0	0,00	0,00
PQT/MB 12 doses	18	5,64	6,16	121	72,02	90,30
PQT/MB 24 doses	0	0,00	0,00	13	7,74	9,70
Ignorado	27	8,46	-	34	20,24	-
<b>Modo de Entrada</b>						
Caso novo	240	75,24	95,24	128	76,19	92,75
Transferência	1	0,31	0,40	0	0,00	0,00
Recidiva	5	1,57	1,98	4	2,38	2,90
Outros	6	1,88	2,38	6	2,57	4,35
Ignorado	67	21,00	-	30	17,86	-
<b>Modo de Detecção</b>						
Encaminhamento	108	33,86	44,26	62	36,90	45,59
Demanda espontânea	108	33,86	44,26	68	40,48	50,00
Exame de coletividade	2	0,63	0,82	1	0,59	0,74
Exame de contatos	21	6,58	8,61	3	1,79	2,21
Outros	5	1,56	2,05	2	1,19	1,47
Ignorado	75	23,51	-	32	19,05	-
<b>Grau de Incapacidade</b>						
Grau 0	154	48,28	74,76	53	31,55	46,49
Grau I	39	12,23	18,93	45	26,79	39,47
Grau II	13	4,07	6,31	16	9,52	14,04
Ignorado	113	35,42	-	54	32,14	-
<b>Profilaxia BCG</b>						
0	146	45,77	48,03	86	51,19	54,78
1	134	42,01	44,08	67	39,88	42,68
2	24	7,52	7,89	4	2,38	2,55
Ignorado	15	4,70	-	11	6,55	-
<b>Bacilosopia</b>						
Negativo	49	15,36	98,00	20	11,90	57,14
Positivo	1	0,31	2,00	15	8,93	42,86
Ignorado	269	84,33	-	133	79,17	-
<b>Total</b>	319	100,00		168	100,00	

<sup>1</sup> percentual em relação ao número total de dados coletados.

<sup>2</sup> percentual em relação ao número de dados após a exclusão das informações ignoradas e não registradas no prontuário.

As características clínicas dos contatos de PB e MB são semelhantes entre si. Cerca de 3% dos contatos de MB já haviam feito tratamento anteriormente. Como esperado, a maioria dos contatos de PB eram de casos com a forma clínica tuberculóide (46,80%), e os contatos de MB da forma clínica dimorfo-dimorfo (67,23%). A convivência intradomiciliar e o grau de parentesco de 1º grau foram os mais frequentes em ambos os grupos. A maioria possuía uma cicatriz vacinal ao BCG e nenhuma alteração ao exame dermatoneurológico (Tabela 8).

**Tabela 8 - Caracterização clínica dos contatos segundo a classificação operacional dos casos de MH.**

Variável	cPB			cMB		
	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>
<b>Tratamento anterior</b>						
Não	622	70,92	97,34	826	74,08	96,83
Sim	17	1,94	2,66	27	2,42	3,17
Ignorado	238	27,14	-	262	23,50	-
<b>Forma Clínica</b>						
Indeterminado	144	16,42	17,06	0	0,00	0,00
Tuberculóide	395	45,04	46,80	1	0,09	0,11
Dimorfo-tuberculóide	247	28,16	29,27	53	4,75	5,58
Dimorfo-dimorfo	40	4,56	4,74	638	57,22	67,23
Dimorfo-virchowiano	4	0,46	0,47	91	8,16	9,59
Virchowiano-virchowiano	14	1,60	1,66	166	14,89	17,49
Ignorado	33	3,76	-	166	14,89	-
<b>Tipo de contato</b>						
Intradomiciliar	598	68,19	70,52	751	67,35	70,92
Intradomiciliar-íntimo	133	15,17	15,68	127	11,39	11,99
Extradomiciliar	1	0,11	0,12	1	0,09	0,09
Extradomiciliar-íntimo	88	10,03	10,38	102	9,15	9,63
Ocupacional	28	3,19	3,30	78	6,70	7,37
Ignorado	29	3,31	-	56	5,02	-
<b>Grau de parentesco</b>						
1º grau	425	48,46	59,86	499	44,75	51,28
2º grau	125	14,25	17,61	210	18,83	21,58
Cônjuge	104	11,86	14,65	164	14,71	16,86
Outros	56	6,39	7,89	100	8,97	10,28
Ignorado	167	19,04	-	142	12,74	-
<b>Profilaxia BCG</b>						
0	176	20,07	20,88	205	18,39	18,93
1	510	58,15	60,50	627	56,23	57,89
2	157	17,90	18,62	251	22,51	23,18
Ignorado	34	3,88	-	32	2,87	-
<b>Exame dermatoneurológico</b>						
Sem alteração	677	77,19	97,83	917	82,24	95,92
Com alteração	15	1,71	2,17	39	3,50	4,08
Ignorado	185	21,10	-	159	14,26	-
<b>Total</b>	<b>877</b>	<b>100,00</b>		<b>1115</b>	<b>100,00</b>	

<sup>1</sup> percentual em relação ao número total de dados coletados.

<sup>2</sup> percentual em relação ao número de dados após a exclusão das informações ignoradas e não registradas no prontuário.

### 6.3 Caracterização clínico-imunológica

A caracterização imunológica foi baseada na resposta dos indivíduos ao PGL-1 e teste de Mitsuda, além do perfil sorológico de citocinas e quimiocinas. A tabela 9 mostra o resultado do ELISA antiPGL-1, ML-Flow antiPGL-1 e Mitsuda para a caracterização clínica de casos e contatos.

No teste cutâneo Mitsuda, 51% dos casos apresentaram uma responsividade considerada negativa ao antígeno. Em relação aos testes sorológicos ML-Flow e ELISA para detecção de IgM antiPGL-1, as frequências de casos positivos foram de 42,61% e 36,85%, respectivamente.

Nos contatos, 60% apresentaram uma resposta considerada positiva ao teste cutâneo Mitsuda, sendo o mesmo realizado somente em 211 contatos. Em relação aos testes sorológicos ML-Flow e ELISA os contatos apresentaram semelhante percentual de positividade, de 12,08 e 12,52%, respectivamente.

A seguir é apresentado o resultado da análise bivariada, avaliando a associação entre o ELISA antiPGL-1 e ML-Flow antiPGL-1 em relação às variáveis clínico-epidemiológicas. Como o teste Mitsuda apresentou um grande percentual de perdas de dados, o mesmo não foi considerado nas análises seguintes.

**Tabela 9** - Resultado geral dos testes imunológicos para a confirmação do diagnóstico em casos e contatos.

	Casos			Contatos		
	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>	N	% total <sup>1</sup>	% válido <sup>2</sup>
<b>Mitsuda</b>			n=66			n=244
Negativo	24	4,77	51,06	55	2,54	30,22
Positivo	22	4,37	46,81	110	5,09	60,44
Flutuante	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00
Ulcerado	1	0,20	2,13	17	0,79	9,34
Perdeu leitura	9	1,79	-	29	1,34	-
Uso de corticóide	3	0,60	-	0	0,00	-
Não fez	7	1,39	-	33	1,53	-
Ignorado	437	86,88	-	1919	88,72	-
<b>ML-Flow</b>			n=176			n=745
Negativo	101	20,08	57,39	655	30,28	87,92
Positivo	75	14,91	42,61	90	4,16	12,08
Ignorado	327	65,01	-	1418	65,56	-
<b>ELISA</b>			n=502			n=2140
Negativo	317	63,02	63,15	1872	86,55	87,48
Positivo	185	36,78	36,85	268	12,39	12,52
Inconclusivo	1	0,20	-	23	1,06	-
Ignorado	0	0,00	-	0	0,00	-
<b>Total</b>	503	100	100	2163	100,00	100,00

<sup>1</sup> percentual em relação ao número total de dados coletados.

<sup>2</sup> percentual em relação ao número de dados após a exclusão das informações ignoradas e não registradas no prontuário.

### 6.3.1 Relação do ELISA antiPGL-1 com as variáveis do estudo

O esquema terapêutico não foi incluído nessa abordagem, seu estudo justificar-se-ia na análise da evolução do paciente durante e após o término da poliquimioterapia, fato que não foi reportado nesse estudo, pois focalizou o paciente apenas no momento do diagnóstico.

Houve maior número de casos positivos em pacientes do gênero masculino ( $p=0,045$ ). A positividade também foi maior em indivíduos acima dos 15 anos ( $p=0,045$ ). Em relação à localidade, pacientes procedentes da cidade de Imperatriz foi os que tiveram maior frequência de positividade ao exame ( $p=0,024$ ). O resultado do exame ELISA não está associado à quantidade de contatos ( $p=0,307$ ). Já nos contatos houve maior número de casos positivos em pacientes do gênero feminino ( $p=0,010$ ), jovens e adultos apresentaram positividade semelhante aos menores de 15 anos ( $p=0,054$ ). Não houve diferença do resultado do ELISA em relação à localidade de procedência ( $p=0,154$ ), (Tabela 10).

**Tabela 10** - Associação do ELISA antiPGL-1 às características sociodemográficas de casos e contatos de MH.

ELISA Variável	Casos						Contatos					
	Negativo		Positivo		$\chi^2$	P-valor	Negativo		Positivo		$\chi^2$	P-valor
N	%	N	%	N			%	N	%			
<b>Sexo</b>												
Masculino	157	59,02	109	40,98	3,99	0,045	775	89,70	89	10,30	6,60	0,010
Feminino	159	67,66	76	32,34			1095	85,95	179	14,05		
<b>Idade (anos)</b>												
< 15	41	78,85	11	21,15	6,19	0,045	550	85,67	92	14,33	5,82	0,054
15 - 30	73	60,33	48	39,67			507	87,26	74	12,74		
≥ 30	187	61,72	116	38,28			658	89,89	74	10,11		
<b>Localidade</b>												
Açailândia	62	74,70	21	25,30	7,43	0,024	430	89,58	50	10,42	3,74	0,154
Imperatriz	147	58,33	105	41,67			850	87,63	120	12,37		
São Luís	108	64,67	59	35,33			592	85,80	98	14,20		
<b>Número de contatos</b>												
≤ 1	13	86,67	2	13,33	2,36	0,307	-	-	-	-	-	-
1 -  3	28	66,67	14	33,33			-	-	-	-		
> 3	33	67,35	16	32,65			-	-	-	-		

No que se refere ao tempo de doença não houve associação com o resultado do ELISA ( $p=0,188$ ), assim como, o modo de entrada do paciente ( $p=0,678$ ). A positividade, no entanto, ficou bem evidenciada em relação à classificação operacional, sendo maior em pacientes multibacilares ( $p<0,001$ ), e aumentou tendenciosamente de acordo com a gravidade da forma clínica, mostrando uma associação significativa ( $p<0,001$ ). Observou-se que o resultado do ELISA parece estar associado a pacientes com algum grau de incapacidade

( $p=0,003$ ). Pacientes com duas cicatrizes vacinais para o BCG apresentaram taxa de positividade ao ELISA menor do que em pacientes com apenas um cicatriz ou sem nenhuma ( $p=0,050$ ). Quando foi avaliada a baciloscopia, observou-se que o ELISA está fortemente associada aos casos positivos no exame baciloscópico ( $p<0,001$ ). Tais dados são mostrados na Tabela 11.

**Tabela 11** - Associação do ELISA antiPGL-1 às características clínicas dos casos.

ELISA Variável	Negativo		Positivo		$\chi^2$	p-valor
	N	%	N	%		
<b>Tempo de Doença (anos) n=189</b>						
≤ 1	69	63,30	40	36,70	1,73	0,188
1 -  3	35	71,43	14	28,57		
> 3	23	74,19	8	25,81		
<b>Classificação Operacional n=486</b>						
Paucibacilar	245	76,80	74	23,20	72,12	<0,001
Multibacilar	63	37,72	104	62,28		
<b>Forma Clínica n=483</b>						
Indeterminado	48	96,00	2	4,00	132,3	<0,001
Tuberculóide	117	87,31	17	12,69		
Dimorfo-tuberculóide	77	60,16	51	39,84		
Dimorfo-dimorfo	55	53,92	47	46,08		
Dimorfo-virchowiano	7	17,95	32	82,05		
Virchowiano-virchowiano	3	10,00	27	90,00		
<b>Modo de Entrada n=378</b>						
Caso novo	230	62,33	139	37,67	0,17	0,678
Recidiva	5	55,56	4	44,44		
<b>Grau de Incapacidade n=321</b>						
Grau 0	145	70,05	62	29,95	11,93	0,003
Grau I	42	49,41	43	50,59		
Grau II	16	55,17	13	44,83		
<b>Profilaxia BCG n=461</b>						
0	145	62,50	87	37,50	5,961	0,050
1	128	63,68	73	36,32		
2	24	85,71	4	14,29		
<b>Baciloscopia n=86</b>						
Negativo	48	100,00	0	0,00	26,76	<0,001
Positivo	21	55,26	17	44,74		

Em relação ao tempo de exposição dos contatos aos doentes parece não estar associado ao ELISA ( $p=0,739$ ). A positividade foi semelhante entre os contatos de casos índices paucibacilar e multibacilar permanecendo em torno de 13% ( $p=0,094$ ). Também não foi observado associação quando separamos os contatos em relação à forma clínica dos seus respectivos casos índices ( $p=0,101$ ), não houve diferença entre os tipos de contatos ( $p=0,108$ ). A positividade do exame parece também não estar relacionada ao grau de parentesco ( $p=0,328$ ). Contatos sem nenhuma cicatriz vacinal apresentaram resultados semelhantes aos

que tem uma ou duas cicatrizes ( $p=0,169$ ). E ainda, não houve diferença em relação ao exame dermatoneurológico ( $p=0,199$ ). Os dados são mostrados na Tabela 12.

**Tabela 12** - Associação do ELISA antiPGL-1 às características clínico-epidemiológicas dos contatos.

ELISA Variável	Negativo		Positivo		$\chi^2$	p-valor
	N	%	N	%		
<b>Tempo de exposição (anos) n=694</b>						
≤ 1	110	90,91	11	9,09	0,60	0,739
1 -  3	78	87,64	11	12,36		
> 3	431	89,05	53	10,95		
<b>Tratamento anterior n=1488</b>					0,96	0,326
Não	1280	88,58	165	11,42		
Sim	36	83,72	7	16,28		
<b>Classificação Operacional do caso índice n=1969</b>					2,14	0,143
Paucibacilar	751	86,12	121	13,88		
Multibacilar	969	88,33	128	11,67		
<b>Forma Clínica do caso índice n=1770</b>					9,01	0,108
Indeterminado	128	88,89	16	11,11		
Tuberculóide	331	84,65	60	15,35		
Dimorfo-tuberculóide	254	84,67	46	15,33		
Dimorfo-dimorfo	590	88,72	75	11,28		
Dimorfo-virchowiano	80	85,11	14	14,89		
Virchowiano-virchowiano	161	91,48	15	8,52		
<b>Tipo de contato n=1921</b>					7,59	0,108
Intradomiciliar	1182	86,78	180	13,22		
Intradomiciliar-íntimo	233	89,62	27	10,38		
Extradomiciliar	162	84,38	30	15,63		
Extradomiciliar-íntimo	98	94,23	6	5,77		
<b>Grau de parentesco n=1700</b>					3,44	0,328
1º grau	821	88,00	112	12,00		
2º grau	293	86,69	45	13,31		
Cônjuge	248	91,18	24	8,82		
Outros	136	86,62	21	13,38		
<b>Profilaxia BCG n=1944</b>					3,54	0,169
0	337	88,92	42	11,08		
1	1008	87,12	149	12,88		
2	259	84,09	49	15,91		
<b>Exame dermatoneurológico n=1660</b>					1,64	0,199
Sem alteração	1423	97,07	43	2,93		
Com alteração	185	95,36	9	4,64		

### 6.3.2 Relação do ML-Flow antiPGL-1 com as variáveis do estudo.

Do mesmo modo analisamos a associação dos resultados do ML-Flow antiPGL-1 às variáveis estudadas. A tabela 13 mostra as características sociodemográficas e sua associação ao ML-Flow. O maior número de casos positivos foi observado em pacientes do gênero masculino ( $p=0,012$ ). No entanto, foi semelhante em pacientes adultos e em menores de 15 anos ( $p=0,862$ ). Tal como ocorreu no exame ELISA a cidade de Imperatriz foi a que apresentou maior número de casos positivos ( $p=0,003$ ). Não foi observada associação em relação à quantidade de contatos ( $p=0,117$ ), (Tabela 13).

**Tabela 13** - Associação do ML-Flow antiPGL-1 às características sociodemográficas de casos e contatos com MH.

ML-Flow Variável	Casos				$\chi^2$	P- valor	Contatos				$\chi^2$	P- valor
	Negativo		Positivo				Negativo		Positivo			
	N	%	N	%			N	%	N	%		
<b>Sexo</b>												
Masculino	44	48,35	47	51,65	6,29	0,012	249	89,89	28	10,11	2,82	0,093
Feminino	57	67,06	28	32,94			406	86,75	68	13,25		
<b>Idade (anos)</b>												
< 15	15	62,50	9	37,50	0,29	0,862	184	86,38	29	13,62	0,83	0,661
15 - 30	30	56,60	23	43,40			199	88,84	25	11,16		
≥ 30	56	56,57	43	43,43			260	88,74	33	11,26		
<b>Localidade</b>												
Açailândia	27	84,38	5	15,63	11,93	0,003	38	57,58	28	42,42	67,75	<0,001
Imperatriz	51	50,00	51	50,00			511	89,65	59	10,35		
São Luís	23	54,76	19	45,24			106	97,25	3	2,75		
<b>Número de contatos</b>												
≤ 1	1	33,33	2	66,67	1,47 <sup>†</sup>	0,117	-	-	-	-	-	-
1 -  3	5	71,43	2	28,57			-	-	-	-		
> 3	11	91,67	1	8,33			-	-	-	-		

<sup>†</sup>Teste exato de Fisher

Nos contatos foi observado associação apenas em relação à localidade, onde Açailândia foi o município que apresentou maior percentual de contatos positivos ( $p < 0,001$ ), fato que não ocorreu nos ensaios por ELISA.

O resultado do ML-Flow parece estar associado ao tempo de doença. Observou-se que os casos positivos aumentaram de acordo com o tempo ( $p = 0,035$ ). Não observou-se diferença de resultado entre os pacientes que já haviam sido tratados anteriormente e os que não o fizeram ( $p = 0,417$ ), (Tabela 14).

No que se refere à classificação operacional pacientes multibacilar tiveram maior positividade ao exame ( $p < 0,001$ ), e esta associação se repetiu em relação à forma clínica, cujos pacientes com a forma mais grave tiveram maior percentual de positividade ( $p < 0,001$ ). Ao serem comparados com os resultados do ELISA, observou-se que pacientes paucibacilares tiveram maior percentual de casos positivos no ML-Flow, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,212$ ).

O resultado do ML-Flow não está associado ao modo de entrada ( $p = 0,669$ ). Ao ser considerado o número de lesões observou-se maior frequência de casos positivos em quem possuía mais de cinco lesões ( $p < 0,001$ ). Não foi encontrado diferenças em relação ao número de nervos acometidos ( $p = 0,906$ ), entretanto o ML-Flow parece estar associado ao grau de incapacidade ( $p = 0,012$ ), de modo semelhante aos testes por ELISA.

Quanto ao número de vacinas BCG, não foi observado associação ( $p = 0,696$ ). Já em relação ao exame baciloscópico observou-se uma associação significativa. Somente os

pacientes com baciloscopia positiva tiveram resultado positivo ao ML-Flow ( $p=0,004$ ). Os resultados são mostrados na tabela 14.

**Tabela 14** - Associação do ML-Flow antiPGL-1 às características clínicas dos casos.

ML-Flow Variável	Negativo		Positivo		$\chi^2$	p-valor
	N	%	N	%		
<b>Tempo de Doença (anos) n=70</b>						
≤ 1	30	75,00	10	25,00	4,42	0,035
1 -  3	12	54,54	10	45,46		
> 3	5	45,46	6	54,54		
<b>Classificação Operacional n=175</b>						
Paucibacilar	78	71,56	31	28,44	24,53	<0,001
Multibacilar	22	33,33	44	66,67		
<b>Forma Clínica n=175</b>						
Indeterminado	22	88,00	3	12,00	39,14	<0,001
Tuberculóide	33	76,74	10	23,26		
Dimorfo-tuberculóide	22	44,00	28	56,00		
Dimorfo-dimorfo	18	56,25	14	43,75		
Dimorfo-virchowiano	2	16,67	10	83,33		
Virchowiano-virchowiano	3	23,08	10	76,92		
<b>Modo de Entrada n=170</b>						
Caso novo	95	57,93	69	42,07	0,18	0,669
Recidiva	4	66,67	2	33,33		
<b>Grau de Incapacidade n=152</b>						
Grau 0	63	63,00	37	37,00	8,72	0,012
Grau I	14	35,90	25	64,10		
Grau II	6	46,15	7	53,85		
<b>Profilaxia BCG n=169</b>						
0	53	55,21	43	44,79	0,72	0,696
1	38	61,29	24	38,71		
2	7	63,64	4	36,36		
<b>Baciloscopia n=45</b>						
Negativo	20	100,00	0	0,00	8,10 <sup>†</sup>	0,004
Positivo	15	60,00	10	40,00		

<sup>†</sup> Qui-quadrado com correção de Yates

Contatos com mais de 3 anos de exposição aos doentes apresentaram maior positividade ao exame ( $p<0,001$ ). As demais variáveis não mostraram nenhuma associação ao ML-Flow antiPGL-1 (Tabela 15).

**Tabela 15** - Associação do ML-Flow antiPGL-1 às características clínico-epidemiológicas dos contatos.

Variável	Negativo		Positivo		$\chi^2$	p-valor
	N	%	N	%		
<b>Tempo de exposição (anos) n=150</b>						
≤ 1	54	100,00	0	0,00	28,75	<0,001
1 -  3	26	96,30	1	3,70		
> 3	46	66,67	23	33,33		
<b>Tratamento anterior n=622</b>						
Não	519	86,36	82	13,64	0,49	0,481
Sim	17	80,95	4	19,05		
<b>Classificação Operacional do caso índice n=724</b>						
Paucibacilar	288	87,01	43	12,99	0,28	0,600
Multibacilar	347	88,30	46	11,70		
<b>Forma Clínica do caso índice n=618</b>						
Indeterminado	72	80,90	17	19,10	6,62	0,250
Tuberculóide	91	87,50	13	12,50		
Dimorfo-tuberculóide	111	87,40	16	12,60		
Dimorfo-dimorfo	161	84,74	29	15,26		
Dimorfo-virchowiano	43	91,49	4	8,51		
Virchowiano-virchowiano	57	93,44	4	6,56		
<b>Tipo de contato n=714</b>						
Intradomiciliar	486	88,04	66	11,96	0,93	0,836
Intradomiciliar-íntimo	81	90,00	9	10,00		
Extradomiciliar	45	84,91	8	15,09		
Extradomiciliar-íntimo	16	88,89	2	11,11		
<b>Grau de parentesco n=735</b>						
1º grau	367	88,86	46	11,14	1,54	0,672
2º grau	115	87,12	17	12,88		
Cônjuge	108	88,52	14	11,48		
Outros	57	83,82	11	16,18		
<b>Profilaxia BCG n=725</b>						
0	131	87,92	18	12,08	0,01	0,993
1	365	87,74	51	12,06		
2	140	87,50	20	12,50		
<b>Exame dermatoneurológico n=722</b>						
Sem alteração	613	96,84	20	3,16	1,41	0,235
Com alteração	84	94,38	5	5,62		

### 6.3.3 Concordância dos testes diagnósticos

Na tabela 16 é apresentado a análise de concordância entres os testes ELISA e ML-Flow para detecção de IgM antiPGL-1. Observou-se um índice Kappa de 0,423, sendo essa concordância considerada moderada, porém significativa ( $p < 0,001$ ). Do total de 909 amostras 146 (16,06%) divergiram no resultado.

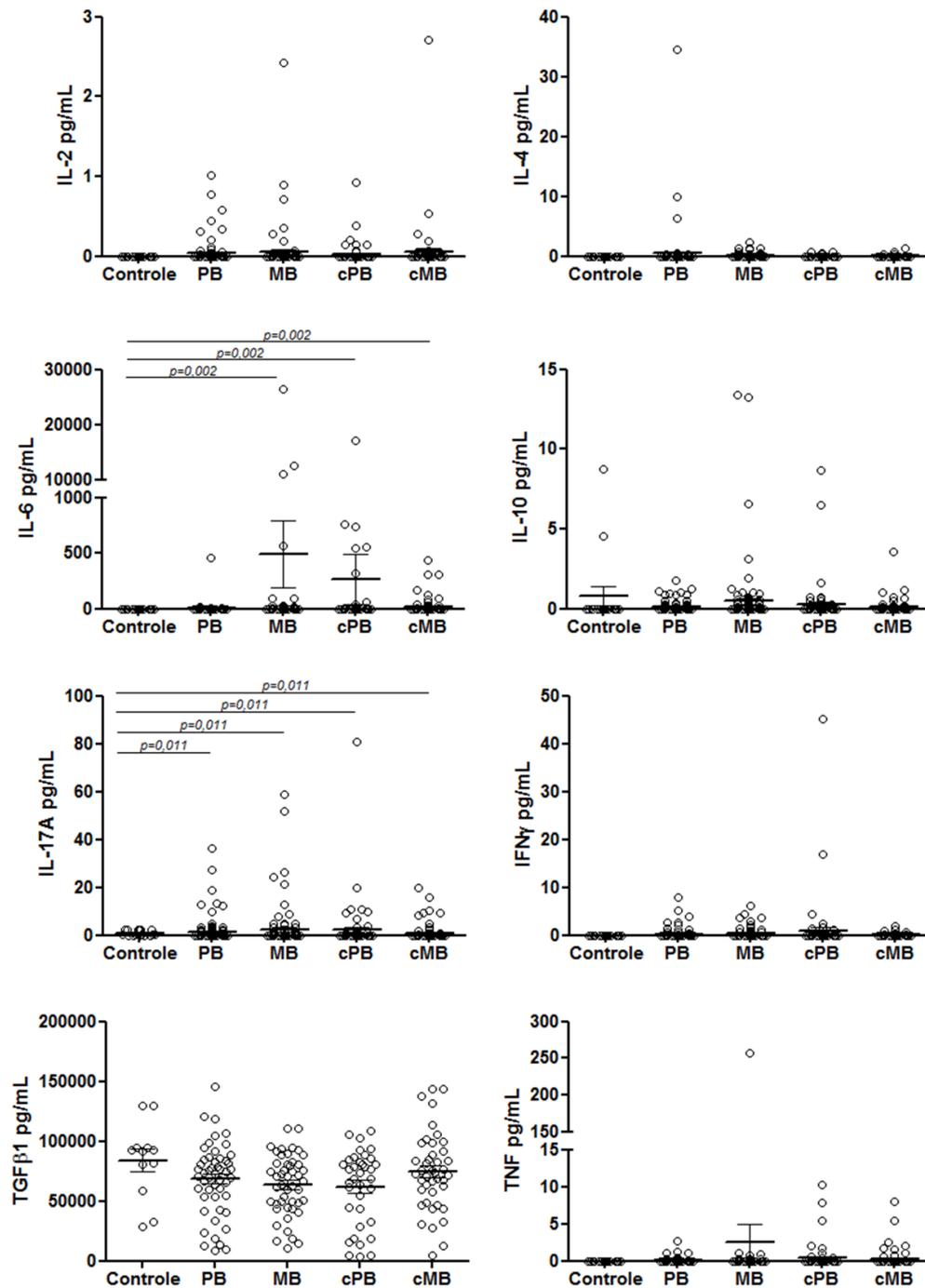
**Tabela 16** - Concordância entre os resultados dos testes ELISA e ML-Flow para detecção de IgM antiPGL-1.

Testes	Resultados	ELISA antiPGL-1						Índice Kappa (k)
		Negativo		Positivo		Total		
		N	%	N	%	N	%	
ML-Flow antiPGL-1	Negativo	684	75,25	79	8,69	763	83,94	0,423
	Positivo	67	7,37	79	8,69	146	16,06	SE=0,040
	<b>Total</b>	751	82,62	158	17,38	909	100,00	p<0,001

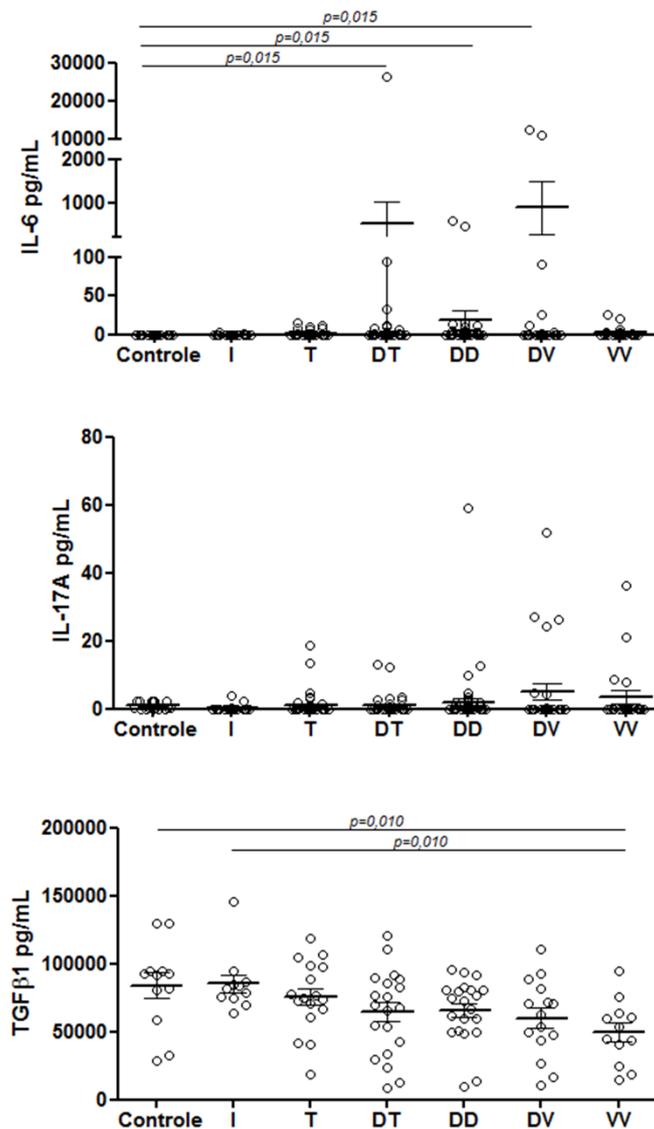
### 6.3.4 Relação das citocinas com a classificação clínica

As citocinas foram avaliadas quanto a sua distribuição em relação as classificações clínicas apresentadas. A figura 5 mostra a concentração sérica de citocinas em relação à classificação operacional. Observou-se que os casos multibacilares e os contatos tiveram maior concentração de IL-6, quando comparado ao controle ( $p=0,002$ ). A concentração de IL-17 mostrou-se elevada em todos os grupos estudados em relação ao controle ( $p=0,011$ ). As demais citocinas não apresentaram diferença estatística. E embora a média da concentração de TGF- $\beta$ 1 tenha sido menor que o controle, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Quando analisamos a concentração das citocinas segundo a forma clínica, constatou-se que IL-6 foi significativamente maior nas formas dimorfas ( $p=0,015$ ). A concentração de IL-17A não foi estatisticamente significativa em nenhuma das formas clínicas ( $p>0,05$ ). Pacientes com a forma tuberculóide à forma virchowiana-virchowiana apresentaram um redução gradual da concentração de TGF- $\beta$ 1, sendo que a forma virchowiana-virchowiana apresentou uma redução significativa em relação ao controle e à forma indeterminada ( $p=0,010$ ) (Figura 6). As demais citocinas não apresentaram diferença estatística. Essa diferença também não foi observada nos contatos, quando distribuídos segundo a forma clínica do caso (dados não mostrados).

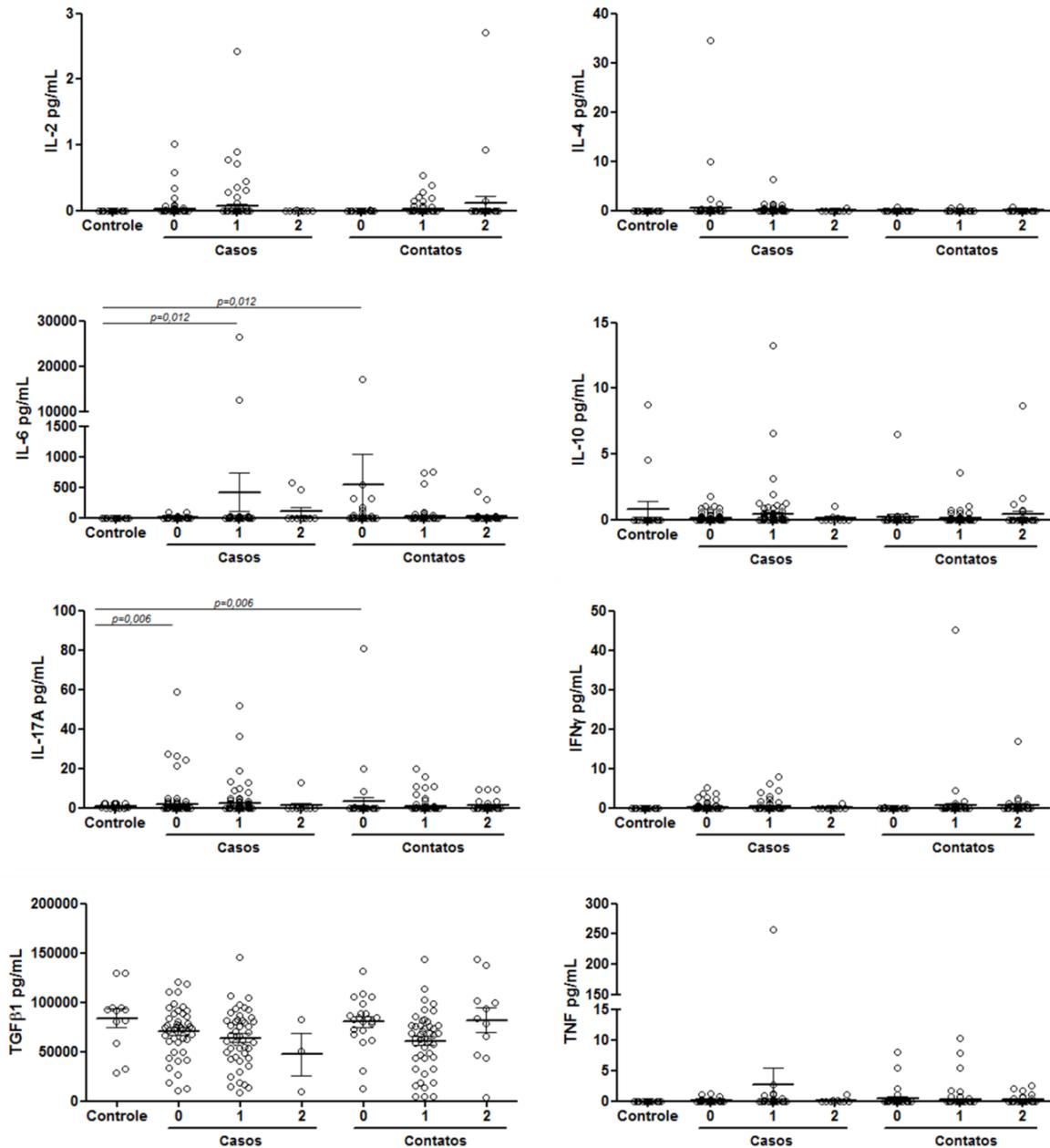


**Figura 5 - Distribuição da concentração de citocinas (pg/mL), segundo a classificação operacional.** Foram analisadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL17A, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 e TNF. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão dos grupos Controle (n=16), PB= paucibacilar (n=124), MB= multibacilar (n=103), cPB= contato de paucibacilar (n=76) e cMB= contato de multibacilar (n=87). Para o TGF- $\beta$ 1 os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos grupos Controle (n=12), PB (n=50), MB (n=47), cPB (n=36) e cMB (n=42). Foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn. Para o TGF- $\beta$ 1, teste ANOVA, pós-teste de Tukey.



**Figura 6 - Distribuição da concentração de citocinas (pg/mL) segundo a forma clínica.** Foram analisadas as citocinas IL-6, IL-17A e TGF- $\beta$ 1. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão dos grupos Controle (n=16), I= indeterminado (n=23), T= tuberculóide (n=43), DT= dimorfo-tuberculóide (n=52), DD= dimorfo-dimorfo (n=58), DV= dimorfo-virchowiano (n=27) e VV= virchowiano-virchowiano (n=23). Para o TGF- $\beta$ 1 os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos grupos Controle (n=12), I (n=11), T (n=17), DT (n=20), DD (n=21), DV (n=15) e VV (n=12). Foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn. Para TGF- $\beta$ 1, teste ANOVA, pós-teste Tukey.

Observou-se ainda que a concentração de IL-6 e IL-17A, foi maior principalmente nos indivíduos que não possuíam cicatriz vacinal como mostra a figura 7.



**Figura 7 - Distribuição da concentração de citocinas (pg/mL), segundo o número de cicatriz vacinal nos casos e contatos.** Foram analisadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL17A, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 e TNF. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão dos grupos Controle (n=16), Casos 0= nenhuma cicatriz (n=115), Casos 1= uma cicatriz (n=93), Casos 2= duas cicatrizes (n=10), Contatos 0 (n=34), Contatos 1 (n=88) e Contatos 2 (n=33). Para o TGF- $\beta$ 1 os dados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão dos grupos Controle (n=12), Casos 0 (n=45), Casos 1 (n=45), Casos 2 (n=3), Contatos 0 (n=22), Contatos 1 (n=45) e Contatos 2 (n=11). Foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn. Para o TGF- $\beta$ 1, teste ANOVA, pós-teste de Tukey.

Buscou-se também, analisar se haveria correlação entre as citocinas de acordo com a classificação operacional dos casos estudados. Em quase todas as citocinas observou-se uma correlação positiva significativa, exceto para o TGF- $\beta$ , que embora, algumas vezes, tenha apresentado correlação negativa, esta não foi significativa, como mostra a tabela 17.

**Tabela 17** - Coeficiente de correlação de Spearman (r) para a concentrações de citocinas entre os pacientes paucibacilar, multibacilar e contatos.

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17A	TNF	IFN- $\gamma$
<b>Paucibacilar</b>							
<b>(n=124)</b>							
IL-4	0,32**	-					
IL-6	0,34**	0,41**	-				
IL-10	0,50**	0,42**	0,51**	-			
IL-17A	0,33**	0,53**	0,47**	0,53**	-		
TNF	0,42**	0,38**	0,41**	0,42**	0,40**	-	
IFN- $\gamma$	0,27**	0,51**	0,47**	0,34**	0,42**	0,35**	-
TGF- $\beta$ †	-0,26	-0,22	-0,06	-0,20	-0,26	-0,18	-0,10
<b>Multibacilar</b>							
<b>(n=103)</b>							
IL-4	0,12	-					
IL-6	0,32**	0,40**	-				
IL-10	0,42**	0,42**	0,61**	-			
IL-17A	0,33**	0,67**	0,44**	0,54**	-		
TNF	0,55**	0,13	0,33**	0,36**	0,49**	-	
IFN- $\gamma$	0,39**	0,52**	0,53**	0,52**	0,66**	0,63**	-
TGF- $\beta$ †	0,06	0,04	-0,07	0,03	0,17	0,16	0,14
<b>Contatos</b>							
<b>(n=163)</b>							
IL-4	0,29**	-					
IL-6	0,15	0,35**	-				
IL-10	0,46**	0,45**	0,40**	-			
IL-17A	0,37**	0,48**	0,43**	0,45**	-		
TNF	0,26**	0,34**	0,48**	0,41**	0,46**	-	
IFN- $\gamma$	0,39**	0,55**	0,38**	0,49**	0,57**	0,46**	-
TGF- $\beta$ †	0,01	0,05	0,13	-0,03	0,04	0,15	-0,11

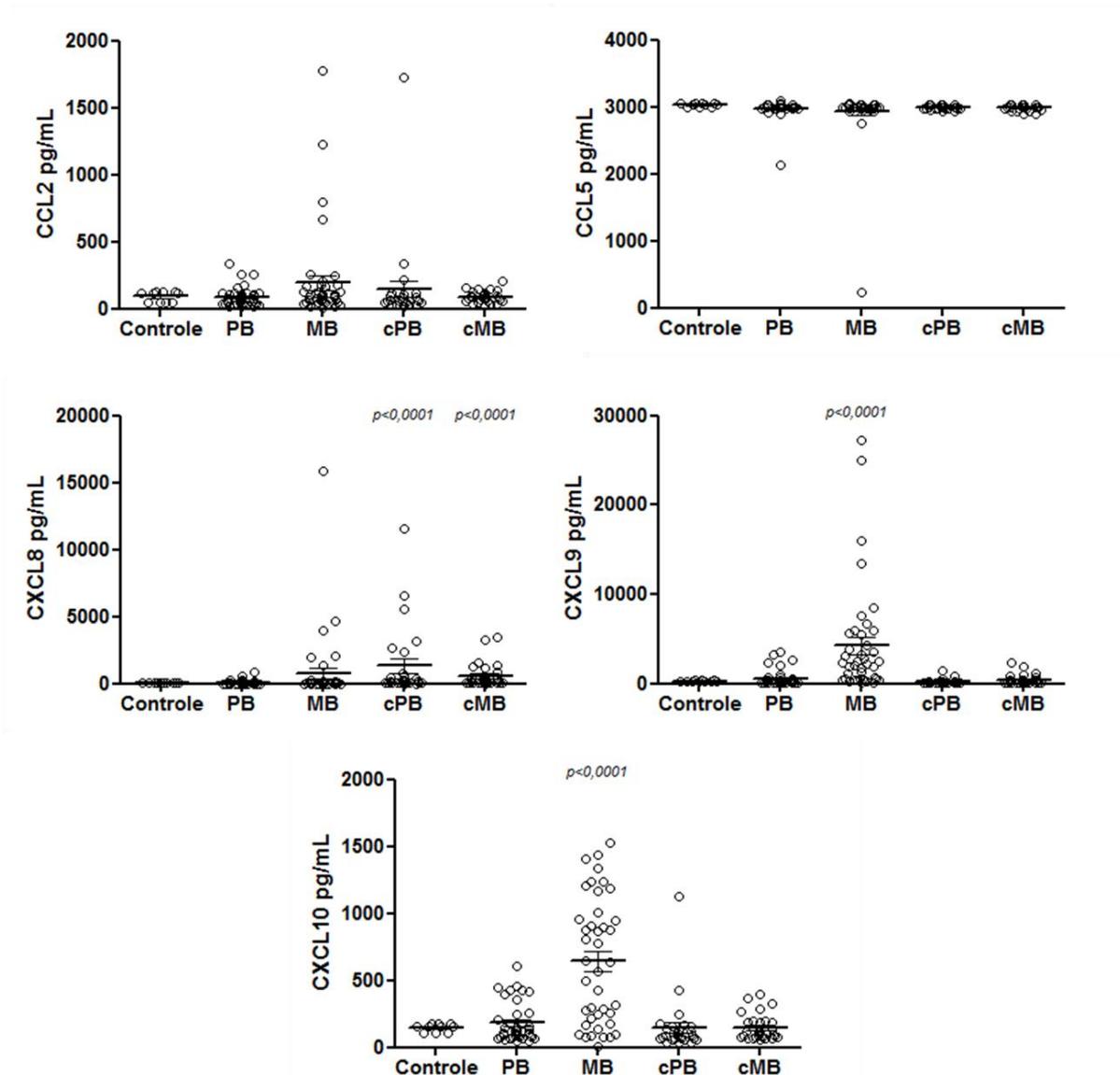
†Grupo paucibacilar (n=50), multibacilar (n=47) e contatos (n=78). \* p<0,05 \*\*p<0,001

### 6.3.5 Relação das quimiocinas com a classificação clínica

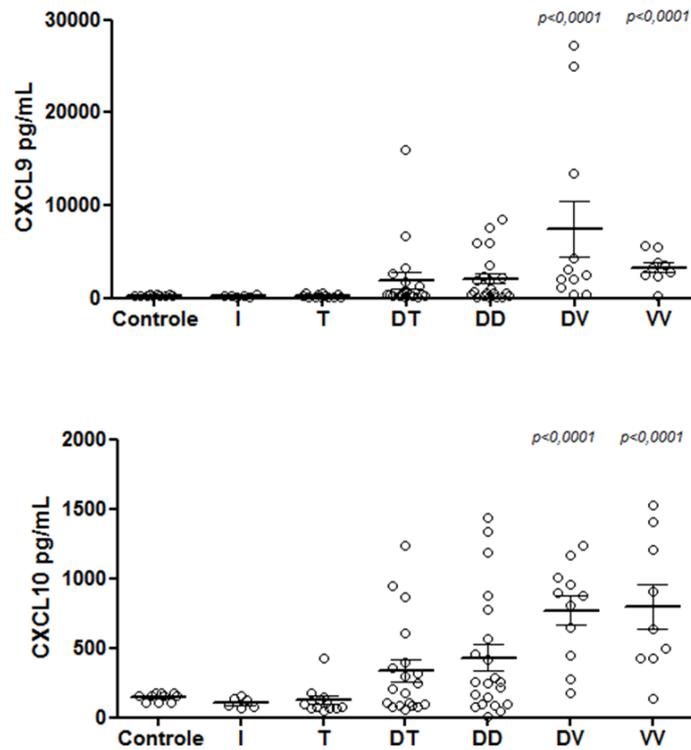
As quimiocinas também foram avaliadas em casos e contatos quanto a distribuição em relação à classificação operacional (Figura 8), forma clínica dos casos (Figura 9) e vacinação por BCG (Figura 10).

Observou-se que CXCL8 mostrou-se elevada entre os contatos, quando comparados ao controle e ao grupo de doentes, principalmente entre aqueles que não possuíam cicatriz vacinal por BCG (p<0,0001) (Figuras 9 e 10). As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 apresentaram-se mais elevada em pacientes multibacilares do que no demais grupos (p<0,0001) (Figura 8). Essa diferença dos multibacilares foi observada com mais detalhes nas

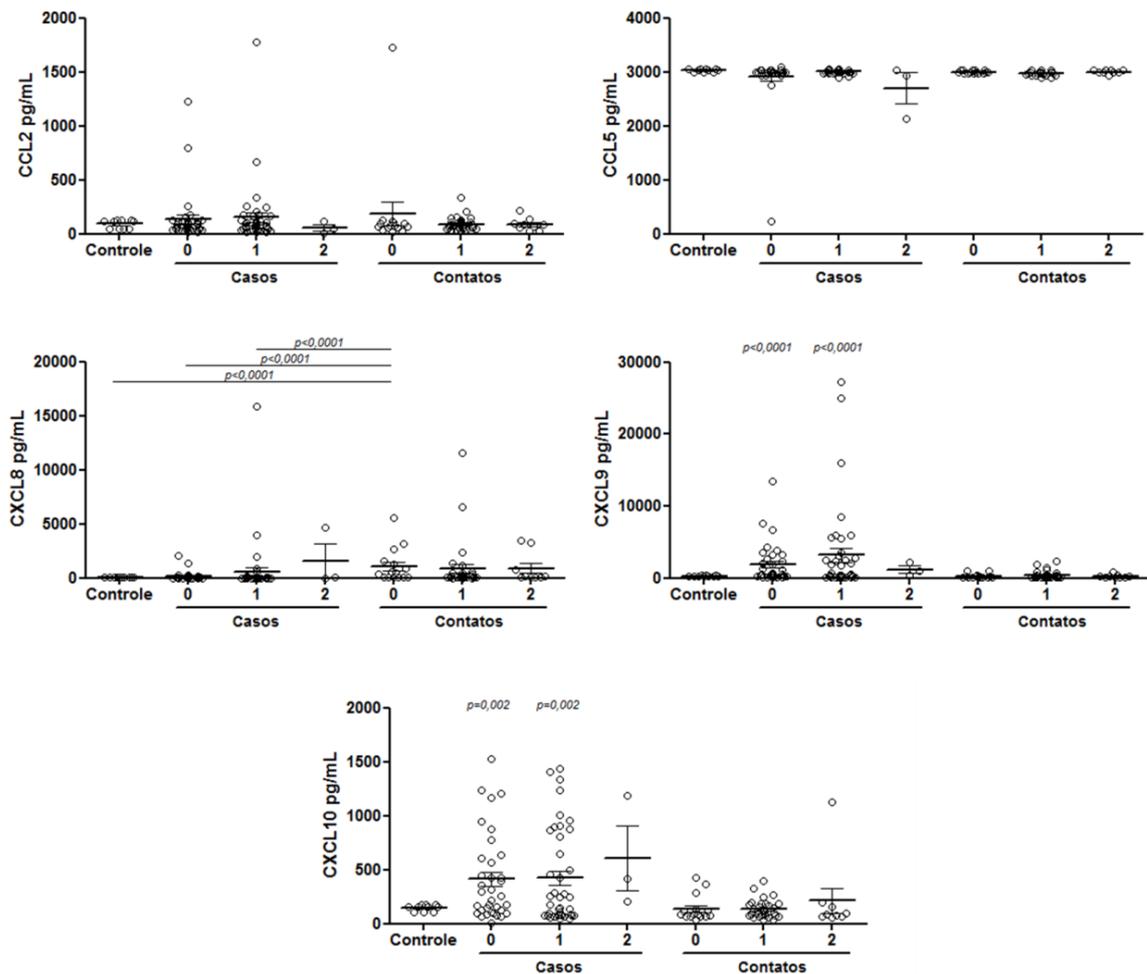
formas clínicas dimorfo-virchowiano e virchowiano-virchowiano ( $p < 0,001$ ) (Figura 9). As demais quimiocinas não apresentaram diferenças significativas quanto à forma clínica (dados não mostrados). CXCL9 e CXCL10 mostraram-se elevadas entre os doentes, mesmo naqueles com ou sem cicatriz vacinal, quando comparados ao controle ( $p < 0,002$ ) (Figura 10).



**Figura 8 - Distribuição da concentração de quimiocinas (pg/mL), segundo a classificação operacional.** Foram analisadas as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão dos grupos Controle (n=10) PB= paucibacilar (n=38), MB= multibacilar (n=41), cPB= contato de paucibacilar (n=27) e cMB= contato de multibacilar (n=28). Foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.  $p < 0,0001$  em relação ao controle e demais grupos.



**Figura 9 - Distribuição da concentração de quimiocinas (pg/mL) segundo a forma clínica.** Foram analisadas as quimiocinas CXCL9 e CXCL10. Os dados foram expresso como a média  $\pm$  erro padrão dos grupos Controle (n=10), I= indeterminado (n=6), T= tuberculóide (n=12), DT= dimorfo-tuberculóide (n=19), DD= dimorfo-dimorfo (n=21), DV= dimorfo-virchowiano (n=11) e VV= virchowiano-vichowiano (n=9). Foi aplicado o teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.  $p < 0,0001$  em relação aos grupos Controle, I e T.



**Figura 10 - Distribuição da concentração de quimiocinas (pg/mL), segundo o número de cicatriz vacinal dos casos e contatos.** Foram analisadas as quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10. Os dados foram expresso como a média  $\pm$  erro padrão dos grupos Controle (n=10), Casos 0= nenhuma cicatriz (n=35), Casos 1= uma cicatriz (n=40), Casos 2= duas cicatrizes (n=3), Contatos 0 (n=15), Contatos 1 (n=31) e Contatos 2 (n=9). Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.  $p < 0,05$  em relação ao grupo Controle.

Em relação à correlação entre as quimiocinas, observamos uma correlação positiva entre CXCL9 e CXCL10 em paucibacilares, multibacilares e contatos ( $p < 0,001$ ). Uma correlação positiva também foi observada entre CCL5 e CXCL8 em pacientes paucibacilar ( $p < 0,05$ ). Houve ainda correlação positiva entre CCL2 e CXCL9 em paucibacilares e contatos, e CCL2 e CXCL10 em contatos somente ( $p < 0,05$ ), tabela 18.

Também correlacionamos as quimiocinas com as citocinas de pacientes paucibacilar, multibacilar e contatos (Tabela 19). Observou-se correlação entre CCL2 e IL-10,

negativa para os paucibacilares e positiva nos multibacilares ( $p < 0,05$ ). Entre os paucibacilares foi observada ainda correlação positiva entre CCL5 e TGF- $\beta$ 1, e entre CCL10 e IL-2 ( $p < 0,05$ ). Já no multibacilares a correlação foi positiva entre CXCL8 e IL-10, e negativa entre CXCL9 e IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ). Entre os contatos apenas CXCL8 apresentou correlação, sendo positiva para IL-6 ( $p < 0,001$ ) e negativa para IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 18** - Coeficiente de correlação de Spearman (r) da concentração de quimiocinas em pacientes paucibacilar e multibacilar.

	CCL2	CCL5	CXCL8	CXCL9
<b>Paucibacilar</b>				
<b>(n=38)</b>				
CCL5	-0,04	-		
CXCL8	0,11	0,41*	-	
CXCL9	0,40*	-0,23	0,01	-
CXCL10	0,27	-0,11	0,16	0,85**
<b>Multibacilar</b>				
<b>(n=41)</b>				
CCL5	-0,11	-		
CXCL8	-0,12	-0,10	-	
CXCL9	0,13	0,05	-0,06	-
CXCL10	0,13	-0,06	-0,06	0,77**
<b>Contatos</b>				
<b>(n=55)</b>				
CCL5	-0,03	-		
CXCL8	0,07	0,05	-	
CXCL9	0,27*	-0,02	-0,22	-
CXCL10	0,26*	-0,08	-0,14	0,77**

\* p<0,05 \*\*p<0,001

**Tabela 19** - Coeficiente de correlação de Spearman (r) da concentração de citocinas e quimiocinas em pacientes paucibacilar, multibacilar e contatos.

	CCL2	CCL5	CXCL8	CXCL9	CXCL10
<b>Paucibacilar</b>					
<b>(n=38)</b>					
IL-2	-0,08	-0,12	0,09	0,26	0,43*
IL-4	0,02	-0,16	-0,21	0,14	0,04
IL-6	-0,05	0,23	0,17	-0,10	-0,06
IL-10	-0,38*	0,00	-0,18	-0,03	0,00
IL-17A	-0,28	-0,06	-0,21	-0,10	-0,08
TNF	-0,09	-0,14	0,27	0,18	0,18
IFN- $\gamma$	-0,24	0,00	-0,22	-0,09	-0,13
TGF- $\beta$ 1	-0,13	0,32*	0,17	-0,21	-0,20
<b>Multibacilar</b>					
<b>(n=41)</b>					
IL-2	0,23	0,16	0,05	0,02	0,00
IL-4	0,09	0,29	-0,19	-0,12	-0,03
IL-6	0,17	-0,05	0,39*	-0,05	0,10
IL-10	0,38*	0,11	0,03	-0,05	0,10
IL-17A	-0,12	0,09	-0,15	-0,14	-0,08
TNF	-0,05	-0,12	0,05	-0,29	-0,21
IFN- $\gamma$	0,05	0,01	0,06	-0,36*	-0,12
TGF- $\beta$ 1	-0,02	0,00	-0,09	0,12	-0,01
<b>Contatos</b>					
<b>(n=55)</b>					
IL-2	0,04	0,00	-0,17	-0,02	0,00
IL-4	0,05	0,08	-0,13	0,02	-0,09
IL-6	0,10	0,08	0,58**	0,05	0,11
IL-10	0,22	-0,16	-0,17	0,02	0,02
IL-17A	-0,22	0,00	-0,02	-0,13	-0,09
TNF	-0,10	0,02	0,21	-0,05	0,08
IFN- $\gamma$	0,17	0,00	-0,31*	0,15	0,13
TGF- $\beta$ 1	0,21	0,05	0,12	-0,10	-0,04

\* p<0,05 \*\*p<0,001

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Caracterização clínico-epidemiológica

Os dados relativos aos aspectos clínicos e epidemiológicos da população estudada sustentam a condição de alta endemicidade da hanseníase no estado do Maranhão. Os pacientes de nosso estudo são provenientes de uma área considerada hiperendêmica, ou seja, com CD anual de casos novos superior a 40/100.000 habitantes segundo os critérios do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005). Esse quadro reflete a necessidade urgente de medidas de controle que possam reduzir a prevalência da endemia na região. O maior número de casos é proveniente do município de Imperatriz, como resultado de intensas campanhas realizadas naquela localidade, com grande adesão da população. Embora Açailândia tenha a menor quantidade de casos estudados, esse número ainda representa uma alta incidência diante de uma população total de 104.047 habitantes.

As duas cidades, Açailândia e Imperatriz, possuem um dos maiores CD de casos novos no Estado (BRASIL, 2014). Acredita-se, no entanto, que haja ainda uma subnotificação de dados. Devido a grande extensão territorial desses municípios, muitos casos da doença deixam de ser diagnosticados devido as dificuldades econômicas e acessibilidade geográfica que os pacientes enfrentam para chegar aos centros de atendimento à saúde. Barreiras geográficas constituem um dos fatores que contribuem para a busca tardia aos serviços de saúde (OLIVEIRA et al., 2012; GARCIA-SUBIRATS et al., 2014). Açailândia é, das localidades estudadas, a que apresenta menor IDH (PNUD, 2013).

As características epidemiológicas desses pacientes assemelham-se a de outros estudos realizados na mesma região, como o de Aquino et al. (2003) no município de Buriticupu - MA. O maior número de casos do gênero masculino corrobora com dados assinalados em estudos anteriores (JINDAL et al., 2009; MIRANZI et al., 2010; SOUSA et al., 2012; SCHEELBEEK et al., 2013). Segundo WHO (2014), na maioria dos países endêmicos de MH, os homens são duas vezes mais afetados que as mulheres. Porém, essa predominância não é universal, pois existem regiões, particularmente na África, onde a ocorrência de MH é igual em ambos os sexos ou, ocasionalmente, ocorre uma alta prevalência entre mulheres.

A predominância de pacientes do gênero masculino no Maranhão, já foi descrita por outros autores (AQUINO et al., 2003; CORRÊA et al., 2012). Porém, segundo os estudos de Figueiredo e Silva (2003) e Silva et al. (2012), essa diferença vem diminuindo ao longo

dos anos. No ano de 2013, houve no Estado uma relação de 1,3 pacientes do gênero masculino para cada 1 do feminino (BRASIL, 2014). O gênero, no entanto, parece que não é um parâmetro que modula o risco de desenvolver a doença, ou seja, a predominância do gênero masculino dentre os enfermos deve-se a diferenças no tipo de exposição (SALES et al., 2011). Acredita-se, portanto, que o estilo de vida e atividade laboral aportariam maior contribuição para o desenvolvimento da doença (MOET et al., 2004).

Em nosso estudo os casos de MH foi, em sua maioria, constituído por jovens e adultos. Esses dados se assemelham aos citados na literatura, uma vez que a idade constitui um fator de risco para a doença. O risco de adoecer aumenta de acordo com a idade, a partir da adolescência, até os 40 anos, em média (BRITTON e LOCKWOOD, 2004; MOET et al., 2004; 2006; DESSUNTI et al., 2008). Isso significa que a população economicamente ativa é a parcela mais afetada, podendo isso gerar um impacto negativo sobre a economia do Estado, uma vez que essa população pode desenvolver incapacidade física ou estado reacional relacionados ao MH, que poderá removê-los da atividade produtiva (MIRANZI et al., 2010).

Apesar do predomínio da hanseníase em adultos, observamos que 11% dos casos ocorreram em menores de 15 anos, o que sugere uma transmissão nos primeiros anos de vida. O CD nessa faixa etária no Maranhão é considerado hiperendêmico pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2013). Atualmente, a taxa de detecção em menores de 15 é considerado o principal indicador para o controle da doença. O número de casos detectados na idade infantil reflete endemicidade da doença, assim como a ineficiência das políticas de saúde pública (IMBIRIBA et al., 2008).

Sabe-se que a transmissão do MH ocorre principalmente através do contato direto. Os bacilos são eliminados em especial pelas vias aéreas superiores de pacientes multibacilares sem tratamento (BRITTON e LOCKWOOD, 2004). Neste estudo, 46% dos casos conviviam com mais de três pessoas, com uma média de 4,3 contatos por paciente, o que se aproxima da média quatro, observada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2002). O grande número de pessoas convivendo no mesmo ambiente (mais de três), aumentam as chances de adoecimento, em cinco a oito vezes, em famílias com um caso da doença (FINE et al., 1997; SALES et al., 2011).

Em quase 80% dos casos do nosso estudo não foi registrado o número contatos. Apesar de não ser de preenchimento obrigatório para a entrada de dados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN do Ministério da Saúde, o número de contatos é recomendado para análise epidemiológica e operacional (BRASIL, 2010b). Essa

talvez seja uma das razões pelo grande número de informações ignoradas, não sendo dada a devida importância ao preenchimento dessa variável. Além do número de contatos, outros indicadores tiveram o preenchimento por vezes ignorado. Em algumas situações, não foi encontrado descrito nos prontuários a forma clínica do paciente, ou ainda a classificação operacional. Problemas com a completude de dados em programas de controle da hanseníase já foram descritos por De Aquino et al. (2003) e Sousa et al. (2012), que classificaram como precários vários indicadores avaliados.

O predomínio do diagnóstico da forma PB com 65,5% dos casos registrados, foram similares ao encontrado no estudo realizado por Silva et al. (2012). No entanto, os registros do SINAN mostram um cenário diferente no Estado, com maior número de casos MB (BRASIL, 2014). Aquino et al. (2003) e Corrêa et al. (2012), também reportaram maiores casos MB com percentual de 50,7 e 72,9 respectivamente. Essa divergência pode ser explicada pelas Campanhas de Prevenção da Hanseníase realizadas pelo grupo de pesquisa, que ao oferecer suporte para o deslocamento de famílias com casos suspeitos à Unidade de Saúde, favoreceu maior adesão de pacientes, entre eles aqueles em que a doença ainda não havia se agravado.

Observou-se um predomínio do gênero feminino entre os PB (54%), e masculino entre os MB (66%), aspectos também visualizados por Stefani et al. (2012). Esses dados sugerem que os homens demoram mais para procurar o serviço de saúde quando surgem as primeiras manifestações da doença, enquanto a mulher é mais cuidadosa com a saúde e procura cuidados médicos com mais frequência. Razão pela qual os homens acabam sendo mais acometidos pela forma mais grave da doença.

Na classificação feita de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (1966), a maioria dos casos apresentaram as formas intermediárias da doença. O grande número de casos de MH no grupo dimorfo levanta dúvidas no que diz respeito à adequação do processo de diagnóstico precoce. A forma intermediária da doença parece persistente no Estado nos últimos dez anos, como já demonstrado por outros autores (AQUINO et al., 2003; MURTO et al., 2013; BRASIL, 2014). E essa também é a forma clínica predominante em outras regiões onde a doença é hiperendêmica no mundo (JINDAL et al., 2009; GHAYAS et al., 2013).

Sabe-se da importância do diagnóstico da forma indeterminada para a eficácia do tratamento, pois o paciente apresenta poucos bacilos, não funcionando como fonte de infecção (ALENCAR et al., 2012). Embora a cobertura dos serviços de saúde para detecção de casos novos tenha melhorado no Maranhão, o número de casos com a forma indeterminada ainda

tem sido muito baixo (BRASIL, 2014). Em nosso estudo, somente 10% dos casos foram diagnosticados com essa forma clínica da doença, semelhante ao descrito por Silva et al. 2012. Porém, Duarte-Cunha et al. (2012), em estudo realizado em Duque de Caxias - RJ, região de alta endemicidade da doença, observou um aumento na detecção de casos com a forma indeterminada, de 10% para 18%, entre os anos de 1998 a 2006, resultado de melhorias do acesso aos serviços de assistência primária à saúde, ocorrido no mesmo período.

A presença de formas tardias reflete uma demora no diagnóstico precoce da doença, sendo este imprescindível para a cura e quebra da cadeia de transmissão (TALHARI, 1994; BRASIL, 2002). Observamos em nosso estudo que 42% dos pacientes levaram mais que 12 meses evoluindo com sinais e sintomas de MH, sem que tenha sido realizado o diagnóstico. De Rojas et al. (1994) considera um diagnóstico tardio quando o tempo entre o aparecimento dos sinais e sintomas e a definição do diagnóstico da doença excede 12 meses. Dados da literatura apontam percentuais que variam de 32% a 45% para diagnósticos realizados em tempo inferior a um ano (DA SILVA SOUZA e BACHA, 2003; GUERRERO et al., 2013). No entanto, nossos dados revelaram a capacidade de diagnóstico um pouco superior, em 57,67%. Pimentel et al. (2002) demonstrou que o retardo no diagnóstico por mais de um ano influencia na ocorrência de incapacidades no exame inicial.

O tratamento da doença no início evita a polarização para formas que apresentam potencial incapacitante (TALHARI, 1994). O tratamento de nossos pacientes seguiu as recomendações do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), considerando a classificação operacional da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2000). Assim, 64% dos casos receberam tratamento poliquimioterápico em 6 doses. Sabe-se que a primeira dose é suficiente para eliminar o 99% do bacilo (VIJAYAKUMARAN, 1996). Em virtude disso, já existe proposta de redução para dose única como alternativa de tratamento a pacientes PB (MANICKAM et al., 2012). Um pequeno número de 3% de nossos casos receberam terapia com 24 doses. Esse longo tratamento tem sido utilizado em casos MB com elevado índice baciloscópico no diagnóstico ou na alta (AVELLEIRA et al., 2003). Entretanto, acredita-se não haver diferenças na eficácia do tratamento entre 12 e 24 doses (SALES et al., 2007).

O tratamento inadequado ou irregular podem ocasionar casos de recidiva da doença (KAIMAL e THAPPA, 2009). Em nosso estudo 2,3% dos pacientes foram diagnosticados com recidiva, a maioria da forma MB. Considera-se como caso de recidiva na hanseníase o paciente que, tratado regularmente pelos esquemas oficiais vigentes no país, recebe alta por cura e após um período de incubação variável, passa a apresentar sinais e

sintomas de atividade da doença (BRASIL, 2002). O diagnóstico precoce, assim com o tratamento regular têm se constituído como um dos principais desafios para o controle da doença (WHO, 2005). Sousa et al. (2013) em estudo realizado em Unidades Básicas de Saúde de Imperatriz - MA, observou que 40% dos pacientes faltaram ao menos uma vez ao tratamento e outros 4,8% abandonaram. Nossos dados não permitiram inferir os motivos associados a recidiva dos pacientes. Outros fatores relacionados ao desenvolvimento da recidiva podem dever-se à persistência ou resistência do bacilo, à imunossupressão, gravidez, formas virchowianas avançadas do hospedeiro, à endemicidade do meio (reinfecção) e ao diagnóstico tardio e erro de classificação (DINIZ et al., 2009; KAIMAL e THAPPA, 2009).

A lesão do nervo provoca alterações de sensibilidade e motora, levando a diferentes graus de deficiência física que podem afetar a vida social e econômica dos pacientes, resultando em sua estigmatização e discriminação (LUSTOSA et al., 2011). Nesse estudo, constatou-se que 35,51% dos nossos pacientes apresentavam algum grau de incapacidade física no início do tratamento, sendo o grau do tipo 1 o mais frequente. No entanto, em 36% dos casos não foi notificado o grau de incapacidade. Ao compararmos o com o de outros estudos, observou-se que o percentual foi semelhante ao encontrado por Guerrero et al. (2013), na qual o relato de incapacidade foi de 35,1%.

Além disso, o grau de incapacitantes foi maior nos pacientes MB. Atenção especial deve ser dada a este fato, já que os casos multibacilares têm 65% de chances de desenvolver deformidades quando já apresentam função neurológica alterada no momento do diagnóstico (ARANTES et al., 2010). Esses dados são semelhantes aos registrados em nível estadual e nacional (BRASIL, 2014), e não deixam de refletir uma demora no diagnóstico desses pacientes.

Embora a OMS recomende o monitoramento apenas de casos com grau de incapacidade 2 (WHO, 2005), é importante dar atenção também aos casos com grau 1, para que recebam tratamento adequado e resolvam as deformidades incipientes. Em um estudo de coorte realizado entre 1993 e 2003, em Belo Horizonte - MG, onde foi comparado o grau de incapacidade na admissão e na alta, observou-se que 43,2% das incapacidades de grau 1 poderiam ser revertidas, contra 21,3% de grau 2 (GONÇALVES et al., 2009). Isso confirma a importância e a necessidade de fortalecer as ações e políticas de apoio ao diagnóstico precoce da hanseníase, bem como o monitoramento adequado dos casos com grau de incapacidade 1. A avaliação e o registro da incapacidade são, portanto, essenciais para prevenir e/ou evitar a

instalação de incapacidades após a alta, bem como para a produção de dados que permitam a avaliação do programa, sendo fundamentais para o sucesso do mesmo (BRASIL, 2002).

Apesar da vacinação BCG ser uma recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010a), nosso estudo encontrou que cerca de metade dos casos não eram imunizados, principalmente entre os MB. Corrêa et al. (2012), em estudo realizado na mesma região, observou que 83,5% dos casos não possuíam cicatriz vacinal. Esse alto percentual de ausência da cicatriz vacinal em doentes também foi relatado por Kerr-Pontes et al. (2006), no Estado do Ceará. Somente 6% dos pacientes estudados apresentavam as duas cicatrizes, indicando que cobertura vacinal pelo BCG nesta população foi muito baixa. Diversos estudos já demonstraram a eficácia da vacina BCG na imunoprofilaxia e imunoterapia da hanseníase (ZODPEY et al., 2005; KERR-PONTES et al., 2006; ZODPEY, 2007; OFOSU e BONSU, 2010).

Observamos ainda em nossos dados que 46% dos diagnósticos foram feitos através da demanda espontânea, ou seja, a população que procura o serviço de saúde, também observado por Lana et al. (2003). Os encaminhamentos foram responsáveis por 45% dos diagnósticos e os exames coletivos por 0,8%, valor muito baixo, assim como observado no estudo de Miranzi et al. (2010), em Uberaba - MG. Cerca de 6% foram diagnosticados através do exame de contatos. Esses indivíduos, em sua grande maioria, eram contatos intradomiciliares e mantinham laços de consanguinidade com o caso índice. Através do exame de contatos De Matos (1999) verificou que 11% dos analisados já eram doentes no primeiro exame o que demonstra a importância desta medida para a predição de MH, evitando a progressão da doença para estágios mais graves.

Com relação a baciloscopia no diagnóstico, das 86 que foram realizadas, 20% apresentaram positividade. Resultado semelhante foi encontrado por Imbiriba et al. (2008), onde entre 318 exames realizados 18% foram positivos. O percentual de casos positivos correspondeu a 43% dos casos MB estudados. A baciloscopia pode ser utilizada como exame complementar para a classificação dos casos em PB e MB, onde a baciloscopia positiva indica hanseníase multibacilar, independentemente do número de lesões (BRASIL, 2005).

A caracterização epidemiológica dos contatos também é de fundamental importância para o planejamento de estratégias eficazes que visem o controle e erradicação da hanseníase. O contato prolongado de pacientes com indivíduos saudáveis, principalmente os familiares, torna-os um grupo de risco para o desenvolvimento do MH, uma vez que a exposição ao bacilo é o estágio que precede a infecção (BAKKER et al., 2006; SARNO et al.,

2012). Entretanto, alguns autores sustentam que a transmissão não ocorre unicamente pela exposição dos indivíduos sadios aos pacientes com manifestações clínicas, pois os infectados subclínicos também estão envolvidos na transmissão da doença, constituindo uma das principais rotas (GOULART et al., 2008).

A maioria dos contatos pertencia ao gênero feminino, a uma razão de 1,5 mulheres para cada homem. Esta predominância é relatada na literatura (VIEIRA et al., 2008; LEITE et al., 2009), mas em outros estudos, a não existência de diferença entre os gêneros também é citada (ANDRADE et al., 2008; DURÃES et al., 2010). A maior procura das mulheres aos serviços de saúde e a maior frequência de doentes do gênero masculino justificam a predominância deste gênero dentre os contatos, pois as mulheres (esposas, filhas ou mães dos pacientes) acabam sendo as mais expostas aos doentes durante o convívio familiar, que foi o tipo mais observado neste estudo.

Os contatos de pacientes com MH, em sua maioria, estavam na idade adulta, semelhante ao relatado na literatura, onde predominam contatos na faixa etária acima dos 20 anos (DESSUNTI et al., 2008; VIEIRA et al., 2008; LEITE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2011; SALES et al., 2011). Moet et al. (2006) verificaram que existe um aumento do risco para desenvolver o MH a partir de 5 a 15 anos de idade, atingindo um pico entre os 15 e 20 anos de idade, e que volta a aumentar gradualmente depois dos 30 anos de idade. Sendo assim, a idade observada nos contatos de nosso estudo aponta uma realidade preocupante, pois a faixa etária predominante constitui o grupo com maior risco de desenvolver a doença. Além disso, é nesta faixa etária que os indivíduos estão em idade economicamente ativa, havendo assim maiores relações sociais e afetivas, maior contato com pessoas no seu cotidiano, o que acaba contribuindo com a transmissão da doença, caso os mesmos sejam portadores de infecção subclínica.

Um dado preocupante revelado pela caracterização epidemiológica é a alta frequência de contatos em idade infantil, que constituíram o segundo grupo mais frequente. Neste quadro, a exposição precoce ao bacilo aumenta a probabilidade de adoecimento. Por isso, faz-se necessário o acompanhamento destes contatos para possíveis intervenções nos estágios iniciais de infecção, visando assim a diminuição dos índices de MH em crianças nestas localidades.

A maioria era contato de casos MB e da forma clínica dimorfa. Já está bem estabelecido que o risco de desenvolver a doença é maior em contatos de pacientes MB, do que em contatos de pacientes PB, e estes por sua vez maior entre os não contatos (FINE et al.,

1997; DE MATOS et al., 1999). A predominância dos contatos de pacientes multibacilares neste estudo pode ser explicada, provavelmente, pela maior procura por atendimento destes contatos como forma de prevenção, uma vez que estes observaram nos casos índices as piores manifestações clínicas da doença (incapacidades e/ou deformidades).

Em nosso estudo, a avaliação do local de convívio do contato com o caso índice evidenciou maior proporção de convívio intradomiciliar e intradomiciliar-íntimo. Este fato pode ser justificado pelos critérios estabelecidos para o exame de contatos, onde os indivíduos referidos pelo paciente como tendo contato diário ou esporádico foram convocados para comparecer ao exame médico. Sales et al. (2011) verificaram que contatos que habitavam no mesmo domicílio com o caso índice apresentaram cerca de 2 vezes mais risco de adoecimento do que os que não habitavam.

Dentre os diferentes tipos de parentesco dos contatos com seus respectivos casos índices destacaram-se os de primeiro grau - filhos, pais e irmãos - e os cônjuges. O observado neste estudo assemelha-se ao encontrado por Dessunti et al. (2008), que ressaltou também a predominância dos contatos intradomiciliares e intradomiciliares-íntimos, demonstrando que a maioria dos contatos é da própria família e habitam no mesmo domicílio que os pacientes. Estudos apontam uma relação inversamente proporcional entre a distância física e o risco de adoecimento (MOET et al., 2004; DURÃES et al., 2010), evidenciando que a maioria dos contatos apresenta mais um fator de risco, o que contribui para a manutenção dos índices de hiperendemia.

A mesma relação de parentesco foi encontrado em Vitória - ES, onde um percentual de 81,6% foi identificado (DEPS et al., 2006). De acordo com Duraes et al. (2005), a literatura mostra que a proximidade do caso primário é um fator que contribui para o risco de adoecimento. Beiguelman (2002) observou que em famílias onde um dos casos era virchowiano, os parentes de sangue tinham risco maior de desenvolver a mesma forma da doença. O conhecimento sobre esses dados podem auxiliar na gestão de serviços, e uma das ações mais importantes para o controle da doença é a vigilância de contatos.

O tempo de convivência que o comunicante tinha com o caso índice, praticamente foi igual à idade já que, a grande maioria deles tinham laços de consanguinidade com o caso índice e conviviam no mesmo domicílio que a fonte de contágio. O período de incubação do *M. leprae* é longo, e o paciente pode levar, no mínimo, de dois a cinco anos para desenvolver a doença (GOULART et al., 2002).

Os altos índices de MH no Maranhão é um reflexo da deficiência nas ações de controle da doença, tais como monitoramento dos contatos e a implementação de medidas profiláticas, como a aplicação da vacina BCG. Nesta pesquisa, constatou-se que 19,6% contatos não apresentavam nenhuma cicatriz vacinal. Embora a norma técnica do MS seja clara e se saiba que a vacinação BCG é um procedimento necessário para evitar os novos casos da doença (BRASIL, 2010a), nosso estudo demonstra ainda que apenas 21,1% dos contatos haviam recebido a segunda dose da BCG, ressaltando a ausência de políticas públicas com caráter preventivo para o MH.

Em municípios hiperendêmicos é comum a detecção de novos casos em crianças e jovens, que são em sua maioria contatos que não receberam a vacinação por BCG (AMADOR et al., 2001). A vacina BCG não impede a infecção, entretanto, melhora a resposta imune do hospedeiro, agindo como um agente protetor (FINE et al., 1997; DE MATOS et al., 1999; ZENHA et al., 2012). Contatos que não possuem esta proteção possuem um risco 3,7 vezes maior de desenvolver o MH, sendo sugerida uma segunda dose como reforço. Assim, faz-se necessária a localização dos contatos para serem examinados e submetidos à profilaxia vacinal (MOET et al., 2004).

Nesse quadro epidemiológico dos contatos, observamos a presença de vários fatores de risco para o adoecimento dos mesmos. A legislação federal exige a vigilância de contatos, e em alguns estados da nação os contatos domiciliares de pacientes paucibacilares devem ser examinados uma vez a cada dois anos e os de pacientes multibacilares, uma vez por ano (BRASIL, 2002). Entretanto, no estado do Maranhão apenas 64,8% dos contatos foram examinados no ano de 2012, sendo esta porcentagem caracterizada como “regular” (BRASIL, 2013).

A pouca valorização da vigilância de contatos também está refletida na atual Ficha de Notificação/Investigação de Hanseníase do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), a qual exclui informações sobre os comunicantes de MH, reforçando a centralização da atenção aos doentes. Vijayakumaran et al. (2000) afirmam que, mesmo pondo o caso índice em tratamento poliquimioterápico, não se elimina a transmissão da doença dentro de uma casa, sendo necessárias outras intervenções para minimizar o risco de MH entre os seus contatos. Desta forma, a hiperendemia da região pode ser fruto da ineficiência das ações de vigilância em saúde para monitoramento do MH.

## 7.2 Caracterização clínico-imunológica

Há mais de meio século tem-se buscado melhores testes para o diagnóstico precoce da hanseníase e um melhor entendimento do padrão de imunidade do paciente frente ao *M. leprae* (GELUK, 2013). A resposta imune parece ser responsável pelo amplo espectro clínico da doença e, semelhante a uma doença autoimune, parece desencadear outras complicações como dano neural (GOULART e GOULART, 2009). Apesar de muito estudada, vários aspectos da imunologia do MH ainda permanecem obscuros.

Os títulos de anticorpos antiPGL-1 e os níveis séricos de interleucinas e quimiocinas foram quantificados, buscando caracterizar o perfil imunológico de pacientes de região hiperendêmica de MH e de seus contatos, no momento do diagnóstico. Estas ferramentas imunológicas são úteis para a avaliação dos padrões de resposta desencadeados após exposição ao *M. leprae*. Estes testes podem constituir uma forma de detecção, de forma indireta, da infecção, pois indicam que o indivíduo já foi exposto a antígenos do bacilo (GOULART e GOULART, 2008).

A soropositividade ao PGL-1 é um indicativo de uma resposta do organismo contra esse antígeno presente na membrana na *M. leprae*, sendo ainda sugerido como uma variável preditiva. Em nosso estudo 42,6% e 36,8% dos casos foram positivos ao IgM antiPGL-1 nos testes ML-Flow e ELISA, respectivamente. Os dados mostram ainda que pacientes multibacilares apresentaram maior percentual de positividade aos testes do que pacientes paucibacilares. Esses dados estão de acordo com o descrito na literatura sobre a doença. Sabe-se que anticorpos específicos antiPGL-1 estão presentes em 90% dos multibacilares não tratados, em 40 a 50% dos paucibacilares e em 1 a 5% dos indivíduos saudáveis (BRITTON e LOCKWOOD, 2004).

Esse resultado se repetiu em relação à forma clínica aumentando progressivamente do pólo tuberculóide ao pólo virchowiano. A pesquisa de anticorpo IgM é utilizada como teste sorológico para diagnosticar principalmente pacientes com a forma virchowiana, onde existe exacerbação da imunidade humoral (FOSS, 1997), mas possui limitações ao diagnóstico de pacientes tuberculóides (GELUK et al., 2010). Em nossos dados pacientes virchowiano-virchowianos chegaram a apresentar 90% de positividade ao teste ELISA.

A detecção do anticorpo IgM foi maior no gênero masculino, chegando a 51,6% pela técnica do ML-Flow. Resultado semelhante foi encontrado por Frota et al. (2010) em estudo realizado no Ceará. Neste mesmo estudo o autor observou também maior positividade

em pacientes adultos. Em nosso estudo pacientes adultos tiveram maior percentual de positividade ao PGL-1 pela técnica do ELISA, mas não pelo ML-Flow. Em relação à localidade, o município de Imperatriz possui maior número de casos PGL-1 positivos. Isso pode ser um reflexo do maior número de pacientes MB daquela região.

O resultado do ML-Flow mostrou maior positividade ao PGL-1 em pacientes que realizaram diagnóstico tardio. Esta questão pode ter um grande impacto para o paciente, pois quanto maior o tempo que levar para iniciar o tratamento, maior a chance de desenvolver dano neural irreversível (VAN VEEN et al., 2006), pois pacientes soropositivos ao PGL-1 tem maior chance de vir a desenvolver algum dano neural e grau de incapacidade (SCHURING et al., 2006). Em nosso estudo a positividade ao antígeno mostrou estar associada a incapacidade física.

A vacinação por BCG parece não influenciar na soropositividade, embora pacientes com duas cicatrizes vacinais apresentem menor positividade ao PGL-1, pela técnica do ELISA. Esse mesmo resultado também foi encontrado por Schuring et al. (2006). Uma associação da soropositividade entre os pacientes vacinados por BCG seria um argumento suplementar para o papel protetor da BCG e poderia confirmar a hipótese de que a vacinação BCG é responsável por uma mudança na resposta imune para o pólo tuberculóide do espectro.

Todos os pacientes PGL-1 positivos apresentaram baciloscopia positiva. Diversos estudos já demonstraram uma forte correlação entre a magnitude da resposta de anticorpos e a baciloscopia (CHO et al., 2001; FERREIRA e ANTUNES, 2008; LYON et al., 2008; CONTIN et al., 2011). Pacientes com baciloscopia positiva são pelo menos 3,4 vezes mais propensos a produzir uma resposta humoral em comparação a controles saudáveis (STEFANI et al., 1998).

Bührer-Sékula et al. (2003) relataram alta concordância entre os testes de ELISA e ML-Flow, tanto em amostras de pacientes quanto de contatos. Em outros estudos, a concordância destes testes em amostras de pacientes também foi elevada (OSKAM et al., 2003; SILVA et al., 2008; DA SILVA et al., 2010). Em nosso estudo a concordância dos testes foi considerada moderada, pois cerca de 16% das amostras divergiram nos resultados. Apesar de que a sensibilidade e especificidade do ELISA e ML-Flow antiPGL-1 apresentarem-se semelhantes, a hipótese da existência de falsos negativos no teste de fluxo lateral não pode ser descartada, uma vez que o método de análise do resultado não é tão minucioso quanto no ELISA (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003). A positividade do ML-Flow

e ELISA também pode variar de acordo com o nível de endemicidade da área geográfica onde é aplicado o teste (SILVA et al., 2008).

Já foi demonstrado que níveis elevados de IgM antiPGL-1 em contactantes constitui um fator de risco para o desenvolvimento de MH (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003; MOET et al., 2004; BAKKER et al., 2006). Em nosso estudo o percentual de positividade ao PGL-1 entre os contatos foi em torno de 12%. A expectativa era encontrar taxas de soroprevalência muito altas em virtude dos elevados CD e prevalência nessa região considerada hiperendêmica. Entretanto, a taxa foi menor ao encontrado em outras regiões (CALADO et al., 2005; CRUZ et al., 2009; DÜPPRE et al., 2012).

Dos 745 contatos avaliados pelo teste ML-Flow 12% foram positivos ao PGL-1. E pela técnica do ELISA, entre os 2140 contatos avaliados 12,5% foram soropositivos ao PGL-1. Andrade et al. (2008) verificaram positividade em 20,5% em contatos no Estado de Minas Gerais. Frota et al. (2010) em estudo realizado em região de alta endemicidade no estado do Ceará, descreveram uma soropositividade de 15,8% entre os contatos, semelhante aos não contactantes de regiões não endêmicas. Outros trabalhos demonstraram positividade menor que a encontrada no grupo amostral de contatos do Maranhão, com valores de soroprevalência entre 2,7% a 10,4% (BAKKER et al., 2004; GOULART et al., 2008).

Essa baixa taxa de soropositividade em uma região considerada hiperendêmica, onde acredita-se haver uma maior disseminação e interação constante com o *M. leprae*, pode ser resultado de uma resposta imunológica mais vigorosa, do tipo celular, que poderia tornar os contatos mais resistentes ao bacilo, apresentando portanto um fraca resposta humoral. Entretanto, quando analisamos os resultados segundo a região de procedência, observamos que contatos de pacientes do município de Açailândia apresentaram um alto percentual de positividade ao ML-Flow, o que não se repetiu pela técnica do ELISA. Estudos mais detalhados precisam ser realizados na região para a confirmação desses achados.

Mesmo não existindo uma vacina específica para *M. leprae*, a utilização de testes sorológicos antiPGL-1 podem ser forte aliados na redução dos índices de MH. Estudos anteriores ao nosso, registraram que os contatos com soropositividade ao PGL-1 possuem 7 vezes mais risco de desenvolver a doença, e 24 vezes mais de desenvolver a forma multibacilar, comparados aos soronegativos (BÜHRER-SEKULA et al., 1998; MOURA et al., 2008; CRUZ et al., 2009). Tais indivíduos merecem ser acompanhados, precocemente diagnosticados e tratados, antes mesmo do aparecimento de sintomas clínicos.

Em nosso estudo não houve diferença na positividade ao PGL-1 entre contatos de pacientes PB e contatos de pacientes MB. Resultado semelhante foi descrito por Barreto et al. (2011). No entanto, grande parte dos achados da literatura mostram níveis elevados de IgM antiPGL-1 nos contatos de pacientes MB e mais baixos em contatos de pacientes PB (MOURA et al., 2008; BARRETO et al., 2011). Em relação ao gênero e idade na maioria dos estudos científicos sobre o comportamento da sorologia demonstra que a positividade ao PGL-1 em contatos é maior nas mulheres e em indivíduos adultos (ANDRADE et al., 2008; BARRETO et al., 2011). Em nosso estudo mulheres apresentaram maior positividade pela técnica do ELISA, mas não houve diferença em relação à idade.

A soropositividade ao PGL-1 foi semelhante entre contatos intradomiciliares e extradomiciliares. Isso pode indicar uma expressão difusa da infecção por hanseníase em determinado local. Douglas et al. (2004) encontraram 17,7% de positividade em amostras de contatos intradomiciliares em Cebu (Filipinas), em um grupo amostral total de 559 contatos. Outros relatos mostram a existência de associação entre a soropositividade ao PGL-1 e os contatos intradomiciliares de casos índices MB (BAKKER et al., 2004; CALADO et al., 2005; ANDRADE et al., 2008).

Também não houve diferença em relação a cicatriz por BCG. Em outros estudos não foram encontradas diferenças na positividade dos contatos em relação ao número de cicatrizes por BCG (FINE et al., 1997; ANDRADE et al., 2008). Esperava-se que a maior porcentagem de positividade fosse encontrada nos contatos que não receberam doses da vacina BCG. No entanto, não há consenso sobre a influência da vacinação com BCG na sorologia antiPGL-1 (FERREIRA e ANTUNES, 2008; BARRETO et al., 2011). Limeira et al. (2013) na avaliação sorológica de contatos domiciliares assintomáticos antes e após a profilaxia com BCG, mostrou uma soroconversão negativa em 20% ao PGL-1.

Estudos têm mostrado que a proteção proporcionada pela vacina BCG é bastante variável (DE MATOS et al., 1999; ZODPEY, AMBADEKAR e THAKUR, 2005). Entretanto, o impacto da vacinação com BCG na redução da incidência da hanseníase já foi demonstrado, por exemplo, por Bakker et al. (2006) e Duppre et al. (2012). A vacina BCG parece ter um efeito protetor, dado que a maioria dos contatos soropositivos vacinados, quando adoecem, parecem desenvolver apenas a forma de PB da hanseníase (DÜPPRE et al., 2012).

No entanto, acredita-se que nem toda infecção subclínica, necessariamente, será expressa por uma resposta sorológica e que a soroprevalência na população pode estar

refletindo exposição e/ou infecção por *M. leprae*, pois a sorologia em si não é capaz de distinguir infecção presente ou passada por esta micobactéria (VAN BEERS et al., 1999; MOURA et al., 2008). Novos casos de hanseníase também surgem nos grupos soronegativos (DÜPPRE et al., 2012).

Todavia, a detecção de anticorpos contra o PGL-1 pode ajudar a identificar contatos domiciliares infectados sem sinais ou sintomas clínicos e pode ser uma ferramenta útil em programas de controle. Lobato et al. (2011) comparou uso de três testes imunológicos para o diagnóstico de MH e detecção de infecção subclínica e demonstrou que a detecção de IgM antiPGL-1 por ELISA pode ser utilizado para detectar a infecção subclínica em hanseníase. Estudos mais aprofundados, bem como o seguimento desses indivíduos seriam de grande interesse para esclarecer se os títulos altos de antiPGL-1 são de fato possíveis marcadores de doença futura.

Quanto ao teste de Mitsuda, o resultado reflete uma variedade de fatores que são de extrema importância na avaliação da susceptibilidade do indivíduo à hanseníase. Em nosso estudo a reação intradérmica foi negativa na maioria dos pacientes, enquanto na maioria dos contatos foi positivo. Resultado positivo demonstra uma alta resposta imune mediada por células com larga resposta do tipo Th1. Uma reação negativa é fator de risco entre os contatos (SARNO et al., 2012). Enquanto contatos com a resposta de Mitsuda positiva constituiu um fator protetor contra o desenvolvimento de MH (GOULART et al., 2008).

O teste de Mitsuda não está padronizado pela OMS para classificação clínica ou para estudos epidemiológicos, uma vez que o sistema de classificação do MH é baseado no número de lesões (WHO, 2000). A resposta celular pode ser um indicador de imunidade protetora adquirido. Assim, sugere-se que a aplicação do teste de Mitsuda em países onde o MH é endêmico pode ser uma ferramenta epidemiológica importante para monitorar contatos domiciliares de pacientes com MH.

A infecção por *M. leprae* induz o desenvolvimento de uma resposta imune celular exacerbada, o que tem sido bem documentado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ao longo dos anos. As citocinas e moléculas relacionadas com a resposta imune parecem ser importantes em decidir o resultado das interações patógeno-hospedeiro nas diferentes formas clínicas de MH. O balanço Th1/Th2 parece ser fator determinante para a forma clínica a ser desenvolvida (SASAKI et al., 2001).

Segundo Lima et al. (2000) as citocinas podem fornecer marcadores úteis de resposta imunológica na hanseníase. Nosso estudo mediu os níveis séricos de citocinas em

pacientes não tratados, em seus contactantes e em controles saudáveis, por meio do ensaio citométrico de esferas ordenadas (CBA). Em muitos estudos essa avaliação tem sido realizada, principalmente, através de culturas de células mononucleares, estimuladas ou não com proteínas do bacilo (FULYA et al., 2006; VENTURINI et al., 2011; YANG et al., 2014). Poucos são os estudos sorológicos e a literatura revela resultados controversos sobre os níveis de citocinas séricas nas várias formas de hanseníase (MADAN et al., 2011). Há uma escassez de registros de dados que comparem os níveis séricos dessas citocinas quantificadas por CBA em pacientes com MH e contactantes.

Nesse estudo, observou-se que pacientes MB e contatos possuem altas concentração sérica de IL-6. Essa concentração foi mais evidente entre os pacientes com as formas dimorfa da doença. Entre os contatos a concentração foi maior naqueles que não possuíam cicatriz vacinal. Estudo realizado na Índia, em pacientes não tratados, mostraram que altos níveis de IL-6 está associado ao pólo virchowiano e baixos níveis ao pólo tuberculóide (BELGAUMKAR et al., 2007). Fulya et al. (2006) também demonstraram alta concentração dessa citocina no sobrenadante de cultura de linfócitos de pacientes virchowianos.

A IL-6 é uma interleucina que exerce propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Foi reconhecida pela primeira vez por sua propriedade de induzir a produção de anticorpos e, portanto, o elevado níveis dessa citocina pode ter alguma influência sobre a hipergamaglobulinemia que caracteriza o pólo virchowiano da hanseníase (OCHOA et al., 1996; MIHARA et al., 2012). É considerada papel chave na inflamação e na reação de fase aguda, que é uma das primeiras respostas a injúrias teciduais. Pode ser produzida por vários tipos de células, incluindo as células T e B, macrófagos, monócitos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos, e pode exercer os seus efeitos sobre qualquer célula (DE OLIVEIRA et al., 2011). É ainda conhecida por estar presente em muitas doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, incluindo a artrite reumatóide, doença de Crohn, artrite juvenil e mieloma múltiplo (FISHMAN et al., 1998). A IL-6 também participa na resposta imune adaptativa na diferenciação de células T em Treg, Th1 ou Th2, e em particular na diferenciação de Th17 (SOUSA et al., 2012). Além disso, ativa astrócitos e micróglia, e regula a expressão de neuropeptídeos após lesão neuronal, contribuindo para sua regeneração (DE OLIVEIRA et al., 2011).

A utilização da IL-6 como um biomarcador tem sido amplamente discutido em diversas doenças, com base nos múltiplos efeitos desta citocina no controle da imunidade

inata e adaptativa (FISMAN e TENENBAUM, 2010). Ela tem sido proposta como um potencial biomarcador para o prognóstico em reações hansênicas (STEFANI et al., 2009; SOUSA et al., 2012; CHAITANYA et al., 2013). No entanto, o papel da IL-6 na imunopatologia da hanseníase, principalmente em contatos, ainda precisa ser mais explorado.

Em nosso estudo, pacientes com a forma virchowiana apresentaram menor concentração de TGF- $\beta$ 1. Dados da literatura descrevem maior quantidade de TGF- $\beta$ 1 em lesões de pacientes virchowianos, com a participação de células Treg (PALERMO et al., 2012; KUMAR et al., 2013; SAINI et al., 2014). Attia et al. (2010) já haviam demonstrado maior frequência de células Treg circulantes em pacientes tuberculóides do que em pacientes virchowianos. Assim, a menor concentração sérica de TGF- $\beta$ 1 em nossos pacientes virchowianos pode ser um reflexo da redistribuição de células Treg a partir do sangue periférico para os locais da doença.

O TGF- $\beta$ 1, isoforma predominante do TGF- $\beta$ , regula os componentes da imunidade adaptativa, tais como as células T, assim como os componentes da imunidade inata, tais como as células NK (*natural killer*) (WAN e FLAVELL, 2007). Tem sido relatado na apoptose de células de Schwann, afetando diretamente a degeneração dos nervos e regeneração levando a lesão da bainha de mielina e axônios (OLIVEIRA et al., 2005). Também impede que os macrófagos sintetizem óxido nítrico, um mecanismo que leva à persistência da bactéria, e que está fortemente implicado no desenvolvimento da dor neuropática (DE OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos mostram que a coestimulação de IL-6 e TGF- $\beta$  são essenciais para a diferenciação de células Th17 e produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ ) (LI et al., 2010; MIHARA et al., 2012). Em nosso estudo, os casos de hanseníase e os seus contatos, apresentaram alta concentração sérica nos níveis de IL-17A, principalmente nos que não possuíam cicatriz vacinal. Isso nos leva a sugerir que a produção da IL-17 pode ser um dos fatores importantes no desenvolvimento da doença, e confirmam a ideia de que as células Th17 parecem ser fundamentais em infecções bacterianas.

Os nossos dados vão de encontro ao observado por Abdallah et al. (2013), em estudo realizado no Egito, que demonstrou menor concentração sérica de IL-17 nos casos de hanseníase em comparação com o controle. Essa divergência de resultados podem estar relacionados às diferenças étnicas entre as duas populações. Já Saini et al. (2013) observou menor concentração de IL-17 somente em pacientes virchowianos, e ainda relatou maior expressão em contatos que conviviam há pelo menos dois anos com o caso. A presença de IL-

17A em contatos sugere que essa citocina pode ser importante na resposta imune adaptativa à infecção precoce por *M. leprae*.

As células Th17 surgiram como um terceiro subconjunto de células Th, que desempenham um papel importante, não só em doenças autoimunes, onde foram primeiramente descritas, mas também em muitas doenças infecciosas e em modelos experimentais (CURTIS e WAY, 2009). Produzem diversas citocinas, sendo a IL-17A a mais importante. Já foi demonstrado que são responsáveis pela imunidade protetora em infecções micobacterianas, sendo efetiva no controle da infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (UMEMURA et al., 2007; TORRADO e COOPER, 2010) e por outras bactérias intracelulares como *Mycoplasma pneumoniae* e *Listeria monocytogenes* (KHADER e GOPAL, 2010). A IL-17A, é capaz ainda de induzir a expressão de IL-6 e CXCL8 (IL-8), citocinas importantes para o recrutamento de células (DE OLIVEIRA et al., 2011).

As quimiocinas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos do organismo. Estas moléculas exercem um papel importante na migração das células linfóides para os tecidos após o contato das células residentes com agentes patogênicos, proporcionando uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa (MOSER E WILLIMANN, 2004). Embora as quimiocinas pareçam estar envolvidas na patogênese do MH, poucos estudos têm sido realizados para desvendar o potencial de quimiocinas como marcadores biológicos da doença (MENDONÇA et al., 2011).

Em nosso estudo observamos maior concentração sérica de CXCL8 entre os contatos de pacientes com hanseníase. Dados similares não foram encontrados na literatura. De fato, ainda não há registros do perfil de quimiocinas em contatos de casos de hanseníase. Níveis elevados de CXCL8 têm sido relatado na hanseníase virchowiana (HASAN et al., 2004). No entanto, em nosso estudo a concentração de CXCL8 em pacientes MB não foi significativa. Guerreiro et al. (2013) chegou a observar baixa expressão de RNAm de CXCL8 em células infectadas por *M. leprae*, sugerindo essa via como uma possível estratégia de sobrevivência para o agente patogênico.

CXCL8 é conhecido como um potente fator quimiotático e ativador de neutrófilos e agente quimiotático para linfócitos (MOSER et al., 2004; DALBONI et al., 2013). É parte importante da resposta inflamatória contra *M. tuberculosis*, estando em elevada concentração no plasma de pacientes com tuberculose (ALESSANDRI et al., 2006). Também tem sido descrito em outras doenças inflamatórias sistêmicas como na sarcoidose e na sepse (STEINBACH et al., 2007; LKHAGVAA et al., 2008).

Maior concentração sérica das quimiocinas CXCL9 (MIG) e CXCL10 (IP-10) foram observadas em nossos pacientes MB. Essa alta concentração foi ainda mais evidente nas formas virchowianas. No entanto nossos dados são controversos ao encontrado na literatura. Não houve diferença significativa na concentração de CXCL9 e CXCL10 no plasma de pacientes com hanseníase em relação ao controle, em estudo realizado por Mendonça et al. (2007). Scollard et al. (2011) encontrou maiores níveis séricos de CXCL10 em todos os grupos de pacientes com hanseníase do que em controles saudáveis. Maior expressão gênica de CXCL9 e CXCL10 parece ainda estar associado à reação hansênica do tipo 1 (SCOLLARD et al., 2011; GELUK et al., 2014). E Geluk et al. (2010) demonstraram que peptídeos de *M. leprae* são capazes de induzir maior produção de CXCL10 no sangue total, indicando o seu uso como um biomarcador.

O aumento da produção desta quimiocina está bem descrito em infecções por outras micobactérias (MÉNDEZ-SAMPERIO et al., 2009; WANG et al., 2012). Os níveis elevados de CXCL10 são observados na tuberculose (WANG et al., 2012), na tripanossomíase (HAINARD et al., 2009), bem como na esclerose múltipla (SZCZUCIŃSKI e LOSY, 2011) e em condições neuroinflamatórias (MÜLLER et al., 2010). Sabe-se que CXCL9 e CXCL10 são consideradas quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$ , desempenhando um papel importante na inflamação, estando tradicionalmente associadas a resposta do tipo Th1 (YOSHIE et al., 2001). Mas, alguns indivíduos com tuberculose, por exemplo, são incapazes de produzir CXCL10 mesmo quando eles produzem níveis normais de IFN- $\gamma$ , sugerindo que IFN- $\gamma$  nem sempre pode ser requerido para produção dessa quimiocina (GOLETTI et al., 2010).

CXCL10 parece ter um importante papel no desenvolvimento de hiper-reatividade das vias aéreas e inflamação alérgica do tipo Th2 na asma experimental (TWOREK et al., 2013). Himmel et al. (2011) demonstrou que células Treg são capazes de produzir quantidades elevadas de CXCL10, bem como de CXCL8. Assim a alta concentração sérica dessas quimiocinas em pacientes MB e contatos de nosso estudo pode ser resultado da maior atuação dessa população celular. Ainda assim, o papel da CXCL9 e CXCL10 em resposta a micobactérias, desperta curiosidade e requer investigações mais aprofundadas na utilização destas quimiocinas como um possível biomarcador no diagnóstico de hanseníase.

Apesar de não haver diferença estatística para a maioria das citocinas e quimiocinas, a análise de correlação demonstrou uma correlação positiva em boa parte delas, tanto nos grupos paucibacilar e multibacilar. Estes dados permitem inferir que não há uma

dicotomia nítida em relação aos padrões de resposta e a evolução da doença, pelo contrário, parece haver um sinergismo dos diferentes padrões de resposta, o que pode depender tanto de fatores genéticos quanto ambientais. Acredita-se em uma contínua interação entre os padrões Th1, Th2, Th17 e Treg na resposta contra patógenos e manutenção da homeostasia (KAIKO et al., 2008; ABRAHAM e CHO, 2009). Th1 e Th17, por exemplo, têm ação concomitante em infecções causadas pelo *M. tuberculosis* e isso pode ser importante pelas consequências imunopatológicas não só na tuberculose, mas também em outras infecções micobacterianas (DAMSKER et al., 2010).

A ausência de modelos experimentais murino, que imitem as formas clínicas da hanseníase, limitam as informações sobre os aspectos da resposta imune na doença. Um dos problemas dos ensaios séricos de citocinas é a dificuldade de reproduzir na circulação os eventos celulares que estão ocorrendo no local da lesão (JASON et al., 2001). Uma outra limitação é a falta de especificidade. A resposta imune celular é dirigida contra um grande número de patógenos e em diversas situações biológicas. Nenhum critério de exclusão específico foi aplicado em nosso estudo para ver a influência simultânea de infecções crônicas, portanto os resultados estão sujeitos a essas variações não específicas. Os resultados são indicativos e não conclusivos, pois não foram analisadas as peculiaridades individuais, mas sim do grupo.

A resposta celular apresentou grande variabilidade de indivíduo para indivíduo, variando de um nível basal a uma forte resposta, mesmo entre os indivíduos dos grupos PB e MB. A distribuição assimétrica dessas variáveis, além de dificultar a análise estatística, pode tornar limitado o seu uso na rotina clínica, pois todo teste que possui uma grande variação interindividual tem uma aplicação prática restrita, principalmente para fins de diagnóstico.

Mesmo não existindo uma vacina específica para *M. leprae*, o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico pode ser um forte aliado no controle da hanseníase, além da ampla e adequada aplicação da poliquimioterapia (PQT). O desenvolvimento de testes de detecção tem sido alvo de pesquisas na última década, principalmente na identificação de doença subclínica. A este respeito, ensaios simples que exigem apenas sangue total, por exemplo, ainda se constitui um desafio, especialmente em áreas endêmicas onde normalmente não possuem laboratórios sofisticados.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo permitem-nos concluir que:

Os aspectos clínicos e epidemiológicos avaliados confirmam o caráter hiperendêmico da hanseníase no Maranhão, o diagnóstico tardio e a manutenção de fatores de riscos para o adoecimento dos contatos. Essas características evidenciam a importância do exame e seguimento de contatos para monitoramento da epidemia nos municípios.

A imunidade humoral é maior em pacientes MB, e nos contatos assemelham-se a de outras regiões não hiperendêmicas.

A soropositividade ao PGL-1 está associada à maioria das variáveis epidemiológicas dos casos, mas não tanto em contatos.

Embora a concordância entre os testes tenha sido moderada, o imunodiagnóstico de anticorpos antiPGL-1 são úteis como marcadores imunológicos em área hiperendêmica para a identificação de quadros de infecção subclínica, principalmente para aqueles com risco de adoecimento.

IL-6, TGF- $\beta$ 1, CXCL9 e CXCL10 parecem importantes na regulação da resposta imune entre os casos das formas MB.

IL-6 e CXCL8 estão envolvidas na resposta imune entre os contatos, refletindo, possivelmente, as diferenças entre a exposição e patogenia do *M. leprae*. Entretanto, não é possível determinar os que têm resposta imune protetora daqueles que poderão manifestar clinicamente a hanseníase.

O perfil de citocinas e quimiocinas é mais evidente, principalmente, àqueles indivíduos sem cicatriz vacinal por BCG.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M. et al. Estimation of serum level of interleukin-17 and interleukin-4 in leprosy, towards more understanding of leprosy immunopathogenesis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 79, n. 6, p. 772-6, 2013.
- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v. 361, n. 21, p. 2066-78, Nov 2009..
- AKAMA, T. et al. Analysis of Mycobacterium leprae gene expression using DNA microarray. **Microb Pathog**, v. 49, n. 4, p. 181-5, Oct 2010..
- ALENCAR, C. H. et al. Persisting leprosy transmission despite increased control measures in an endemic cluster in Brazil: the unfinished agenda. **Lepr Rev**, v. 83, n. 4, p. 344-53, Dec 2012.
- ALESSANDRI, A. L. et al. Concentrations of CXCL8, CXCL9 and sTNFR1 in plasma of patients with pulmonary tuberculosis undergoing treatment. **Inflamm Res**, v. 55, n. 12, p. 528-33, Dec 2006..
- ALTER, A. et al. Leprosy as a genetic disease. **Mamm Genome**, v. 22, n. 1-2, p. 19-31, Feb 2011.
- ALVES, C. J. et al. [Evaluation of the degree of incapacity of patients with a diagnosis of leprosy at a dermatology service in the state of São Paulo]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 460-1, 2010.
- AMADOR, M. P. S. C. et al. Hanseníase na infância no município de Curionópolis - sudeste do Estado do Para - relato de caso. **Hansenol Int**, Bauru, v. 26, p. 6, 2001.
- ANDRADE, A. R. et al. Seroprevalence of ML Flow test in leprosy contacts from State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 56-9, 2008.
- ANTAS, P. R. et al. Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 8, p. 1119-29, Aug 2004.
- AQUINO, D. M. et al. [Profile of leprosy patients in a hiperendemic area of Amazonian Maranhão, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 1, p. 57-64, 2003.
- ARANTES, C. K. et al. Avaliação dos serviços de saúde em relação ao diagnóstico precoce da hanseníase. **Epidemiol Serv Saude**, v. 19, p. 9, 2010.
- ARAÚJO, M. G. [Leprosy in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 3, p. 373-82, 2003.
- ASTARIE-DEQUEKER, C. et al. The role of mycobacterial lipids in host Pathogenesis. **Drug Discov. Today Dis. Mech**, v. 7, n. 1, p. 11, 2010.
- ATTIA, E. A. et al. Circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. **Int J Dermatol**, v. 49, n. 10, p. 1152-8, Oct 2010.

AVELLEIRA, J. C. R. et al. Persistência de bacilos viáveis em pacientes de hanseníase multibacilar altamente bacilíferos após doze doses do esquema poliquimioterápico (PQT/OMS). **Hansenol Int**, v. 28, n. 1, p. 4, 2003.

BAKKER, M. I. et al. Population survey to determine risk factors for Mycobacterium leprae transmission and infection. **Int J Epidemiol**, v. 33, n. 6, p. 1329-36, Dec 2004.

\_\_\_\_\_. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. **Lepr Rev**, v. 77, n. 1, p. 48-61, Mar 2006.

BAPTISTA, I. M. F. D.; SARTORI, B. C. S.; TRINO, L. M. Guia de conduta para realização do exame baciloscópico. **Hansenol Int**, v. 31, n. 2, p. 4, 2006.

BARBIERI, C. L. A.; MARQUES, H. H. S. Hanseníase em crianças e adolescentes: revisão bibliográfica e situação atual no Brasil. **Pediatria**, v. 31, n. 4, p. 9, 2009.

BARKER, L. P. Mycobacterium leprae interactions with the host cell: recent advances. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 6, p. 748-59, Jun 2006..

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. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 358-70, Dec 2011..

BASSO, A. S.; CHEROUTRE, H.; MUCIDA, D. More stories on Th17 cells. **Cell Res**, v. 19, n. 4, p. 399-411, Apr 2009.

BEDOYA, S. K. et al. Th17 cells in immunity and autoimmunity. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, p. 986789, 2013.

BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Rev. Ciência e S. Col.**, v. 7, n. 1, p. 11, 2002.

BELGAUMKAR, V. A. et al. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. **Lepr Rev**, v. 78, n. 3, p. 223-30, Sep 2007..

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235-8, May 2006.

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2012, p. 181089, 2012.

BHUSHAN, P. et al. Diagnosing multibacillary leprosy: a comparative evaluation of diagnostic accuracy of slit-skin smear, bacterial index of granuloma and WHO operational classification. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 74, n. 4, p. 322-6, 2008 Jul-Aug 2008.

BLAU, S.; YAGODIN, V. Osteoarchaeological evidence for leprosy from western Central Asia. **Am J Phys Anthropol**, v. 126, n. 2, p. 150-8, Feb 2005..

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Guia para o controle da hanseníase**. Brasília, 2002.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Assessoria de Comunicação Social. **Hanseníase**. Informe Saúde, n. 198. Brasília, 2003.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Hanseníase**. In: Guia de vigilância epidemiológica, 6 ed., p. 364, Brasília, 2005.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de prevenção de incapacidades: cadernos de prevenção e reabilitação em hanseníase**. n. 1, p. 135, Brasília, 2008a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil**. Informe Epidemiol, n. 1, p. 12, Brasília, 2008b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde **Nota Técnica N.º10/DEVEP/SVS/MS: Atualização da indicação da vacina BCG-ID**. Brasília, 2010a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Roteiro para Uso do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan NET HANSENÍASE**. Brasília, 2010b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015**. Brasília, 2012.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação**. Bol Epidemiol, n. 44, p. 12, Brasília, 2013.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Hanseníase: casos confirmados notificados no SINAN-NET**, Brasília, 2014. Disponível em: <  
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/hanseniaze/bases/Hansbrnet.def>  
>. Acesso em: 21 fev., 2014.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-19, Apr 2004.

BROWNE, S. G. Some aspects of the history of leprosy: the leprosie of yesterday. **Proc R Soc Med**, v. 68, n. 8, p. 485-93, Aug 1975.

BÜHRER-SEKULA, S. et al. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to Mycobacterium leprae: a field evaluation. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 21, n. 3, p. 197-201, Jul 1998.

BÜHRER-SÉKULA, S. PGL-I leprosy serology. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 3-5, 2008.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. **Acta Trop**, v. 111, n. 2, p. 172-6, Aug 2009.

\_\_\_\_\_. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 1991-5, May 2003.

CALADO, K. L. et al. Positividade sorológica antiPGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. **An. Bras. Dermatol.**, v. 30, n. supl III, p. 6, 2005.

CHACHA, J. J. et al. [Peripheral nervous system and grounds for the neural insult in leprosy]. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 5, p. 495-500, 2009 Sep-Oct 2009.

CHAITANYA, V. S. et al. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. **Immunol Lett**, v. 156, n. 1-2, p. 159-67, 2013.

CHO, S. N. et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 1, p. 138-42, Jan 2001.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-11, Feb 2001.

CONTIN, L. A. et al. Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 1, p. 91-5, 2011 Jan-Feb 2011.

CORRÊA, R. A. G. et al. Epidemiological, clinical, and operational aspects of leprosy patients assisted at a referral service in the state of Maranhão, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 1, p. 89-94, Feb 2012.

CRUZ, R. C.; CUNHA, M. G. S.; VÁSQUEZ, F. G. Prevalência de anticorpo anti PGL-1 em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase. **Cad Saúde Colet**, v. 17, n. 1, p. 10, 2009.

CURTIS, M. M.; WAY, S. S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 177-85, Feb 2009..

D'ELIOS, M. M. et al. T-cell response to bacterial agents. **J Infect Dev Ctries**, v. 5, n. 9, p. 640-5, Sep 2011.

DA SILVA, R. C. et al. Correlation between ELISA and ML Flow assays applied to 60 Brazilian patients affected by leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 8, p. 546-50, Aug 2010.

DA SILVA SOUZA, C.; BACHA, J. T. Delayed diagnosis of leprosy and the potential role of educational activities in Brazil. **Lepr Rev**, v. 74, n. 3, p. 249-58, Sep 2003.

DALBONI, T. M. et al. Activation profile of CXCL8-stimulated neutrophils and aging. **Cytokine**, v. 61, n. 3, p. 716-9, Mar 2013.

DAMSKER, J. M.; HANSEN, A. M.; CASPI, R. R. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1183, p. 211-21, Jan 2010.

DE AQUINO, D. M.; SANTOS, J. S.; COSTA, J. M. [Assessment of a leprosy control program in a hyperendemic county in the State of Maranhão, Brazil, 1991-1995]. **Cad Saude Publica**, v. 19, n. 1, p. 119-25, 2003.

DE MATOS, H. J. et al. [Leprosy epidemiology in a cohort of household contacts in Rio de Janeiro (1987-1991)]. **Cad Saude Publica**, v. 15, n. 3, p. 533-42, 1999.

DE OLIVEIRA, C. M. et al. Cytokines and pain. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 61, n. 2, p. 255-9, 260-5, 137-42, 2011 Mar-Apr 2011.

DE ROJAS, V.; HERNÁNDEZ, O.; GIL, R. Some factors influencing delay in leprosy diagnosis. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 28, n. 2, p. 156-62, Jun 1994.

DE SOUZA, F. C. et al. [Comparative study between the Mitsuda test and the human leukocyte antigens in leprosy patients]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 188-91, 2007.

DEPS, P. D. et al. Characteristics of known leprosy contact in a high endemic area in Brazil. **Lepr Rev**, v. 77, n. 1, p. 34-40, Mar 2006.

DESSUNTI, E. M. et al. [Leprosy: control of household contacts in the municipality of Londrina-PR for a ten-year period]. **Rev Bras Enferm**, v. 61 Spec No, p. 689-93, 2008.

DINIZ, L. M. et al. [Retrospective study on leprosy relapse in the State of Espírito Santo]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 4, p. 420-4, 2009.

DONOGHUE, H. D. et al. Co-infection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium leprae in human archaeological samples: a possible explanation for the historical decline of leprosy. **Proc Biol Sci**, v. 272, n. 1561, p. 389-94, Feb 2005.

DOUGLAS, J. T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 5, p. 897-900, Sep 2004.

DUARTE-CUNHA, M. et al. [Epidemiological aspects of leprosy: a spatial approach]. **Cad Saude Publica**, v. 28, n. 6, p. 1143-55, Jun 2012.

DURÃES, S. M. et al. Epidemiologic study of 107 cases of families with leprosy in Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 3, p. 339-45, 2010 May-Jun 2010.

DURÃES, S. M. B. et al. Estudo de 20 focos familiares de hanseníase no município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. Suppl. 3, p. 5, 2005.

DUTHIE, M. S.; GILLIS, T. P.; REED, S. G. Advances and hurdles on the way toward a leprosy vaccine. **Hum Vaccin**, v. 7, n. 11, p. 1172-83, Nov 2011..

DÜPPRE, N. C. et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 102, n. 7, p. 631-8, Jul 2008.

\_\_\_\_\_. Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, p. e1711, 2012.

EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. **Actas Dermosifiliogr**, v. 104, n. 7, p. 554-63, Sep 2013.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Soc**, v. 13, n. 2, p. 12, 2004.

EIGLMEIER, K. et al. The integrated genome map of *Mycobacterium leprae*. **Lepr Rev**, v. 72, n. 4, p. 462-9, Dec 2001.

FERREIRA, M. A.; ANTUNES, C. M. Factors associated with ML Flow test seropositivity in leprosy patients and household contacts under the age of 18. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 60-6, 2008.

FIGUEIREDO, I. A.; DA SILVA, A. A. [Increase in leprosy detection rates in São Luís, Maranhão, Brazil, from 1993 to 1998: is the endemic expanding?]. **Cad Saude Publica**, v. 19, n. 2, p. 439-45, 2003.

FINE, P. E. Leprosy: what is being "eliminated"? **Bull World Health Organ**, v. 85, n. 1, p. 2, Jan 2007.

FINE, P. E. et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **Am J Epidemiol**, v. 146, n. 1, p. 91-102, Jul 1997.

FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, v. 102, n. 7, p. 1369-76, Oct 1998.

FISMAN, E. Z.; TENENBAUM, A. The ubiquitous interleukin-6: a time for reappraisal. **Cardiovasc Diabetol**, v. 9, p. 62, 2010.

FORMENTI, L. Brasil abandona compromisso com meta de eliminar hanseníase. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 3 abr, 2009. Disponível em: < <http://www.estadao.com.br/noticias/vidae,brasil-abandona-compromisso-com-meta-de-eliminar-hansenise,349731,0.htm> >. Acesso em: 20 fev., 2014.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase **Medicina**, v. 30, n. 3, p. 4, 1997.

FROTA, C. C. et al. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 7, p. 490-5, Jul 2010.

FULYA, I. et al. Cytokine measurement in lymphocyte culture supernatant of inactive lepromatous leprosy patients. **Indian J Med Microbiol**, v. 24, n. 2, p. 121-3, Apr 2006.

GARCIA-SUBIRATS, I. et al. Barriers in access to healthcare in countries with different health systems. A cross-sectional study in municipalities of central Colombia and north-eastern Brazil. **Soc Sci Med**, v. 106, p. 204-13, Apr 2014.

GELUK, A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. **Expert Opin Med Diagn**, v. 7, n. 3, p. 265-74, May 2013.

GELUK, A. et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. **J Immunol**, v. 188, n. 10, p. 4782-91, May 2012.

\_\_\_\_\_. Enhancing sensitivity of detection of immune responses to Mycobacterium leprae peptides in whole-blood assays. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 6, p. 993-1004, Jun 2010.

\_\_\_\_\_. Longitudinal immune responses and gene expression profiles in type 1 leprosy reactions. **J Clin Immunol**, v. 34, n. 2, p. 245-55, Feb 2014.

GHAYAS, A. S.; SAAIQ, M.; MAHMOOD-UR-RAHMAN. Clinical observations in leprosy cases treated at Diamer district of Gilgit-Baltistan, Pakistan. **J Pak Med Assoc**, v. 63, n. 11, p. 1415-7, Nov 2013.

GOLETTI, D. et al. IFN-gamma, but not IP-10, MCP-2 or IL-2 response to RD1 selected peptides associates to active tuberculosis. **J Infect**, v. 61, n. 2, p. 133-43, Jul 2010.

GONÇALVES, S. D.; SAMPAIO, R. F.; ANTUNES, C. M. [Predictive factors of disability in patients with leprosy]. **Rev Saude Publica**, v. 43, n. 2, p. 267-74, Apr 2009.

GORMUS, B. J.; MEYERS, W. M. Under-explored experimental topics related to integral mycobacterial vaccines for leprosy. **Expert Rev Vaccines**, v. 2, n. 6, p. 791-804, Dec 2003.

GOULART, I. M. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 1, p. 101-5, Jan 2008.

GOULART, I. M.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Arch Dermatol Res**, v. 300, n. 6, p. 269-90, Jul 2008.

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to Mycobacterium leprae]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 4, p. 365-75, 2002 Jul-Aug 2002.

GOULART, L. R.; GOULART, I. M. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Arch Dermatol Res**, v. 301, n. 2, p. 123-37, Feb 2009.

GUERREIRO, L. T. et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e64748, 2013.

GUERRERO, M. I.; MUVDI, S.; LEÓN, C. I. [Delay in leprosy diagnosis as a predictor of disability in a cohort of patients in Colombia, 2000-2010]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 33, n. 2, p. 137-43, Feb 2013..

- HAINARD, A. et al. A combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP panel for the staging of human African trypanosomiasis patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 6, p. e459, 2009.
- HASAN, Z. et al. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 72, n. 1, p. 35-44, Mar 2004.
- HETT, E. C.; RUBIN, E. J. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 72, n. 1, p. 126-56, table of contents, Mar 2008.
- HIMMEL, M. E. et al. Human CD4+ FOXP3+ regulatory T cells produce CXCL8 and recruit neutrophils. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 2, p. 306-12, Feb 2011.
- HULSE, E. V. Leprosy and ancient Egypt. **Lancet**, v. 2, n. 7788, p. 1203-4, Dec 1972.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Populacional 2010**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/> >. Acesso em: 15 dez. 2013.
- ILANGUMARAN, S. et al. Integration of mycobacterial lipoarabinomannans into glycosylphosphatidylinositol-rich domains of lymphomonocytic cell plasma membranes. **J Immunol**, v. 155, n. 3, p. 1334-42, Aug 1995..
- IMBIRIBA, E. B. et al. Epidemiological profile of leprosy in children under 15 in Manaus (Northern Brazil), 1998-2005. **Rev Saude Publica**, v. 42, n. 6, p. 1021-6, Dec 2008.
- IMESC. Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos. **Cartografia: Análise específica**. Mapa 18. São Luís, 2014. Disponível em: < <http://www.imesc.ma.gov.br/pages/menu.php?subsecao=6> >. Acesso em: 5 abr 2014.
- JASON, J. et al. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 6, p. 1097-103, Nov 2001.
- JINDAL, N. et al. Clinico-epidemiological trends of leprosy in Himachal Pradesh: a five year study. **Indian J Lepr**, v. 81, n. 4, p. 173-9, 2009.
- KAIKO, G. E. et al. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? **Immunology**, v. 123, n. 3, p. 326-38, Mar 2008.
- KAIMAL, S.; THAPPA, D. M. Relapse in leprosy. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 75, n. 2, p. 126-35, 2009.
- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol**, v. 1, n. 1, p. 244-257, 2013.
- KERR-PONTES, L. R. et al. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. **Int J Epidemiol**, v. 35, n. 4, p. 994-1000, Aug 2006.

KHADER, S. A. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Nat Immunol**, v. 8, n. 4, p. 369-77, Apr 2007.

KHADER, S. A.; COOPER, A. M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**, v. 41, n. 2, p. 79-83, Feb 2008.

KHADER, S. A.; GOPAL, R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 423-7, 2010 Sep-Oct 2010.

KIMURA, A.; NAKA, T.; KISHIMOTO, T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 29, p. 12099-104, Jul 2007.

KRUTZIK, S. R. et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat Med**, v. 11, n. 6, p. 653-60, Jun 2005.

KUMAR, S. et al. CD4+CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. **Mol Immunol**, v. 56, n. 4, p. 513-20, Dec 2013.

LANA, F.C.F. et al. Distribuição da hanseníase segundo sexo no Município de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. **Hansenol Int**, v. 28, p. 6, 2003.

\_\_\_\_\_. Detecção da hanseníase e Índice de Desenvolvimento Humano dos municípios de Minas Gerais, Brasil. **Rev Eletr Enf**, v. 11, n. 3, p. 5, 2009.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. **Rev. Diag. Trat.**, v. 17, n. 4, p. 6, 2012.

LEITE, K. K. et al. Perfil epidemiológico dos contatos de casos de hanseníase em área hiperendêmica na Amazônia do Maranhão. **Cad Saúde Col**, v. 17, n. 1, p. 14, 2009.

LI, L. et al. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. **J Clin Invest**, v. 120, n. 1, p. 331-42, Jan 2010..

LI, M. O.; FLAVELL, R. A. TGF-beta: a master of all T cell trades. **Cell**, v. 134, n. 3, p. 392-404, Aug 2008.

LIKOVSKY, J. et al. Two cases of leprosy from Zatec (Bohemia) dated to the turn of the 12th century and confirmed by DNA analysis for *Mycobacterium leprae*. **J Archaeol Sci**, v. 33, p. 7, 2006.

LIMA, M. C. et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. **Scand J Immunol**, v. 51, n. 4, p. 419-28, Apr 2000.

LIMEIRA, O. M. et al. Active search for leprosy cases in Midwestern Brazil: a serological evaluation of asymptomatic household contacts before and after prophylaxis with bacillus Calmette-Guérin. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 55, n. 3, 2013.

LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-53, 2009.

LKHAGVAA, B. et al. Bestatin, an inhibitor for aminopeptidases, modulates the production of cytokines and chemokines by activated monocytes and macrophages. **Cytokine**, v. 44, n. 3, p. 386-91, Dec 2008.

LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 389-401, Dec 2011.

LOCKWOOD, D. Leprosy. **Clin Evid**, n. 15, p. 1079-87, Jun 2006.

LOCKWOOD, D. N.; SARNO, E.; SMITH, W. C. Classifying leprosy patients--searching for the perfect solution? **Lepr Rev**, v. 78, n. 4, p. 317-20, Dec 2007.

LOCKWOOD, D. N. et al. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 12, p. e1327, Dec 2011.

LUSTOSA, A. A. et al. The impact of leprosy on health-related quality of life. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 621-6, Oct 2011. ISSN 1678-9849. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031079> >.

LYON, S. et al. Association of the ML Flow serologic test to slit skin smear. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 23-6, 2008.

\_\_\_\_\_. A comparison of ML Flow serology and slit skin smears to assess the bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil. **Lepr Rev**, v. 79, n. 2, p. 162-70, Jun 2008.

LÁZARO, F. P. et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. **J Infect Dis**, v. 201, n. 10, p. 1598-605, May 2010.

MADAN, N. K.; AGARWAL, K.; CHANDER, R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 371-82, Dec 2011.

MAEDA, Y. et al. Assessment of cell mediated immunogenicity of Mycobacterium leprae-derived antigens. **Cell Immunol**, v. 222, n. 1, p. 69-77, Mar 2003.

MANCHESTER, K. Tuberculosis and leprosy in antiquity: an interpretation. **Med Hist**, v. 28, n. 2, p. 162-73, Apr 1984.

MANICKAM, P. et al. Efficacy of single-dose chemotherapy (rifampicin, ofloxacin and minocycline-ROM) in PB leprosy patients with 2 to 5 skin lesions, India: randomised double-blind trial. **Indian J Lepr**, v. 84, n. 3, p. 195-207, 2012 Jul-Sep 2012.

MARANHÃO. Secretaria de Estado da Saúde. Secretaria Adjunta de Vigilância em Saúde. **Hanseníase: Indicadores selecionados segundo município – Maranhão**. São Luís, 2012.

MARIOTTI, V. et al. Probable early presence of leprosy in Europe in a Celtic skeleton of the 4th-3rd century BC. **Int J Osteoarch**, v. 15, p. 14, 2005.

MARTINEZ, T. S. et al. Oral mucosa as a source of Mycobacterium leprae infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 11, p. 1653-8, Nov 2011.

MARTINIUK, F. et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **J Drugs Dermatol**, v. 11, n. 5, p. 626-30, May 2012.

MASSONE, C.; BRUNASSO, A. M. G. Classification. In: ENZI, E.; MASSONE, C. **Leprosy: a Practical Guide**, chap. 6, p. 46, Springer Pub., New York, 2012.

MASSONE, C. et al. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? **Am J Dermatopathol**, v. 32, n. 3, p. 251-6, May 2010.

MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Rev Bras Alerg Immunopatol**, v. 32, n. 5, p. 4, 2009.

MENDONÇA, V. A. et al. Expression of the chemokine receptor CXCR4 on lymphocytes of leprosy patients. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 12, p. 1256-60, Dec 2011.

\_\_\_\_\_. Differentiation of patients with leprosy from non-infected individuals by the chemokine eotaxin/CCL11. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 3, p. 547-50, Sep 2007..

\_\_\_\_\_. Imunologia da hanseníase. **An Bras Dermatol**, v. 83, n. 4, p. 7, 2008.

MERLE, C. S.; CUNHA, S. S.; RODRIGUES, L. C. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. **Expert Rev Vaccines**, v. 9, n. 2, p. 209-22, Feb 2010.

MIHARA, M. et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 122, n. 4, p. 143-59, Feb 2012.

MIRANZI, S. E. S.; PEREIRA, L. H.; NUNES, A. A. [Epidemiological profile of leprosy in a Brazilian municipality between 2000 and 2006]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 1, p. 62-7, 2010.

MISCH, E. A. et al. Leprosy and the human genome. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 4, p. 589-620, Dec 2010.

MOCELLIN, S. et al. The dual role of IL-10. **Trends Immunol**, v. 24, n. 1, p. 36-43, Jan 2003.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **J Invest Dermatol**, v. 102, n. 6, p. 828-32, Jun 1994.

\_\_\_\_\_. The innate immune response in leprosy. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 1, p. 48-54, Feb 2010.

MOET, F. J. et al. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Lepr Rev**, v. 75, n. 4, p. 310-26, Dec 2004.

\_\_\_\_\_. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. **J Infect Dis**, v. 193, n. 3, p. 346-53, Feb 2006.

MONOT, M. et al. On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040-2, May 2005.

MOONEY, J. **Illustrated Dictionary of Podiatry and Foot Science**. Elsevier Health Sciences Pub., London, 2009.

MOSER, B.; WILLIMANN, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. **Ann Rheum Dis**, v. 63 Suppl 2, p. ii84-ii89, Nov 2004.

MOSER, B. et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol**, v. 25, n. 2, p. 75-84, Feb 2004.

MOURA, R. S. et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 11-8, 2008.

MURTO, C. et al. Factors associated with migration in individuals affected by leprosy, maranhão, Brazil: an exploratory cross-sectional study. **J Trop Med**, v. 2013, p. 495076, 2013.

MÉNDEZ-SAMPERIO, P.; PÉREZ, A.; RIVERA, L. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced activation of PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways regulates expression of CXCL10 in epithelial cells. **Cell Immunol**, v. 256, n. 1-2, p. 12-8, 2009.

MÜLLER, M. et al. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 36, n. 5, p. 368-87, Aug 2010.

NAIK, V. B. et al. Evaluation of significance of skin smears in leprosy for diagnosis, follow-up, assessment of treatment outcome and relapse. . **Asiatic J Biotechnol Res**, v. 2, n. 5, p. 5, 2011.

NARANG, T. et al. Comparative evaluation of immunotherapeutic efficacy of BCG and mw vaccines in patients of borderline lepromatous and lepromatous leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 73, n. 2, p. 105-14, Jun 2005.

NATH, I. et al. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. **Immunol Lett**, v. 75, n. 1, p. 69-76, Dec 2000.

OCHOA, M. T. et al. Lepromatous and tuberculoid leprosy: clinical presentation and cytokine responses. **Int J Dermatol**, v. 35, n. 11, p. 786-90, Nov 1996.

OFOSU, A. A.; BONSU, G. Case control study to determine the factors associated with leprosy in the sene district, brong ahafo region of ghana. **Ghana Med J**, v. 44, n. 3, p. 93-7, Sep 2010.

OLIVEIRA, L. S. et al. [Access to primary health care in a sanitary district of Salvador]. **Cien Saude Colet**, v. 17, n. 11, p. 3047-56, Nov 2012.

OLIVEIRA, R. B. et al. Cytokines and Mycobacterium leprae induce apoptosis in human Schwann cells. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 64, n. 10, p. 882-90, Oct 2005.

OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 3, p. 2, 2005.

OSKAM, L.; SLIM, E.; BÜHRER-SÉKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. **Lepr Rev**, v. 74, n. 3, p. 196-205, Sep 2003.

PALERMO, M. L. et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 878-83, May 2012.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1133-41, Nov 2005.

PECK, A.; MELLINS, E. D. Precarious balance: Th17 cells in host defense. **Infect Immun**, v. 78, n. 1, p. 32-8, Jan 2010.

PIMENTEL, M. I. F. et al. Influência do tempo de evolução prévio ao diagnóstico nas incapacidades presentes no exame inicial de pacientes portadores de hanseníase multibacilar. **Hansenol Int**, v. 27, n. 2, p. 5, 2002.

PINHEIRO, R. O. et al. Mycobacterium leprae-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiol**, v. 6, n. 2, p. 217-30, Feb 2011.

PINHO J. R. R.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; SCHENBERG, A. C. Os diferentes testes cutâneos existentes para acompanhamento de pacientes com hanseníase. **Hansenol Int**, v. 23, n. 1/2, p. 3, 1998.

PNUD. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. **Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil 2013**. Disponível em: < <http://atlasbrasil.org.br/2013/pt/consulta> 2013 >. Acesso em: 03 Fev. 2014.

POLYCARPOU, A.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. New findings in the pathogenesis of leprosy and implications for the management of leprosy. **Curr Opin Infect Dis**, v. 26, n. 5, p. 413-9, Oct 2013.

PÖNNIGHAUS, J. M. et al. Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi. **Lancet**, v. 339, n. 8794, p. 636-9, Mar 1992.

RAHAT, M. A.; HEMMERLEIN, B. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide. **Front Physiol**, v. 4, p. 144, 2013.

- RAMAN, V. S. et al. Vaccination with the ML0276 antigen reduces local inflammation but not bacterial burden during experimental *Mycobacterium leprae* infection. **Infect Immun**, v. 77, n. 12, p. 5623-30, Dec 2009.
- RAMBUKKANA, A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. **Curr Opin Immunol**, v. 16, n. 4, p. 511-8, Aug 2004.
- RANQUE, B.; ALBEL, L.; ALCAÏS, A. La lèpre, une maladie éliminée... ou négligée? . **Antibiotiques**, v. 9, p. 115, 2007.
- REVEIZ, L.; BUENDÍA, J. A.; TÉLLEZ, D. Chemoprophylaxis in contacts of patients with leprosy: systematic review and meta-analysis. **Rev Panam Salud Publica**, v. 26, n. 4, p. 341-9, Oct 2009.
- RIDLEY, D. S. Reactions in leprosy. **Lepr Rev**, v. 40, n. 2, p. 77-81, Apr 1969.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966.
- ROBBINS, G. et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5669, 2009.
- RODRIGUES, L. C. et al. Long lasting BCG protection against leprosy. **Vaccine**, v. 25, n. 39-40, p. 6842-4, Sep 2007.
- ROMAGNANI, S. Human Th17 cells. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 2, p. 206, 2008.
- SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4<sup>+</sup> Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2338, 2013.
- \_\_\_\_\_. Increase in TGF- $\beta$  secreting CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2639, Jan 2014..
- SALES, A. M. et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e1013, 2011.
- \_\_\_\_\_. No difference in leprosy treatment outcomes comparing 12- and 24-dose multidrug regimens: a preliminary study. **Cad Saude Publica**, v. 23, n. 4, p. 815-22, Apr 2007..
- SARNO, E. N. et al. Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1054-9, Dec 2012.
- SASAKI, S. et al. *Mycobacterium leprae* and leprosy: a compendium. **Microbiol Immunol**, v. 45, n. 11, p. 729-36, 2001.
- SBD. Sociedade Brasileira de Dermatologia. SBD discute meta de eliminação da hanseníase no Brasil em 2005. **Jornal da SBD**, n. 9, p. 2, 2005.

SCHEELBEEK, P. F. et al. A retrospective study of the epidemiology of leprosy in Cebu: an eleven-year profile. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, p. e2444, 2013.

SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 2, p. 163-89, Feb 2004.

SCHURING, R. P. et al. Association between anti-pGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy. **Lepr Rev**, v. 77, n. 4, p. 343-55, Dec 2006.

SCOLLARD, D. M. The biology of nerve injury in leprosy. **Lepr Rev**, v. 79, n. 3, p. 242-53, Sep 2008.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 338-81, Apr 2006.

\_\_\_\_\_. Increased CXC ligand 10 levels and gene expression in type 1 leprosy reactions. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 6, p. 947-53, Jun 2011.

SILVA, A. R. et al. Leprosy in Buriticupu, state of Maranhão: active search in the general population. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 2, p. 199-202, 2012 Mar-Apr 2012.

SILVA, R. C. et al. The result patterns of ML Flow and ELISA (PGL-I) serologic tests in leprosy-endemic and non-endemic areas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 19-22, 2008.

SINGH, A.; WENG, X.; NATH, I. Skin Biopsy in Leprosy. In: KHOPKA, U. **Skin Biopsy - Perspectives**, chap. 5, p. 336, InTech Pub., Rijeka, 2011.

SOARES DE LIMA, C. et al. Mapping the laminin-binding and adhesive domain of the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*. **Microbes Infect**, v. 7, n. 9-10, p. 1097-109, Jul 2005.

SOUSA, A. A. et al. Adesão ao tratamento da hanseníase por pacientes acompanhados em Unidades Básicas de Saúde de Imperatriz-MA. **SANARE - Rev Saude Pub**, v. 12, n. 1, p. 6, 2013.

SOUSA, A. L. et al. Genetic and immunological evidence implicates interleukin 6 as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction. **J Infect Dis**, v. 205, n. 9, p. 1417-24, May 2012.

SOUSA, M. W. et al. Epidemiological profile of leprosy in the Brazilian state of Piauí between 2003 and 2008. **An Bras Dermatol**, v. 87, n. 3, p. 389-95, 2012 May-Jun 2012.

STEFANI, M. M. et al. Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 124-31, Dec 2012.

\_\_\_\_\_. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 75, 2009.

\_\_\_\_\_. Assessment of anti-PGL-I as a prognostic marker of leprosy reaction. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 66, n. 3, p. 356-64, Sep 1998.

STEINBACH, G. et al. Comparison of whole blood interleukin-8 and plasma interleukin-8 as a predictor for sepsis in postoperative patients. **Clin Chim Acta**, v. 378, n. 1-2, p. 117-21, Mar 2007.

SUZUKI, K. et al. Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives. **J Dermatol**, v. 39, n. 2, p. 121-9, Feb 2012.

SZCZUCIŃSKI, A.; LOSY, J. CCL5, CXCL10 and CXCL11 chemokines in patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis. **Neuroimmunomodulation**, v. 18, n. 1, p. 67-72, 2011.

TAHERIAN, M. et al. The role of interleukin-23 in stability of in vitro T helper-17 cells. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 13, n. 2, p. 131-7, Apr 2014.

TALHARI, S. Hanseníase: situação atual. **An. Bras. Dermatol.**, v. 69, n. 3, p. 6, 1994.

TAYLOR, G. M. et al. A mediaeval Case of Lepromatous Leprosy from 13–14th Century Orkney, Scotland. **J Archaeol Sci**, v. 27, p. 5, 2000.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 21, n. 6, p. 455-62, Dec 2010.

TWOREK, D. et al. MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) and I-TAC (CXCL11) concentrations after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. **Arch Med Sci**, v. 9, n. 5, p. 849-53, Oct 2013.

UMEMURA, M. et al. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. **J Immunol**, v. 178, n. 6, p. 3786-96, Mar 2007.

VAN BEERS, S.; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among school children as an indicator of leprosy endemicity. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 67, n. 3, p. 243-9, Sep 1999.

VAN BRAKEL, W. H. et al. Disability in people affected by leprosy: the role of impairment, activity, social participation, stigma and discrimination. **Glob Health Action**, v. 5, 2012.

VAN VEEN, N. H.; MEIMA, A.; RICHARDUS, J. H. The relationship between detection delay and impairment in leprosy control: a comparison of patient cohorts from Bangladesh and Ethiopia. **Lepr Rev**, v. 77, n. 4, p. 356-65, Dec 2006.

VENTURINI, J. et al. In vitro and skin lesion cytokine profile in Brazilian patients with borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy. **Lepr Rev**, v. 82, n. 1, p. 25-35, Mar 2011.

VIDAL PESSOLANI, M. C. et al. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? **Microbes Infect**, v. 5, n. 7, p. 677-84, Jun 2003.

VIEIRA, C. S. et al. [Evaluation and control of missing contacts of leprosy patients]. **Rev Bras Enferm**, v. 61 Spec No, p. 682-8, 2008.

VIJAYAKUMARAN, P. Fixed duration therapy (FDT) in MB leprosy (clinicobacteriological experience). **Indian J Lepr**, v. 68, n. 3, p. 297-300, 1996.

VIJAYAKUMARAN, P. et al. Chemoprophylaxis against leprosy: expectations and methodology of a trial. **Lepr Rev**, v. 71 Suppl, p. S37-40; discussion S40-1, Dec 2000.

VISCA, P. et al. Nitric oxide and Mycobacterium leprae pathogenicity. **IUBMB Life**, v. 54, n. 3, p. 95-9, Sep 2002.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. **Immunol Rev**, v. 220, p. 199-213, Dec 2007.

WANG, S. et al. Evaluation of the diagnostic potential of IP-10 and IL-2 as biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis in a BCG-vaccinated population. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51338, 2012.

WAREHAM, A. S. et al. Evidence for a role for interleukin-17, Th17 cells and iron homeostasis in protective immunity against tuberculosis in cynomolgus macaques. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88149, 2014.

WEAVER, C. T. et al. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. **Annu Rev Pathol**, v. 8, p. 477-512, Jan 2013.

WEERDENBURG, E. M.; PETERS, P. J.; VAN DER WEL, N. N. How do mycobacteria activate CD8+ T cells? **Trends Microbiol**, v. 18, n. 1, p. 1-10, Jan 2010.

WHO. World Health Organization. **Guide to the elimination of leprosy as a public health problem**. Geneva, 2000.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. **Global Strategy for further reducing the leprosy burden and sustaining Leprosy Control**. Geneva, 2005.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. Global strategy for further reducing the leprosy burden and sustaining leprosy control activities 2006-2010. Operational guidelines. **Lepr Rev**, v. 77, n. 3, p. IX, X, 1-50, Sep 2006.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. Global leprosy: update on the 2012 situation. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 88, n. 35, p. 365-79, Aug 2013.

\_\_\_\_\_. World Health Organization. **Leprosy Elimination**. Disponível em: < <http://www.who.int/lep/en/> >. Acesso em: 13 Jan., 2014.

WILKINSON, R. J.; LOCKWOOD, D. N. Antigenic trigger for type 1 reaction in leprosy. **J Infect**, v. 50, n. 3, p. 242-3, Apr 2005.

WOJKOWSKA, D. W. et al. Interactions between Neutrophils, Th17 Cells, and Chemokines during the Initiation of Experimental Model of Multiple Sclerosis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 590409, 2014.

WORKMAN, C. J. et al. The development and function of regulatory T cells. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 16, p. 2603-22, Aug 2009.

YAMANOUCHI, A. A. et al. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. **An Bras Dermatol**, v. 68, n. 6, p. 8, 1993.

YANG, D. et al. Autophagy Gene Polymorphism is Associated with Susceptibility to Leprosy by Affecting Inflammatory Cytokines. **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 593-8, Apr 2014.

YOSHIE, O.; IMAI, T.; NOMIYAMA, H. Chemokines in immunity. **Adv Immunol**, v. 78, p. 57-110, 2001.

YOUNG, D. B.; BUCHANAN, T. M. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for Mycobacterium leprae. **Science**, v. 221, n. 4615, p. 1057-9, Sep 1983.

ZENHA, E. M. et al. Clinical and immunological evaluation after BCG-id vaccine in leprosy patients in a 5-year follow-up study. **J Inflamm Res**, v. 5, p. 125-35, 2012.

ZHENG, S. G. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive? **Am J Clin Exp Immunol**, v. 2, n. 1, p. 94-106, 2013.

ZODPEY, S. P. Protective effect of bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccine in the prevention of leprosy: a meta-analysis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 73, n. 2, p. 86-93, 2007 Mar-Apr 2007.

ZODPEY, S. P.; AMBADEKAR, N. N.; THAKUR, A. Effectiveness of Bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: a population-based case-control study in Yavatmal District, India. **Public Health**, v. 119, n. 3, p. 209-16, Mar 2005.

**ANEXOS**

## ANEXO A - Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO			
X	PROJETO DE PESQUISA	Número do Protocolo	<b>23115-003005/2009-36</b>
	PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	Data de entrega no CEP	<b>25 / 03 / 2009</b>
	TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	Data da assembléia	<b>20 / 04 / 2009</b>

**I - Identificação**

Título do projeto:	Aplicação de tecnologias moleculares, imunológicas e geoprocessamento para a caracterização epidemiológica, diagnóstico e monitoramento da hanseníase em área hiperendêmica do Maranhão		
Identificação do Pesquisador Responsável:	Isabela Maria Bernardes Goulart		
Identificação da Equipe executora:	Silma Regina Ferreira Pereira, Isabela Maria Bernardes Goulart, Luis Ricardo Goulart Filho, Lea Márcia Melo da Costa, Jackson Costa, Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, Doralene Maria Cardoso de Aquino, Ivan Abreu Figueiredo, Jorge Luis Silva Brito, Samira Bühner-Sécua, Janaina Lobato, Érica de Melo Reis, Fausto Capparelli, Serlyjane Penha Hermano Nunes, Mayara Ingridde Sousa Lima, Maria Aparecida Gonçalves, Dulcinéia de Oliveira Bernardes de Sousa, Maria de Fátima Lires Pires, Graciomar Conceição Costa.		
Instituição onde será realizado:			
Área temática:	III	Multicêntrico:	Sim
Cooperação estrangeira:	Sim	Patrocinador:	Sim
		Data de recebimento:	26/03/2009
		Data de devolução:	01/05/2009

**II - Objetivos:****Geral:**

Caracterizar a situação epidemiológica de quatro municípios hiperendêmicos em hanseníase do Estado do Maranhão, pertencente ao Cluster 1, visando conhecer a distribuição espaço-temporal dos casos, validar os indicadores de tendência e prevalência oculta; e a aplicar a epidemiologia molecular por meio de técnicas moleculares e imunológicas para a identificação e monitoramento de grupos de risco entre os contatos domiciliares.

**Específico:**

1. Identificar os aspectos epidemiológicos da hanseníase no Maranhão (cluster 1) utilizando o geoprocessamento para produção de mapas de densidade dos casos de hanseníase por meio do sistema de informação geográfica (SIG), inclusive fazendo a distribuição dos contatos soropositivos e portadores sadios do M. leprae em sangue e swabs nasal e bucal;
2. Determinar os indicadores de magnitude e tendência (detecção geral de casos novos); de infecção recente e foco de transmissão ativa (detecção de casos novos em menores de 15 anos); de estimativa de prevalência oculta (%) de grau 2 de incapacidade entre os casos novos avaliados) - visando identificar áreas de maior risco de adoecimento da população, com o objetivo de subsidiar as equipes do programa de saúde da família (PSF) para a busca ativa de casos, validando todos os indicadores elencados;
3. Implementar a vigilância de contatos de casos de hanseníase fazendo exame clínico dermatoneurológico, avaliação de cicatriz vacinal pelo BCG e aplicação de BCG se necessário, concomitante aplicação dos testes de Mitsuda e sorológico ML-Flow, para identificação de indivíduos com maior risco de desenvolver a doença;
4. Utilizar ferramentas moleculares (PCR em swabs e sangue) e imunológicas (ELISA) para o diagnóstico de doentes e indivíduos com infecção subclínica/portadores sadios de modo a conhecer a epidemiologia molecular (população de casos de hanseníase e de sadios);

## ANEXO B - Protocolos de Abordagem e Seguimento de Pacientes e Contatos



LabGeM  
UFMA



Centro de Referência Estadual em  
Doenças de Transmissão Sexual, HIV/AIDS e  
Doenças de Transmissão Sexual  
**CREDESH**  
Compreensão, conscientização e cooperação



SÃO LUÍS  
Cidade da Índia

PROTÓCOLO DE ABORDAGEM E SEGUIMENTO DE PACIENTE EM HANSENÍASE – CÓD \_\_\_\_\_

DADOS GERAIS DO PACIENTE			
Nome:			
DN ____/____/____	Sexo: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>	Mãe:	
Endereço:			CEP
Município:		Fones:	
Data da notificação ____/____/____	Data do diagnóstico ____/____/____	Início dos primeiros sintomas ____/____/____	
Tratou anteriormente: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, de ____/____/____ a ____/____/____, Local _____			
CLÍNICA E TRATAMENTO			
Classificação Operacional		<input type="checkbox"/> PB <input type="checkbox"/> MB (nº de lesões) ou <input type="checkbox"/> PB <input type="checkbox"/> MB (nº de lesões+baciloscopia)	
Forma clínica	<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> Ts <input type="checkbox"/> DT <input type="checkbox"/> DD <input type="checkbox"/> DV <input type="checkbox"/> Vsp <input type="checkbox"/> VV <input type="checkbox"/> TR <input type="checkbox"/> DTR <input type="checkbox"/> DDR <input type="checkbox"/> DVR <input type="checkbox"/> HNPT <input type="checkbox"/> HNPDT <input type="checkbox"/> HNPDD		
Esquema terapêutico	<input type="checkbox"/> PQT/PB/6 Doses <input type="checkbox"/> PQT/MB/12 Doses <input type="checkbox"/> PQT/MB/24 Doses <input type="checkbox"/> Esquema Substitutivo – Descrição: _____		
Episódios reacionais ao tratamento		<input type="checkbox"/> Tipo 1 <input type="checkbox"/> Sem reação <input type="checkbox"/> Tipo 2 <input type="checkbox"/> Neurites <input type="checkbox"/> Tipo 1 e 2 <input type="checkbox"/> Lesões cutâneas	
Modo de entrada	Modo detecção de caso novo	Provável fonte de infecção	Motivo do encaminhamento
<input type="checkbox"/> Caso Novo <input type="checkbox"/> Transferência dentro Município <input type="checkbox"/> Transferência entre Municípios <input type="checkbox"/> Transferência de Estado <input type="checkbox"/> Transferência de País <input type="checkbox"/> Recidiva <input type="checkbox"/> Outros Reingressos	<input type="checkbox"/> Encaminhamento <input type="checkbox"/> Demanda Espontânea <input type="checkbox"/> Exame de Coletividade <input type="checkbox"/> Exame de Contatos <input type="checkbox"/> Outros Modos	<input type="checkbox"/> Intradomiciliar <input type="checkbox"/> Intradomiciliar – Íntimo <input type="checkbox"/> Extradomiciliar <input type="checkbox"/> Extradomiciliar – Íntimo <input type="checkbox"/> Ocupacional <input type="checkbox"/> Ignorado	<input type="checkbox"/> Confirmação de Diagnóstico <input type="checkbox"/> Diagnóstico Diferencial <input type="checkbox"/> Estados Reacionais e/ou Neurites <input type="checkbox"/> Reações Adversas às Drogas <input type="checkbox"/> Tratamento Fisioterápico <input type="checkbox"/> Terapia Ocupacional <input type="checkbox"/> Tratamento Medicamentoso
Local de procedência: _____			
Profilaxia BCG: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2		Administração BCG: 1ª dose ____/____/____ 2ª dose ____/____/____	
Grau de Incapacidade no diagnóstico: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> Não Avaliado			
Nº Lesões Cutâneas:		Nº de troncos nervosos acometidos:	





## PROTOCOLO DE ABORDAGEM E SEGUIMENTO DE CONTATO EM HANSENÍASE

**Contato:** \_\_\_\_\_

**Caso Índice:** \_\_\_\_\_ **Prontuário:** \_\_\_\_\_

**Endereço:** \_\_\_\_\_ **CEP:** \_\_\_\_\_

**Município:** \_\_\_\_\_ **Data da abordagem:** \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ **Tel:** \_\_\_\_\_

Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_

Tempo de Exposição (meses): \_\_\_\_\_

Idade na Abordagem: \_\_\_\_\_

Tratou anteriormente: ( ) Não ( ) Sim \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ a

\_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

Tipo de Contato:

- Intradomiciliar       Extradomiciliar  
 Intradomiciliar-intimo       Extradomiciliar-intimo  
 Ocupacional       Ignorado

Forma Clínica do Caso Índice:

- I    T    Ts    DT    DD    DV  
 Vsp    VV  
 TR    DTR    DDR    DVR  
 HNPT    HNPDT    HNPDD

Classificação Operacional do Caso Índice:  PB    MB

**Profilaxia BCG:**

0    1    2   \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Administração da dose

1ª Dose \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_   2ª Dose \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**1. Realização Exame Dermato Neurológico:**  Não    Sim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**2. Realização Exame Dermato Neurológico:**  Não    Sim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**3. Realização Exame Dermato Neurológico:**  Não    Sim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**4. Realização Exame Dermato Neurológico:**  Não    Sim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**5. Realização Exame Dermato Neurológico:**  Não    Sim: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

1. Mitsuda na abordagem:

Administrado \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_   Leitura \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Negativo \_\_\_ mm    Positivo \_\_\_ mm

Flutuante    Ulcerado

Perdeu Leitura    Uso de corticóide    Não fez

2. Mitsuda na abordagem:

Administrado \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_   Leitura \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Negativo \_\_\_ mm    Positivo \_\_\_ mm

Flutuante    Ulcerado

Perdeu Leitura    Uso de corticóide    Não fez

### Acompanhamento do Contato

Exames Moleculares no Seguimento	Data	Resultado	Exames Sorológicos	Data	Resultado
01 PCR Swab Bucal PCR Swab Nasal	___/___/___ ___/___/___	Neg Pos _____	01 MI Flow	___/___/___	Neg Pos _____
02 PCR Swab Bucal PCR Swab Nasal	___/___/___ ___/___/___	Neg Pos _____	02 MI Flow	___/___/___	Neg Pos _____
03 PCR Swab Bucal PCR Swab Nasal	___/___/___ ___/___/___	Neg Pos _____	03 MI Flow	___/___/___	Neg Pos _____
04 PCR Swab Bucal PCR Swab Nasal	___/___/___ ___/___/___	Neg Pos _____	04 MI Flow	___/___/___	Neg Pos _____
05 PCR Swab Bucal PCR Swab Nasal	___/___/___ ___/___/___	Neg Pos _____	05 MI Flow	___/___/___	Neg Pos _____
01 PCR Sangue	___/___/___	Neg Pos _____	01 ELISA	___/___/___	Neg Pos _____
02 PCR Sangue	___/___/___	Neg Pos _____	02 ELISA	___/___/___	Neg Pos _____
03 PCR Sangue	___/___/___	Neg Pos _____	03 ELISA	___/___/___	Neg Pos _____
04 PCR Sangue	___/___/___	Neg Pos _____	04 ELISA	___/___/___	Neg Pos _____
05 PCR Sangue	___/___/___	Neg Pos _____	05 ELISA	___/___/___	Neg Pos _____

#### Situação de Acompanhamento do Contato:

Em acompanhamento

Não compareceu ao acompanhamento anual \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Adoeceu - PACIENTE \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Adoeceu - PACIENTE Co-prevalência \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Acompanhado de 5 a 7 anos

Data de comparecimento (2º ano): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data de comparecimento (3º ano): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data de comparecimento (4º ano): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Data de comparecimento (5º ano): \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do termo de consentimento para pesquisa? Sim Não

Observações: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

## ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Projeto de Pesquisa: Aplicação de tecnologias moleculares, imunológicas e de geoprocessamento para a caracterização epidemiológica, diagnóstico e monitoramento da hanseníase em área hiperendêmica do Maranhão.**

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa “Aplicação de tecnologias moleculares, imunológicas e de geoprocessamento para a caracterização epidemiológica, diagnóstico e monitoramento da hanseníase em área hiperendêmica do Maranhão.”, sob a coordenação, no Maranhão, da Dra. **Silma Regina Ferreira Pereira**, professora da Universidade Federal do Maranhão. Esta pesquisa está sendo desenvolvida juntamente com pesquisadores do Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária (CREDESH/UFU), com coordenação Geral da Dra. **Isabela Maria Bernardes Goulart**.

A hanseníase é causada por uma bactéria que pode ficar muitos anos incubada sem causar doença na pessoa. Durante o desenvolvimento da hanseníase as lesões de pele são mais aparentes e os nervos podem ser danificados. Quanto mais demorado o diagnóstico e início do tratamento da doença, maior será o dano. A hanseníase tem cura, mas como não há uma vacina específica contra ela, é muito importante que se possa identificar as pessoas saudáveis, mas que tenham a bactéria que causa a doença, bem como os contatos de pacientes que estejam no estágio inicial da infecção, para que se possa definir os grupos que tenham maior risco de desenvolver a hanseníase.

Esperamos detectar em que estágio de desenvolvimento se encontra a doença no paciente, bem como definir os possíveis portadores saudáveis e aqueles que já estejam infectados com o bacilo entre os comunicantes, para seguimento periódico pela equipe de saúde a fim de prevenir o aparecimento da doença nos familiares e diminuir o risco de contágio da população. Para isto, serão coletadas amostras de sangue, raspado bucal, raspado nasal, raspado e biópsias de pele. A equipe de saúde dos municípios, sob a supervisão de um especialista em hanseníase, fará o diagnóstico da doença, convidando os pacientes a participarem desta pesquisa conforme previsto neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Espera-se que com este estudo seja possível detectar em que estágio de desenvolvimento se encontra a doença no paciente, bem como definir os possíveis portadores saudáveis e aqueles que já estejam infectados com o bacilo entre os comunicantes, para seguimento periódico pela equipe de saúde e pesquisadores. Isto permitirá um tratamento precoce a fim de prevenir o aparecimento da doença nos familiares, diminuindo o risco de contágio da população. Sua participação trará o benefício futuro para os pacientes que forem acometidos pela doença.

Os comunicantes da cidade de Açailândia (MA) serão convidados a receber tratamento com esquema ROM (Rifampicina 600mg, sendo 2 cápsulas de 300mg, Minociclina 100mg e Ofloxacina 400mg) em duas doses intercaladas por um intervalo de um mês. As crianças receberão uma dose de 10mg/kg de peso corpóreo. Somente receberão esse tratamento os contatos, ou seus responsáveis legais, que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Após um ano do tratamento, os contatos serão reavaliados clinicamente e realizarão novos exames para avaliar a ausência ou presença da bactéria.

A sua identidade e seus dados pessoais serão preservados. Você não terá nenhum ônus e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Não há riscos para o paciente na coleta ou no uso de suas amostras. A participação nesta pesquisa pode trazer grande benefício aos portadores da doença, pois facilitará o diagnóstico precoce e a rápida intervenção e tratamento, evitando incapacidades e diminuindo as consequências relacionadas à doença. Você é livre para parar de participar a qualquer momento sem nenhum prejuízo próprio.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a).

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa o senhor (a) poderá entrar em contato com:

- Pesquisadores: Silma Regina Ferreira Pereira e/ou Serlyjane Penha Hermans Nunes – Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, Campus Universitário do Bacanga, São Luís, Maranhão. CEP: 65080-040; telefone (98) 3301-8543; e-mail: silmaregina@yahoo.com.br ou serlyphn@yahoo.com.br.

- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFMA: Sala 07, Bloco C, CEB Velho, Campus Universitário do Bacanga da UFMA. Telefone: 2109-8708; e-mail: cepufma@ufma.br.

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ Pesquisador Responsável: \_\_\_\_\_

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa ou representante legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante da pesquisa ou representante legal