

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

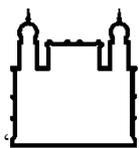
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Persistência da viabilidade do *Mycobacterium leprae* em
pacientes do Mal de Hansen sob tratamento.**

Arthur da Silva Neumann

Rio de Janeiro

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Arthur da Silva Neumann

Persistência da viabilidade do *Mycobacterium leprae* em
pacientes do Mal de Hansen sob tratamento.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Prof. Dr. Flávio Alves Lara

RIO DE JANEIRO

Setembro de 2017

da Silva Neumann, Arthur.

Persistência da viabilidade do *Mycobacterium leprae* em pacientes do Mal de Hansen sob tratamento / Arthur da Silva Neumann. - Rio de Janeiro, 2017.

94 f.; il.

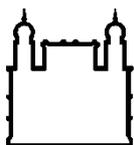
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Flávio Alves Lara.

Bibliografia: f. 59-69

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Poliquimioterapia. 4. Viabilidade. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: ARTHUR DA SILVA NEUMANN

Persistência da viabilidade do *Mycobacterium leprae* em
pacientes do Mal de Hansen sob tratamento.

ORIENTADORES: Prof. Dr. Flávio Alves Lara

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Teca Calcagno Galvão - **Revisora**

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro- **Presidente**

Prof. Dr. Adalberto Rezende Santos - **Membro**

Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues - **Membro**

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano - **Suplente**

Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira - **Suplente**

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2017.

A todos que torceram e me incentivaram para
alcançar mais uma conquista na vida.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por mais uma etapa concluída, pois eu ainda tenho um caminho grande para percorrer, logo precisarei de muita energia para alcançar todos os objetivos.

Queria agradecer aos meus pais e meus avós pelo incentivo e torcida. Só eles sabem o que essa pós-graduação significa para mim e para a família.

Agradeço aos meus melhores amigos (Hanna, Breno, Leandro e Ana Beatriz) e meu amigo/irmão Philipe por manterem uma amizade sólida por mais de dez anos, pois sempre que precisei me distrair alguns deles ou todos eles estavam presentes. Bruno, meu irmão mais novo, chato para caramba, mas de certa forma manteve meu foco nos objetivos. Um agradecimento especial a Maria Cecília, uma amizade recente, mas de grande importância, que me apoiou muito durante o mestrado. Rachel, vulgo “Quelzita”, que me ajudou a refletir algumas coisas.

Quero agradecer a todos da equipe do Laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL) do Instituto Oswaldo Cruz, por terem me acolhido como uma segunda família até os dias de hoje.

Agradecerei especialmente a Sabrina, que apesar do seu jeito “escorpião” de ser, sempre esteve lá para me dar o devido apoio e esporros às vezes. A Karina pela energia e a forma de levar a vida, seu jeito descontraído e claro, seu ombro amigo. Diego, mais novo irmão científico, muitas coisas em comum, provavelmente estaremos jogando online em breve. A Débora, que me salvou algumas vezes, por ser a aluna mais antiga do Flávio é basicamente uma irmã mais velha para todo mundo.

Agradeço muito a minha irmã científica Jéssica Ferreira, pois apesar de todo sufoco, trabalho, irritações, protocolos, extrações, reagentes, faturamentos, CTs indecifráveis, testes de primer, diluições, eletroforeses, cálculos, sequenciamentos, mudanças de laboratório, tretas e estresses sempre manteve o humor no laboratório me fazendo rir ou vice versa nos momentos em que alguém aparecia “querendo assunto”.

Agradeço a minha “ex quase mãe científica” Amanda Brum, que mesmo com muito pouco tempo de contato, mas criei um carinho enorme devido a sua paixão e dedicação pela ciência e por sua personalidade gentil e forte.

Agradeço também a Márcia e a Marize pela dedicação nas análises farmacogenéticas.

Ao meu orientador Dr. Flávio Alves Lara, vulgo “mestre dos magos” (sim, não há apelido mais apropriado), pela postura, ensinamentos, compreensão e espaço para que os alunos possam expandir seu conhecimento de forma livre.

Ao João Pedro, o “Jão”, que me salvou diversas vezes com os cálculos, reagentes e sempre teve uma paciência imensa para me explicar os protocolos etapa por etapa. Obrigado mesmo!

Ao Thiago Gomes e Rychelle Medeiros, futuros doutores que sempre tinham uma piada ou trocadilho infame para fazer independente do momento.

Agradeço ao pessoal do Ambulatório Souza Araújo, em especial o Dr. José, Cristiane, Alex, Cintia e Edivaldo, pois sem eles o projeto definitivamente não seria concluído.

Agradeço a minha revisora, Dr^a. Teca Galvão, pela atenção e por ter me deixado mais tranquilo nessa reta final.

“Todos os dias que vivi me fizeram o que eu sou hoje
Apenas por não ser fácil que continuo seguindo em frente.”

Yui – Life



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Persistência da viabilidade do *Mycobacterium leprae* em pacientes do Mal de Hansen sob tratamento.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Arthur da Silva Neumann

A Hanseníase, que tem como agente etiológico o bacilo *Mycobacterium leprae*, é uma doença curável por meio do uso da poliquimioterapia (PQT/OMS), composta pela combinação das drogas dapsona, clofazimina e rifampicina. O tratamento pode ter longa duração, podendo chegar a um ano dependendo do índice baciloscópico do diagnóstico, que pode ser alto em pacientes multibacilares ou baixo em pacientes paucibacilares. Devido à toxicidade do tratamento, a hanseníase apresenta um nível variável de adesão entre pacientes, acarretando assim na falha terapêutica e o surgimento de cepas resistentes às drogas. O projeto tem como objetivo aplicar uma metodologia molecular baseada na detecção de rRNA 16S do bacilo por uso de PCR em tempo real, mensurando sua viabilidade em raspados bucais e nasais de pacientes multibacilares ao longo dos 6 meses iniciais do tratamento. Análises de detecção de cepas resistentes e de perfis metabólicos de acetilação (NAT2) e de oxidação (CYP450) dos pacientes foram feitas nos casos de persistência do bacilo no tratamento. Os resultados apontam que o número de bacilos não diminuiu drasticamente na região nasal na maioria dos pacientes (8 de 15 indivíduos). A viabilidade do bacilo aparenta não ter relação com a resistência às drogas nesse estudo. Dos pacientes selecionados, 5 possuem perfil de acetilação intermediária, 3 possuem acetilação rápida e 2 possuem acetilação lenta. Sobre os perfis de oxidação, 9 possuem oxidação rápida e somente 1 possui oxidação intermediária. Contudo, as relações de perfis metabólicos com altas chances de efeitos adversos (acetilação intermediária ou lenta/ oxidação rápida) também mostraram uma possível relação com a viabilidade do bacilo, uma vez que esses perfis tiveram diminuição na viabilidade mais tardia. O estudo sugere que a PQT é eficiente, mas não como a literatura cita, e que perfis metabólicos podem, não só aumentar as chances efeitos adversos, como também influenciar na viabilidade do bacilo.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*. Poliquimioterapia. Tratamento.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

OSWALDO CRUZ INSTITUTE

Persistence of *Mycobacterium leprae* viability in Hansen's disease patients by treatment.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Arthur da Silva Neumann

Leprosy, whose has the etiologic agent bacillus *Mycobacterium leprae*, is a curable disease through the use of multidrug therapy (MDT / WHO), which is composed of the combination of drugs dapsone, clofazimine and rifampicin. The treatment can be long-lasting depending on the bacilloscopic index of the diagnosis , which may be high in multibacillary patients or low in paucibacillary patients. Due to the toxicity of the treatment, leprosy presents a variable level of adherence among patients, thus leading to therapeutic failure and the emergence of drug resistant strains. The project aims to apply a molecular methodology for the detection of bacillus 16S rRNA by the use of real-time PCR, measuring its viability in buccal and nasal scrapings of multibacillary patients throughout the initial 6 months of treatment. Analysis of resistant strains and metabolic profiles of acetylation (NAT2) and oxidation (CYP450) of patients were performed in cases of persistence of bacillus during six months of treatment. The results indicate that the number of bacilli did not decrease drastically in the nasal region in the majority of the patients (8 individuals). The viability of bacillus has no relation to drug resistance in this study. Of the patients selected, 5 of acceptance profile, 3 items of rapid acetylation and 2 of slow acetylation. On the oxidation profiles, 9 has fast and light oxidation 1 has intermediate oxidation. However, relations of metabolic profiles with high odds of adverse effects, it is also a question of bacillus viability, since these problems are successful in later viability. The study suggests that MDT is efficient, but not as the literature cites, and that metabolic profiles may not as much increase as adverse odds, but also influence the viability of the bacillus.

Keywords: *Mycobacterium leprae*, multidrug therapy, treatment

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	1
1.1 <i>Mycobacterium leprae</i>	1
1.2. Hanseníase	4
1.2.1. Formas da hanseníase	5
1.2.1.1. Polo Tuberculóide (TT) e Lepromatoso/ Virchowiano (LL)	6
1.2.2. Quadros reacionais da Hanseníase	7
1.2.2.1. Reação tipo 1	8
1.2.2.2. Reação tipo 2	8
1.2.3. Fontes de infecção	8
1.3. Hanseníase no mundo	9
1.3.1. Hanseníase no Brasil	10
1.3.2. Hanseníase no Rio de Janeiro	10
1.4. Tratamento da Hanseníase	12
1.4.1. Esquema Poliquimioterápico	14
1.4.1.1. Dapsona	14
1.4.1.2. Rifampicina	14
1.4.1.3. Clofazimina	15
1.5. Efeitos adversos	15
1.6. Negligência ao Tratamento	15
1.6.1. Negligência nos exames de contatos intradomiciliares	15
1.7. Cepas de <i>Mycobacterium leprae</i> resistentes	16
1.7.1. Resistência à Dapsona	17
1.7.2. Resistência à Clofazimina	17

1.7.3. Resistência à Rifampicina	17
1.7.4. Resistência à ofloxacina	17
1.8. Farmacogenética	18
1.8.1. Polimorfismos de genes e variações de respostas farmacológicas	19
1.9. Métodos de detecção do bacilo	23
1.9.1. Métodos clássicos de detecção	23
1.9.2. Métodos modernos de detecção	24
2. Justificativa	26
3. Objetivos	28
4. Metodologia	29
4.1. Coleta de amostras de pacientes durante o tratamento e coleta de amostras de indivíduos não acometidos pela doença.	29
4.2. Análise de Viabilidade de <i>M. leprae</i>	29
4.2.1. Extração de RNA e DNA	29
4.2.2. RT-PCR para detecção de <i>Mycobacterium leprae</i> .	30
4.2.3. PCR em tempo real	30
4.2.4. Análise dos dados da PCR	31
4.3. Análise de resistência	31
4.3.1. PCR de resistência	31
4.3.2. Análise dos produtos de PCR	31
4.3.3. Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento	31
4.3.4. Reação de sequenciamento	32
4.3.5. Precipitação da reação de sequenciamento	32
4.3.6. Análise dos genes de resistência	32
4.4. Extração de DNA para análise farmacogenética	33
4.5. Análise de <i>NAT2</i>	33

4.5.1. PCR de <i>NAT2</i>	33
4.5.2. Eletroforese em gel de agarose para <i>NAT2</i>	33
4.5.3. Purificação dos produtos de PCR de <i>NAT2</i>	33
4.5.4. Sequenciamento de <i>NAT2</i>	33
4.5.5. Análise das sequências de <i>NAT2</i>	34
4.5.6. Verificação dos haplótipos	34
4.6. Análises dos CYPs	34
4.6.1. Análise de <i>CYP3A4*1B</i>	34
4.6.2. Análise de <i>CYP3A5</i>	35
4.6.2.1. PCR de <i>CYP3A5*3</i>	35
4.6.2.2. Digestão de <i>CYP3A5*3</i> com <i>DdeI</i>	36
4.6.2.3. PCR de <i>CYP3A5*6</i>	36
4.6.2.4. Digestão de <i>CYP3A5*6</i> com <i>DdeI</i>	36
4.6.3. Análise de <i>CYP2E1</i>	37
4.7. Sequenciamento das amostras do estudo	37
5. Resultados	39
5.1. População do estudo	39
5.2. Dados domiciliares dos pacientes	40
5.3. Viabilidade em amostras bucais e nasais	40
5.4. PCR de detecção de <i>M. leprae</i> em indivíduos sadios	45
5.5. Resistência às drogas	45
5.5.1. Géis da análise de resistência à poliquimioterapia	46
5.5.2. Sequenciamento da análise de resistência à poliquimioterapia	47
5.6. Análises farmacogenéticas	49
5.6.1. Análise dos alelos <i>CYP3A5*3</i> e <i>CYP3A5*6</i> através da digestão por <i>DdeI</i>	49

5.6.2. Análise dos alelos de CYP2E1 através da digestão por <i>RsaI</i>	50
5.6.3 Análise dos alelos de CYP3A4 através do sequenciamento	51
5.6.4. Análise dos alelos de NAT2 através do sequenciamento	51
6. Discussão	52
7. Perspectivas	57
8. Conclusões	58
9. Bibliografia	59

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 - Dr. Gerard Henrik Armauer Hansen.	1
Figura 1. 2 - O agente etiológico da Hanseníase, <i>Mycobacterium leprae</i> .	2
Figura 1.3: Cultivo de <i>M. leprae</i> em patas de camundongos.	2
Figura 1.4. Modelo esquemático do envelope celular de <i>M. leprae</i> .	3
Figura 1.5. Espectro imunopatológico da Hanseníase.	5
Figura 1.6. Imunologia da Hanseníase.	7
Figura 1.7: Distribuição de novos casos de Hanseníase no mundo em 2016	9
Figura 1.8: Distribuição dos casos de Hanseníase por 10.000 habitantes no Brasil	10
Figura 1.9. Coeficiente bruto e padronizado da detecção de hanseníase nos municípios do Rio de Janeiro, 2001 a 2012	11
Figura 1.10. Ilustração do fruto da Chaulmoogra	13
Figura 1.11. Sequências parciais dos genes alvos da poliquimioterapia e suas respectivas regiões de polimorfismos	18
Figura 1.12. Esquema mostrando o benefício do ajuste de dose de uma droga, baseado no genótipo do indivíduo.	19
Figura 1.13. Isoformas de CYP450 no fígado e alguns exemplos de substratos, inibidores e indutores.	21
Figura 1.14. Dr. Charles Carter Shepard.	23
Figura 4.1. Estratégia de genotipagem (A) dos alelos <i>CYP3A5*3</i> e <i>CYP3A5*6</i> e representação esquemática (B) do perfil de digestão com a enzima <i>Dde I</i> após a eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.	35
Figura 4.2. Figura 4.2. Estratégia de genotipagem do gene <i>CYP2E1</i> e perfil de digestão com a enzima <i>Rsa I</i> após a eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.	37
Figura 5.1. Análise em <i>fold change</i> de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado bucal de pacientes de sua primeira coleta (virgem de tratamento/primeira dose) até o quinto mês subsequente (5 meses após a primeira dose) que houveram mudanças no tratamento.	41

Figura 5.2. Análise em <i>fold change</i> de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado bucal pacientes com picos de viabilidade até a terceira dose do tratamento (dois meses desde a primeira coleta).	42
Figura 5.3. Análise em <i>fold change</i> de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado bucal pacientes com picos de viabilidade até a sexta dose do tratamento (cinco meses desde a primeira coleta).	42
Figura 5.4. Análise em <i>fold change</i> de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado nasal de pacientes de sua primeira coleta (virgem de tratamento/primeira dose) até o quinto mês subsequente (5 meses após a primeira dose) que houveram mudanças no tratamento.	43
Figura 5.5. Análise em <i>fold change</i> de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado nasal de pacientes com picos de viabilidade até a quarta dose do tratamento (três meses desde a primeira coleta).	43
Figura 5.6. Análise em <i>fold change</i> de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado nasal de pacientes com picos de viabilidade até a quinta dose do tratamento (quatro meses desde a primeira coleta).	44
Figura 5.7. Análise em <i>fold change</i> de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado nasal pacientes com picos de viabilidade até a sexta dose do tratamento (cinco meses desde a primeira coleta).	44
Figura 5.8. Gel dos produtos de PCR do gene <i>rpoB</i> .	46
Figura 5.9. Gel dos produtos de PCR do gene <i>folP1</i> .	46
Figura 5.10. Gel dos produtos de PCR do gene <i>gyrA</i> .	47
Figura 5.11. Análise de investigação de sequenciamento do gene <i>folP1</i> .	47
Figura 5.12. Análise de investigação de sequenciamento do gene <i>gyrA</i> .	48
Figura 5.13. Análise de investigação de sequenciamento do gene <i>rpoB</i> .	48
Figura 5.14. Amplificação dos genes da família do CYP450.	49
Figura 5.15. Digestão dos produtos de PCR dos alelos de CYP3A5	50
Figura 5.16. Digestão dos produtos de PCR dos alelos de CYP2E1	51

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1. Comparação dos genomas de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i> .	4
Tabela 1.2. Esquema poliquimioterápico da hanseníase.	14
Tabela 1.3. Exemplos de classificações dos genótipos/fenótipos de <i>NAT2</i> .	20
Tabela 4.1. Primers e sondas utilizados no estudo.	38
Tabela 5.1. Dados gerais dos pacientes	39
Tabela 5.2. Dados domiciliares dos pacientes	40
Tabela 5.3. PCR de detecção do bacilo em indivíduos sadios	45
Tabela 5.4. Perfis de acetilação dos pacientes.	52

Lista de abreviaturas

BB	Borderline borderline
BL	Borderline lepromatoso
BT	Borderline tuberculóide
CD4+	Linfócito T auxiliar
CD8+	Linfócito T citotóxico
cDNA	DNA complementar
CLO	Clofazimina
CYP	Citocromo P
ddNTP	Dideoxynucleotídeos
DDS	Dapsona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENH	Eritema nodoso hansênico
GC	Guanina-citosina
IB	Índica baciloscópico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IM	Índice morfológico
LL	Lepromatoso lepromatoso
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
ML	<i>Mycobacterium leprae</i>
NAT2	N-acetil transferase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
PGL-1	Glicolípídeo fenólico I
PQT	Poliquimioterapia
PQT/ALT	Poliquimioterapia alternativa
PQT/INF	Poliquimioterapia infantil
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de Limitação
RIF	Rifampicina
Rif ^R	Resistência à rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico

RR	Reação reversa
RT PCR	PCR de transcriptase reversa
RT2	Reação tipo 2
SAGE	Sala de apoio à Gestão Estratégica
SNP	Polimorfismo de nucleotideo único
TE	Tris-EDTA
Th1	Linfócito T auxiliar 1
TLR2	Receptores <i>Toll like 2</i>
TT	Tuberculóide Tuberculóide
U.V.	Ultravioleta

1. Introdução

1.1 *Mycobacterium leprae*

O *Mycobacterium leprae* foi apontado como agente causador da Hanseníase em 1873 pelo médico Gerard Henrik Armauer Hansen (1841-1912), nascido em Bergen, Noruega (figura 1.1) ⁽¹⁾. A lepra, como era conhecida a hanseníase na antiguidade, já era um problema de saúde pública na Noruega naquela época e já era estudada pelo médico Daniel Cornelius Danielssen, que se juntou a Hansen no estudo da enfermidade ⁽²⁾.

Existem relatos de que antes da descoberta, Armauer Hansen, descobridor do bacilo uma vez comentou: "*Não há quase nada sobre a terra, ou entre ela e o céu, que não tem sido considerado como a causa da lepra; e isso é natural, uma vez que quanto menos se sabe, mais ativa se faz a imaginação*"⁽³⁾.

Danielssen, em suas pesquisas, acreditava que a doença era hereditária. Por outro lado, Hansen o questionou, acreditando que a doença não era hereditária e sim infecciosa. Em 1872, após uma longa pesquisa e análise de casos de lepra, Hansen a relatou como uma doença infecciosa crônica em 1872, observou pela primeira vez o bacilo da hanseníase em 1873 e submeteu o anúncio à "Norwegian Medical Society", sendo publicado em 1874. ^(4,2)

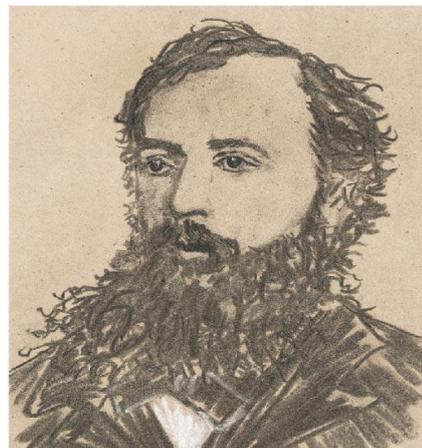


Figura 1.1 - Dr. Gerard Henrik Armauer Hansen. Ilustração por Venita Jay (2)

Antes de fazer parte do gênero *Mycobacterium*, o *M. leprae* era chamado de *Bacterium leprae*, bem como o agente etiológico da tuberculose, que era chamado de *Bacterium tuberculosis*. A proposta do gênero *Mycobacterium* foi feita por Lehmann e Neumann em 1896 ⁽⁵⁾. Desde então, mais de 150 espécies conhecidas fazem parte do gênero, que podem ser amplamente agrupadas em espécies de crescimento rápido, crescimento lento e espécies complexas. ⁽⁶⁾

O *Mycobacterium leprae* (Figura 1.2) é um bacilo álcool-ácido resistente, em forma de bastonete. É um parasita intracelular, sendo a única espécie de micobactéria que infecta nervos periféricos, especificamente células de Schwann. Até o momento não há relato do cultivo do bacilo em meios de cultura artificiais, ou seja, *in vitro*. ⁽⁷⁾

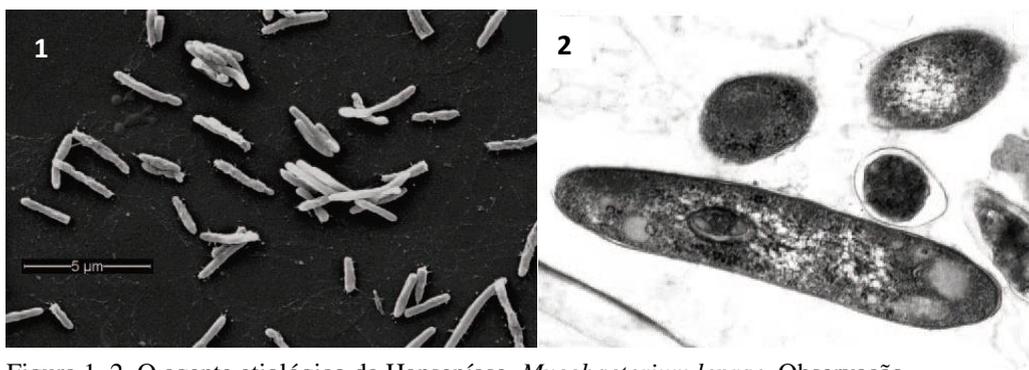


Figura 1. 2. O agente etiológico da Hanseníase, *Mycobacterium leprae*. Observação através de microscopia eletrônica de varredura (1) e transmissão (2), respectivamente. Fonte: Scollard *et al.* (2006)

Dessa forma seu cultivo é feito por inoculação do bacilo em animais como tatus ou camundongos atímicos Foxn1nu (nude). Após um período de seis meses ou mais, o animal é sacrificado para enumeração e coleta dos bacilos. Em camundongos imunocompetentes, um inóculo de alguns milhares de bacilos pode chegar a cerca de 1 milhão de organismos por coxim plantar após seis meses. As alterações histopatológicas são pequenas, consistindo na formação de pequenos granulomas contendo alguns linfócitos e macrófagos espumosos repletos de bacilos (Figura 1.3).^(8,9)

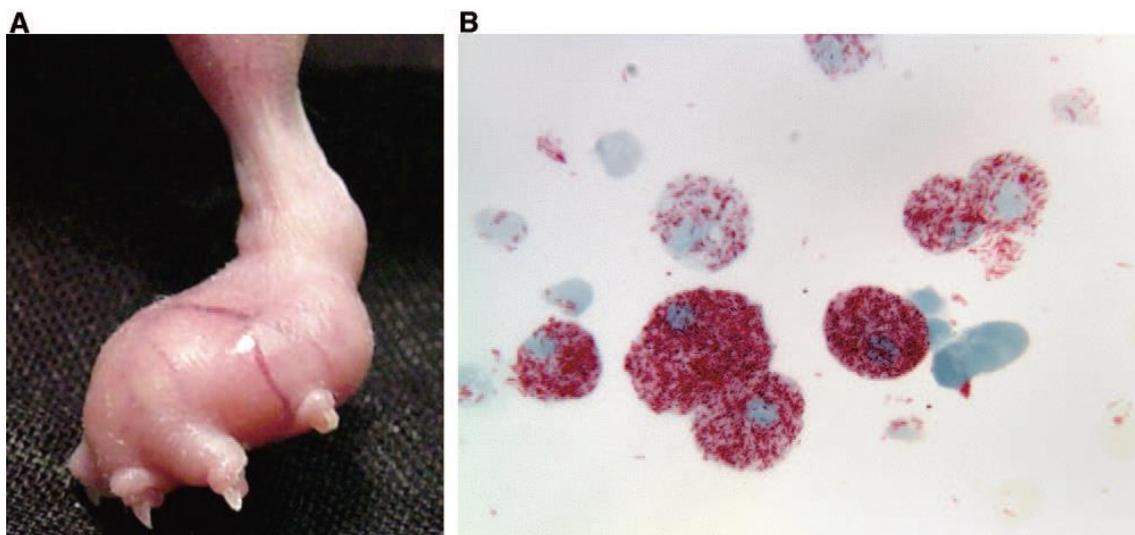


Figura 1.3: Cultivo de *M. leprae* em patas de camundongos. (A) Uma pata de camundongo nude com 6 meses de infecção contendo 5×10^9 bacilos vivos. (B) Macrófagos espumosos repletos de bacilos de Hansen corados em rosa pela fucsina. Fonte: Scollard *et al.* (2006)

Sua parede celular contém peptidoglicano, composto de cadeias de N-acetilglucosamina e N-glicolilmuramato alternados, ligados por pontes cruzadas de peptídeos ligados à camada galactano por arabinogalactana. Três cadeias ramificadas de arabinomanana são por sua vez ligadas ao galactano, formando, juntamente com a camada de peptidoglicano, uma zona elétron-densa em torno do *M. leprae*. Os ácidos micólicos estão ligados aos terminais de arabinano formando o folheto interno da bicamada pseudolipídica. O folheto externo é composto por uma rica variedade de ácidos micólicos de monomicolatos trealose e ácidos micoserosóico de dimicocerosatos assim como glicolípídeos fenólicos (PGLS), formando uma zona elétron-lúcida. O lipídio dominante na parede celular de *M. leprae* na especificidade imunológica é o glicolípídeo fenólico I (PGL-1). Estudos sugerem que o PGL-1 está envolvido na interação de *M. leprae* com a laminina das células de Schwann, sugerindo um papel para o PGL-1 na interação nervo periférico-bacilo (Figura 1.4) ⁽¹⁰⁾. A maioria dos genes necessários para construir o polímero peptidoglicano-arabinogalactana-micolato parecem estar presentes no genoma de *M. leprae* apesar da redução massiva de genes em seu genoma ⁽¹¹⁾.

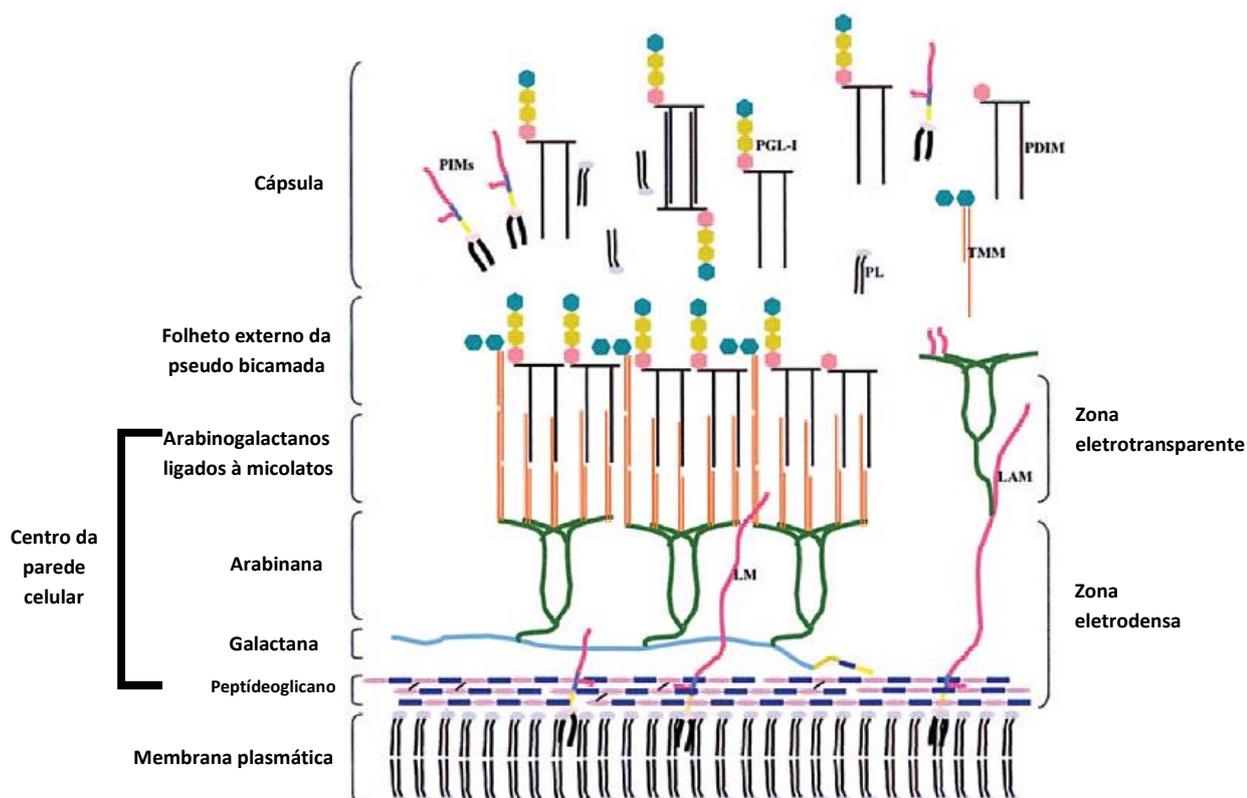


Figura 1.4. Modelo esquemático do envelope celular de *M. leprae*. Glicolípídeo fenólico I (PGL-1); Dimicocerato de Ftiocerol (PDIM); Fosfatidilinositol manosídeos (PIMs); Trealose monomicolato (TMM); Fosfolípídeo (PL); Lipoarabinomanana (LAM); Lipomanana (LM) Fonte: Scollard *et. al.*, 2006.

Os genomas do *M. leprae* e do *Mycobacterium tuberculosis* são constituídos por 3.268.203 pb e 4.411.532 pb, respectivamente (Tabela 1.1). Dentro do genoma do bacilo de Hansen, são encontrados 1.116 pseudogenes, ou seja, regiões que não codificam proteínas funcionais⁽¹¹⁾. Estudos apontam que isso ocorreu devido a um fenômeno conhecido como evolução redutiva, onde o *M. leprae* perdeu mais da metade dos genes ao longo da evolução. Isso geralmente é documentado em parasitas intracelulares obrigatórios e endossimbiontes, uma vez que certos genes se tornam inativados por não serem mais necessários, o tornando assim altamente especializado em um nicho e mantendo o conjunto mínimo de genes necessários para sua replicação e patogenicia. ^(11,12)

Tabela 1.1. Comparação dos genomas de *M. leprae* e *M. tuberculosis*.

Características	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tamanho do genoma	3,268,203	4,411,532
G+C (%)	57,79	65,61
Codificação de genes (%)	49,5	90,8
Codificação de genes (Nº)	1,604	3,959
Pseudogenes (Nº)	1,116	6*
Densidade de gene (pb por gene)	2,037	1,012
Extensão média de genes (pb)	1,011	1,012
Extensão média de genes desconhecidos (pb)	338	653

*Excluindo sequências de inserção.

Adaptado de Cole *et al.* (2001)⁽¹¹⁾

1.2. Hanseníase

A Hanseníase é uma doença crônica oriunda da infecção causada pelo *Mycobacterium leprae*. Esse bacilo é capaz de infectar grande número de indivíduos, porém poucos adoecem devido a sua baixa patogenicidade. Essas características são dependentes de sua relação com o hospedeiro e o grau de endemia do meio, entre outros aspectos. Os ambientes domiciliares são um dos espaços mais relevantes na disseminação do bacilo para os demais indivíduos da família, apesar de existirem pontos ainda não elucidados quanto aos possíveis fatores de risco, como por exemplo aqueles relacionados ao âmbito social do indivíduo. O alto grau de incapacidade que a hanseníase promove está relacionado à resposta celular nas regiões de infecção (nervos periféricos), podendo impactar irreversivelmente regiões periféricas dos nervos. ⁽⁷⁾

1.2.1. Formas da hanseníase

No ano de 1962, Ridley e Jopling propuseram uma classificação nova, fracionando a Hanseníase em cinco formas clínicas. Os grupos foram definidos considerando aspectos clínicos, bacteriológicos, histopatológicos e imunológicos: Tuberculóide (TT) que corresponde a forma polar, benigna, estável. Borderline tuberculóide (BT); Borderline borderline (BB); Borderline lepromatoso (BL); Lepromatoso (LL) equivalente a forma Virchowiana, maligna, mais agressiva na Classificação de Madri (Figura 1.5).⁽¹³⁾

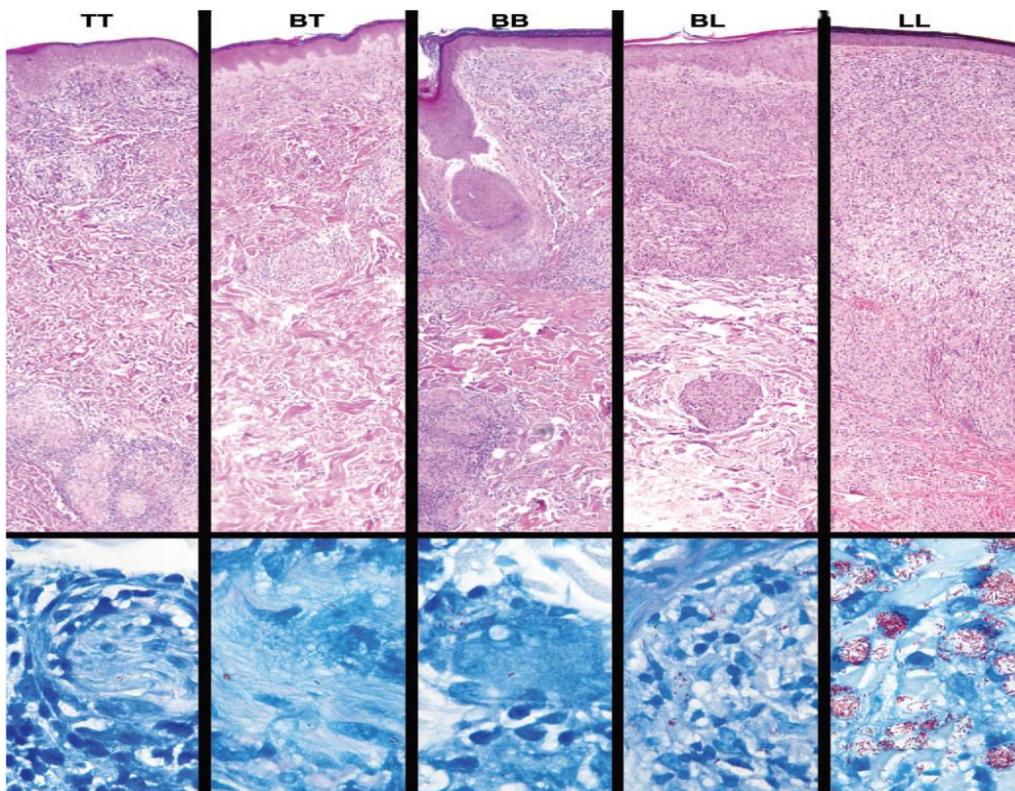


Figura 1.5. Espectro imunopatológico da Hanseníase. . Da esquerda para direita: Tuberculóide (TT); Borderline tuberculóide (BT); Borderline borderline (BB); Borderline lepromatoso (BL); Lepromatoso (LL), respectivamente. As seções superiores mostram as formas da hanseníase analisadas com marcação de hematoxilina e eosina em amostras de derme, mostrando o crescente número de grânulos e desorganização tecidual (magnificação de X63). As seções inferiores apresentam amostras de derme com a marcação de Fite, mostrando o número médio de bacilos encontrado em cada forma da doença (magnificação de X1.000). Fonte: Scollard *et al.* 2006 .

1.2.1.1. Polo Tuberculóide (TT) e Lepromatoso/Virchowiano (LL)

Na história da doença, é observada a existência de um polo de alta resistência à infecção pelo *Mycobacterium leprae*, a hanseníase tuberculóide, onde a resposta imune celular promove a destruição dos bacilos no organismo. O outro pólo, encontra-se uma forma mais propensa, a hanseníase virchoviana, que é caracterizada por uma má resposta imune celular, alto crescimento bacilar e espalhamento da infecção para vísceras e tecido nervoso. Um trabalho realizado pelos doutores Modlin e Mehra em 1990⁽¹³⁾ cita estudos apontando a diferente taxa de ativação entre os linfócitos T CD4 (auxiliares/indutores) e linfócitos T CD8 (citotóxicos/supressores), onde no polo tuberculóide (TT) a população de linfócitos T CD4 é maior, enquanto no polo lepromatoso a população de linfócitos CD8 é predominante, independente da taxa de ambos os linfócitos no sangue do paciente. A forma virchoviana ou lepromatosa deve ser estudada epidemiologicamente, pois os bacilos estão presentes em grandes números nas lesões na pele, na proporção média de 10^{10} bacilos/g tecido, aumentando a possibilidade de transmissão da doença por contato físico.⁽¹⁵⁾

A forma TT da doença apresenta uma ativação acentuada da atividade dos macrófagos e diferenciação de linfócitos T *naive* em linfócitos CD4 no organismo devido a produção de IFN- γ e IL-12, respectivamente. A forma LL da doença ocorre uma maior produção de IL-4, diminuindo a atividade macrofágica e diferenciando linfócitos T *naive* em linfócitos T CD8. Ocorre também a produção de IL-10, diminuindo a produção de moléculas de linfócitos T CD4, moléculas estimulatórias de macrófagos e aumenta a sobrevida, proliferação e produção de anticorpos de linfócitos B (Figura 1.6).⁽¹⁵⁾

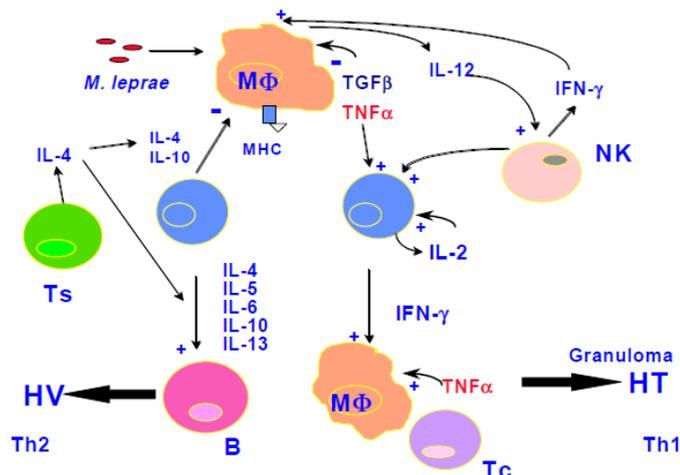


Figura 1.6. – Imunologia da hanseníase.

MØ = Macrófago, NK = Natural Killer; Th₁ –Th₂ = superpopulações de linfócito T CD₄⁺; B = Linfócito B; Tc = linfócito T citotóxico; Ts = linfócito T supressor; IL₁...IL₁₂ = interleucinas 1... 12; TNF α = fator de necrose tumoral; IFN γ = interferon γ ; TGF β = fatortransformador de crescimento β , HT = hanseníase tuberculóide; HV = hanseníase Virchoviana.

1.2.2. Quadros reacionais da Hanseníase

Dentro da hanseníase existem as chamadas reações hansênicas ou episódios reacionais, ocorrências inflamatórias agudas locais ou sistêmicas que podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento da doença. Suas definições consistem em uma reação inflamatória acentuada, localizada ou sistêmica, podendo vir seguida de comprometimento de nervos periféricos, manifestando como sintomas uma dor acentuada, sendo necessários cuidados especiais. Os quadros reacionais possuem uma relação com a carga bacilar e a resposta imune do hospedeiro, sendo classificadas em dois tipos: reação tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH), de acordo com Jopling (Tabela 1.2).^(10,16)

As reações da hanseníase representam quadros de inflamação agudos ou subagudos que se interpõe no curso crônico da doença, tanto nos paucibacilares (casos com até 5 lesões de pele) como nos multibacilares (mais de 5 lesões de pele).⁽¹⁷⁾ Estas reações podem ocorrer em todas as formas clínicas, exceto o grupo indeterminado, e geralmente seguem fatores que promovem seu desencadeamento, tais como infecções intercorrentes, vacinação, gravidez, puerpério, uso de medicamentos iodados, estresse físico e emocional e a própria poliquimioterapia usada no tratamento da doença, devendo ser diagnosticadas e tratadas de imediato.⁽¹⁵⁾

1.2.2.1. Reação tipo 1

A reação tipo 1 ou reação reversa, é apresentada com lesões de pele agudas, como placas eritemato-edematosas demarcadas novas ou reativação de lesões preexistentes. Do ponto de vista histológico, há presença de quadro inflamatório granulomatoso com padrão tuberculóide ou dimorfo, mas associado a edemas com episódios exsudativos, acúmulo de fibrina, necrose tecidual e, com certa frequência, comprometimento do tecido nervoso.^(18,19)

1.2.2.2. Reação tipo 2

A reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH), também pode ocorrer antes, durante e após o tratamento. Diferente da reação tipo 1, tem menor duração e maior número de recorrências. Cada surto em si, tem duração em torno de 15 dias, e ocorrem em intervalos de tempo variáveis. Manifestam-se como nódulos ou placas de aparecimento súbito, acompanhado de febre, mal-estar geral, dores musculares, articulares, adenopatias periféricas, principalmente inguinais, e muitas vezes também acompanham irites, iridociclites e neurites. A reação pode ser mediada por imunocomplexos, algumas vezes sendo apontada pelo aumento transitório da imunidade celular, segundo alguns autores. A intensidade e frequência destes episódios reacionais variam em cada paciente.^(18, 19)

1.2.3. Fontes de infecção

O ser humano é reconhecido como a única fonte de infecção, embora tenham sido identificados animais naturalmente infectados – o tatu⁽²⁰⁾, o macaco mangabei⁽²¹⁾, chimpanzé⁽²²⁾ e esquilos⁽²³⁾. Foi visto que o triatomíneo *Rhodnius prolixus*, após alimentação artificial, foi capaz de manter o bacilo viável em seu trato digestivo até a liberação de suas fezes, confirmando sua infectividade através do modelo Shepard⁽²⁴⁾. Os pacientes que apresentam alta bacteremia (multibacilares-MB) sem tratamento são capazes de eliminar grande quantidade de bacilos para o meio exterior através da expiração de perdigotos, apresentando carga bacilar de cerca de 10 milhões de bacilos presentes na mucosa nasal⁽⁷⁾.

A principal via de eliminação dos bacilos dos pacientes multibacilares (virchowianos e dimorfos) é a via aérea superior, sendo, também, o trato respiratório a mais provável via de entrada de *M. leprae* no corpo. Dados na literatura apresentaram informações de uma espécie de ameba encontrada no solo, a *Acanthamoeba castellanii*, e sua capacidade de ingerir o *M. leprae* expelido e mantê-lo viável no ambiente. (7, 25). Os doentes paucibacilares (indeterminados e tuberculóides) não são considerados importantes como fonte de transmissão da doença, devido à baixa carga bacilar. Os pacientes multibacilares, no entanto, constituem o grupo que oferece risco reconhecido de contágio, assim se mantendo enquanto não se iniciar o tratamento específico⁽⁷⁾.

1.3. Hanseníase no mundo

De acordo com relatórios oficiais recebidos de 138 países das regiões da OMS, a prevalência mundial registrada de hanseníase no final de 2015 era de 176.176 casos (0,2 casos por 10 000 pessoas). Os novos casos notificados globalmente em 2015 foram de 211.973 (2,9 novos casos por 100.000 pessoas). Os números de novos casos apontam um grau de transmissão contínuo da infecção no mundo, onde 199.992 (94%) dos novos casos de hanseníase foram relatados em 14 países, notificando mais de 1000 novos casos em cada um deles e apenas 6% dos novos casos foram relatados no resto do mundo (Figura 1.7).⁽²⁶⁾

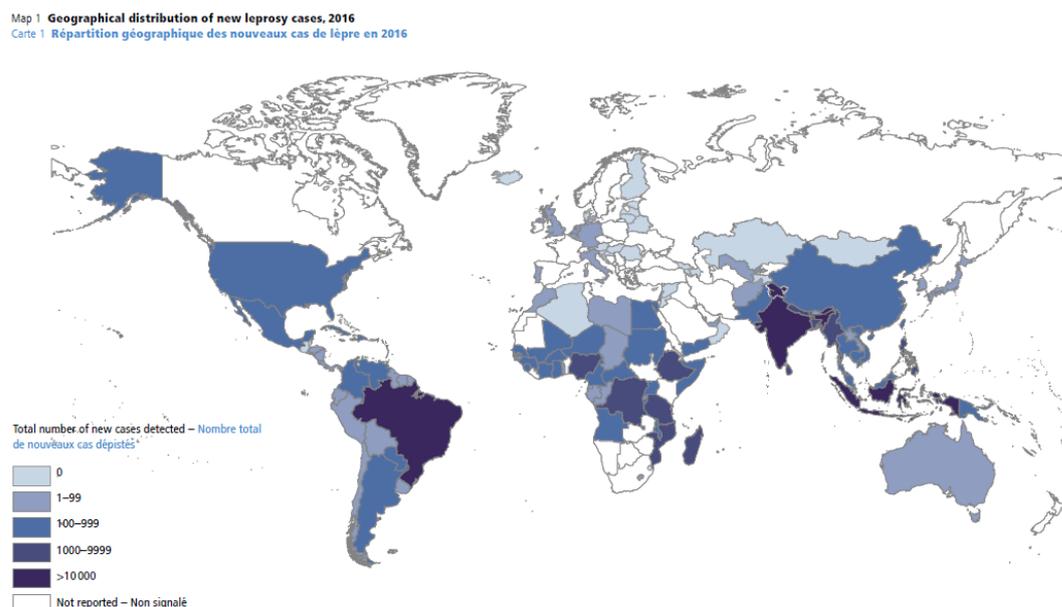


Figura 1.7. Distribuição de novos casos de Hanseníase no mundo em 2016. Fonte: World Health Organization.

1.3.1. Hanseníase no Brasil

Mesmo com 68% de queda na prevalência da Hanseníase ao longo dos anos, o Brasil tem progredido no combate da doença de forma lenta, não cumprindo um dos objetivos de desenvolvimento do milênio, estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) de eliminar a doença até o final de 2014. Mato Grosso, Pará, Maranhão, Tocantins, Rondônia e Goiás são as áreas com maior risco de transmissão, concentrando mais de 80% do total de casos diagnosticados. No Mato Grosso, por exemplo, a prevalência chega a 9,03 por 10 mil habitantes — contra a média nacional de 1,42. Isso acontece devido à dispersão da população nessas regiões, dificultando o acesso às unidades básicas de saúde das regiões (Figura 1.8).⁽²⁷⁾ Outra possível razão é o contato dessa população com insetos hematófagos e tatus infectados, o que pode facilitar a disseminação do bacilo.⁽²⁴⁾

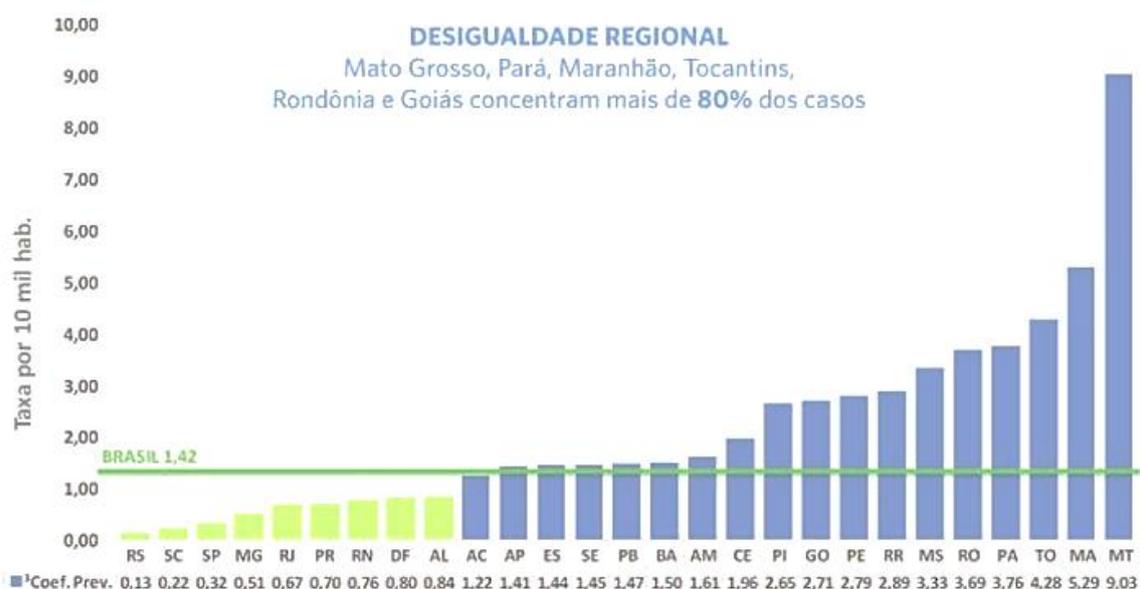


Figura 1.8. Distribuição dos casos de Hanseníase por 10.000 habitantes no Brasil em 2014. Coeficiente de prevalência (Coef. Prev.): Número de casos em tratamento até o dia 31 de dezembro do ano por 10.000 habitantes. Fonte: RADIS⁽²⁷⁾

1.3.2. Hanseníase no Rio de Janeiro

A Figura 1.9 de um estudo publicado em 2017⁽²⁸⁾ apresenta o coeficiente bruto de detecção de hanseníase nos dois períodos de 2001 a 2006 e 2007 a 2012 e a distribuição da análise bayesiana nos anos de 2004 e 2010, que correspondem ao meio dos dois períodos adotados. A região metropolitana possui coeficientes elevados, em nível de

alta endemicidade. As regiões norte e noroeste do estado também apresentam municípios com altos níveis de detecção de casos novos. No segundo período avaliado, pode ser vista uma redução dos níveis dos coeficientes na maioria dos municípios.

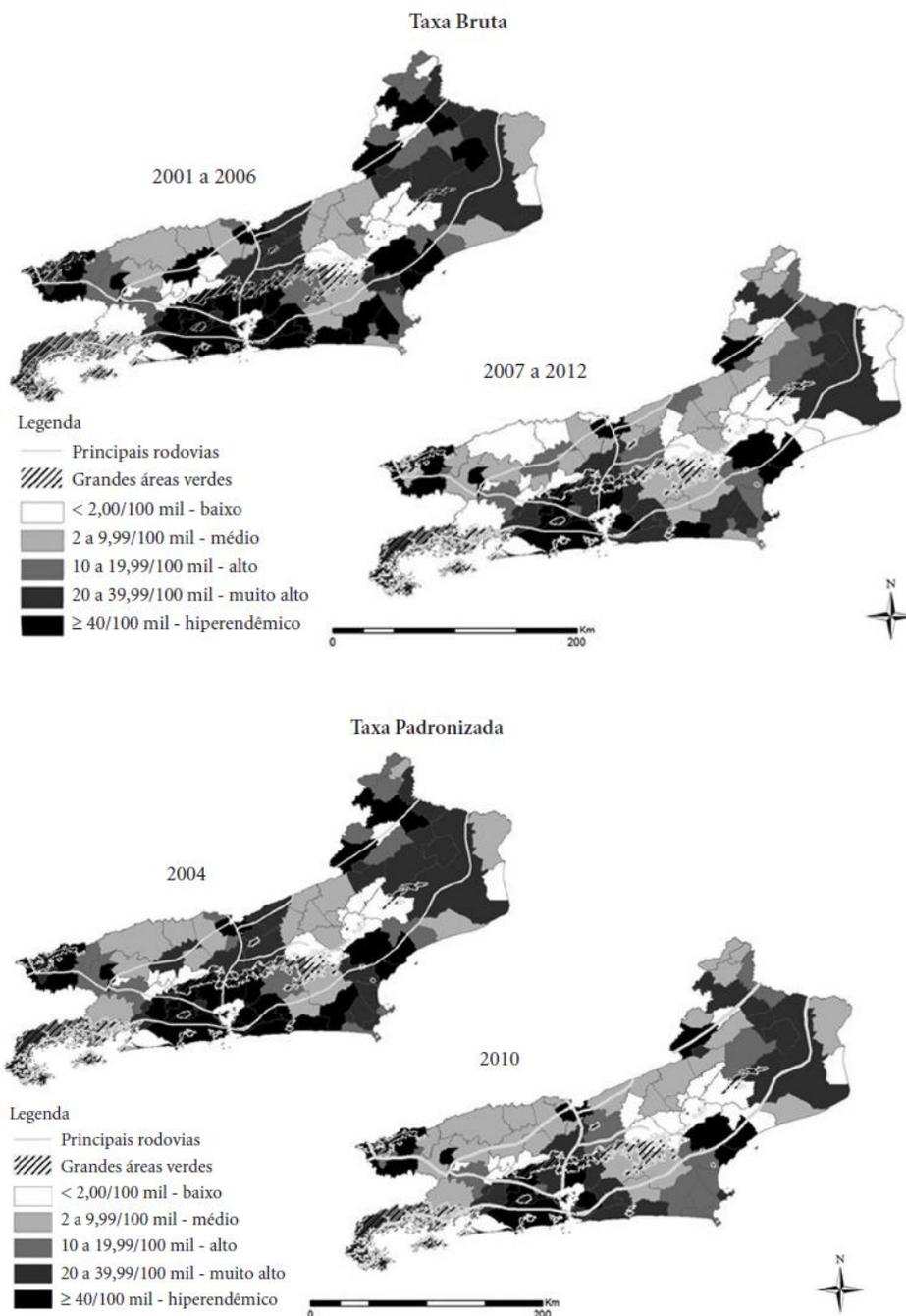


Figura 1.9. Coeficiente bruto e padronizado da detecção de hanseníase nos municípios do Rio de Janeiro, 2001 a 2012. Fonte: Gracie *et al.*, 2017⁽²⁵⁾.

Dados mais recentes retirados do SAGE (Sala de apoio à gestão estratégica)⁽²⁹⁾, do ministério da saúde, revelam uma alta porcentagem no números de casos curados na

coorte de detecção entre os anos de 2001 e 2012, porém, esse número cai de 2013 até 2016, chegando a 69,26%. Por outro lado, o número de contatos examinados dos pacientes registrados obteve um bom aumento até 2012 e manteve a média entre os anos de 2013 e 2016.

1.4. Tratamento da Hanseníase

Pelas informações levantadas em pesquisas, o óleo extraído das sementes das chaulmoogras já era usado há séculos no continente asiático para o tratamento de doenças cutâneas, como a hanseníase. As plantas que eram referenciadas como chaulmoogras pertencem à família das Flacourtiáceas, e seus óleos são ricos em ácidos hidnocárpico e chaulmúgrico, considerados os responsáveis pela ação terapêutica nos casos de hanseníase^(30, 31).

Ao longo de todo o século, acreditava-se que a *Gynocardia* era a fonte das sementes usadas para a produção do óleo de chaulmoogra⁽³²⁾. Após muitas análises do óleo de chaulmoogra oriundo da espécie *Gynocardia odorata*, foi observado que o óleo não apresentava os ácidos hidnocárpico e chaulmúgrico, algumas das principais características do grupo das chaulmoogras. Assim, a espécie *Gynocardia odorata* começou a ser citada como “falso chaulmoogra”, concluindo que o óleo utilizado no ocidente era proveniente das plantas do gênero *Hydnocarpus* (Figura 1.10)⁽³³⁾.

No Brasil, o Instituto Oswaldo Cruz trouxe esse método de tratamento em 1927, abastecendo o recém-criado Laboratório de Leprologia do Instituto Oswaldo Cruz, que era liderado pelo Dr. Souza Araújo. O tratamento era feito com um óleo, logo a administração intravenosa era proibida e sua administração era feita via injeções intradérmicas e intramusculares, com intervalos intimamente dependentes do grau da doença do paciente. O tratamento era doloroso e demorado, como o relato de um paciente, em 1940, que citava: ” (...) o terror das injeções extremamente doloridas e um óleo grosso inassimilável a endurecer os músculos sem proveito (...) uma infiltração terrível a suceder a outra, uma inflamação a se alterar quando outra nem ao menos tinha se extinguido, no programa de cobrir o corpo de picadas, recobri-lo e continuar a via crucis indefinidamente.”⁽³⁴⁾



Figura 1.10. Ilustração do fruto da Chaulmoogra. O óleo extraído era matéria-prima do tratamento da Hanseníase antes da poliquimioterapia. Extraído de: <http://www.theacworthleprosymuseum.org/module2kn.htm>

Um exemplo evidente da presença da hanseníase num dos maiores acontecimentos da história da saúde mundial e das doenças ocorreu em meados da década de 1940. Nos anos pós-Segunda Guerra Mundial, começaram a surgir na Europa os primeiros quimioterápicos e antibióticos, que viabilizaram o tratamento e a queda gradual de diversas doenças graves que até aquele momento eram incuráveis. Paralelamente, com o início da produção da sulfona, a droga se tornou uma alternativa ao tratamento existente. Gradativamente, a sulfona começou a ser adicionada no tratamento da enfermidade e acabou se tornando o primeiro medicamento eficaz no combate à hanseníase, dando maior conforto e liberdade aos pacientes que anteriormente ficavam isolados em colônias ou em leprosários para não espalharem o bacilo⁽³⁵⁾.

A classe das sulfonas obteve bons resultados como drogas antilepróticas, tendo como consequência a adesão e utilização destes medicamentos no combate à hanseníase⁽³⁶⁾. Estes medicamentos foram eficientes até certo ponto na história do tratamento, mas os primeiros casos de resistência surgiram na década de 60, trazendo certo receio e a necessidade de reajuste do tratamento. Após o surgimento da resistência à monoterapia, mais dois novos antimicrobióticos mostraram resultados relevantes no controle da doença, a Rifampicina⁽³⁷⁾ e a Clofazimina.

A Organização Mundial da Saúde, em 1981, promoveu um encontro com os grupos de estudo de quimioterápicos para controle da Hanseníase e determinaram que todas as formas da hanseníase seriam tratadas com a administração de uma poliquimioterapia que consistia no uso dos bacteriostáticos dapsona e clofazimina e o

bactericida rifampicina, pois o uso das três simultaneamente reduziriam as chances da geração da resistência ao tratamento (Tabela 1.3)⁽³⁸⁾.

1.4.1. Esquema Poliquimioterápico (PQT/OMS)

Tabela 1.2. Esquema poliquimioterápico da hanseníase. Fonte: OMS

Formas da hanseníase/tempo	Drogas	Frequência	Adulto	Frequência	Infantil
Multibacilar/12 meses	rifampicina	mensalmente	2 x 300 mg	mensalmente	450 mg (300 mg + 100 mg)
	clofazimina	mensal/diária	3 x 100 mg / 1 x 50 mg	mensal/dias alternados	3 x 50 mg / 1 x 50 mg
	dapsona	diária	100 mg	diária	50 mg
Paucibacilar/6 meses	rifampicina	mensalmente	2 x 300 mg	mensalmente	450 mg (300 mg + 100 mg)
	dapsona	diária	100 mg	diária	50 mg

1.4.1.1. Dapsona

A dapsona (DDS) é uma droga bacteriostática que atua pela inibição competitiva da enzima dihidrofolato sintetase e dihidrofolato redutase, enzimas chave na via de biossíntese do folato em *M. leprae*. Em pacientes tratados com monoterapia de dapsona, a morte dos bacilos era completa em 3 a 6 meses. A regressão total do quadro geralmente ocorria em cerca de 2 a 3 anos.⁽⁴⁰⁾

1.4.1.2. Rifampicina

A Rifampicina (RIF) é o único componente reconhecidamente bactericida da PQT contra *M. leprae*, foi introduzida em 1970. Atua por inibição seletiva da RNA polimerase bacteriana dependente do DNA e bloqueia a síntese de RNA. O fármaco também é eficaz contra organismos resistentes à dapsona. A rifampicina atravessa as membranas celulares e é eficaz na inativação de organismos intracelulares. O índice morfológico (IM) chega a zero dentro de 4 a 6 semanas de tratamento. No entanto, o índice bacteriológico (IB) demora mais para declinar. Dados na literatura relatam que uma única dose de 1200 mg do medicamento administrado aos pacientes com hanseníase reduzem o número de bacilos presentes na pele drasticamente em poucos dias, tornando-os indetectáveis.⁽⁴¹⁾

1.4.1.3. Clofazimina

Clofazimina (CLO) é uma droga lipossolúvel com ação bacteriostática e anti-inflamatória, cuja base bioquímica para ações antimicrobianas continua a ser elucidada. Segundo a literatura, a droga age possivelmente bloqueando a função de modelo de DNA, aumentando a síntese enzimática lisossômica e aumentando a capacidade fagocítica dos macrófagos. Ele se liga à região rica em GC (guanina-citosina) no DNA micobacteriano e não se liga em DNA de mamíferos⁽⁴²⁾. A sua propriedade anti-inflamatória e a eficácia no tratamento de reacções de lepra tipo 2 (RT2) é através da estimulação da síntese de prostaglandina E2 (PGE2) e inibição da mobilidade dos neutrófilos, junto com a supressão seletiva do subtipo Th1 das células T helper⁽⁴³⁾.

1.5. Efeitos adversos

Apesar da grande eficiência do tratamento poliquimioterápico, seus componentes promovem efeitos colaterais a longo ou curto prazo nos pacientes acometidos pela doença. Vários efeitos colaterais são relacionados à dapsona, a principal causadora de efeitos colaterais, entre os quais: gastrite, cefaleia, fotodermatite, metahemoglobinemia, anemia hemolítica, agranulocitose, hepatite, síndrome sulfona, neuropatia periférica e síndrome nefrótica. A clofazimina tem como efeitos colaterais conhecidas a hiperpigmentação cutânea, a ictiose e a síndrome do intestino delgado. A rifampicina apresenta como efeitos colaterais a hepatotoxicidade, síndrome pseudo-gripal. Choque, dispneia, trombocitopenia, psicose, anemia hemolítica e insuficiência renal podem ocorrer raramente^(44, 45, 46).

1.6. Negligência ao Tratamento

Existem discussões que apontam os motivos dos abandonos do tratamento, podendo estar relacionados à ocorrência de efeitos colaterais das drogas utilizadas, bem como a não orientação prévia e adequada sobre os mesmos pelas equipes de saúde, que não estão devidamente treinados para o diagnóstico e manejo destes efeitos⁽⁴⁴⁾.

1.6.1. Negligência nos exames de contatos intradomiciliares e pacientes

Um estudo feito na Paraíba em 2013 fez a análise dos discursos de contatos intradomiciliares e foi possível apreender seis motivos pelos quais não fazem o exame:

ausência de sinais/sintomas da doença; falta de interesse e/ou omissão; falta de informação ou informação inadequada; incompatibilidade de horários e/ou trabalho; vergonha e/ou preconceito para com a doença ou o exame; medo do exame ⁽⁴⁷⁾. Outros estudos feitos no Pará e Paraná apontam que outro motivo que prejudica o controle da doença é a falta de informação e acompanhamento dos profissionais de saúde ^(48, 49). Os estudos apresentam como conclusão que os participantes não procuraram a USF para realizar o exame dermato neurológico por falta de acompanhamento e de informações prestadas pelos profissionais de saúde que os atendem na Estratégia em Saúde da Família ^(47, 48, 49).

A ausência de conscientização e acompanhamento nos casos de pacientes com hanseníase e seus contatos intradomiciliares podem gerar uma maior chance de aparição de cepas resistentes nas regiões endêmicas da doença, tornando o seu controle mais difícil. Dados da Universidade Federal de Uberlândia mostram que 33% dos pacientes em registro ativo no Centro de Saúde Escola – UFU e do município estão em abandono e que um dos motivos é relacionado aos efeitos adversos, bem como a falta de orientação prévia adequada dos profissionais de saúde.⁽⁴⁴⁾

1.7. Cepas de *Mycobacterium leprae* resistentes

Para controlar doença e evitar o surgimento de cepas resistentes, o tratamento da hanseníase tornou-se uma poliquimioterapia com a adição da Rifampicina e Clofazimina ^(37, 38, 42). Contudo, para essa estratégia obter resultados positivos, é necessária a adesão ao tratamento. Após alguns anos da implementação da PQT, casos de cepas multirresistentes surgiram no mundo. Maeda e seus colaboradores ⁽⁵⁰⁾ em 2001 analisaram um total de 88 amostras vindas do Japão, Paquistão, Haiti, Indonésia e Filipinas. Trinta delas apresentaram multirresistência pelo menos a duas drogas e em alguns casos, resistência a três drogas da PQT. Na China, em 2014 ⁽⁵¹⁾, foram encontrados casos resistências primárias com multirresistência (dapsona e rifampicina ou ofloxacina e rifampicina) na província de Shandong. Ainda em 2014, na Colômbia ⁽⁵²⁾, um estudo com 941 pacientes mostra de 4,14% eram resistentes a uma ou mais drogas, sendo que 5,77% foram encontrados em novos pacientes e 3,04% em pacientes já tratados. Nesse estudo é mostrado também que 3,19% da coorte é resistente à rifampicina, droga bactericida do tratamento. Casos de resistência primária (onde o indivíduo contrai a doença com o genótipo resistente às drogas) ou secundária

(adquirida durante o tratamento) precisam de melhor monitoramento durante e após o tratamento para diminuição do risco de disseminação de cepas resistentes.

1.7.1. Resistência à Dapsona

Nos anos 70, publicações em todo o mundo registraram a resistência a sulfona (DDS), então único fármaco para tratamento da Hanseníase. Ainda nessa década surgem outros medicamentos específicos, como a clofazimina (CLO) e a rifampicina (RIF), além das primeiras recomendações dos esquemas terapêuticos associados, utilizando dois ou três quimioterápicos (Figura 1.10).⁽⁵³⁾

1.7.2. Resistência à Clofazimina

A resistência à clofazimina é muito raramente relatada, o que possivelmente pode ser devido ao seu múltiplo mecanismo de ações⁽⁵⁴⁾. Em um estudo de 2015⁽⁵⁵⁾ observou-se que 97% (93/96) de mutantes de *M. tuberculosis* resistentes a clofazimina apresentavam mutação no gene *rv0678* que codifica um repressor de transcrição para a bomba de efluxo MmpL5.

1.7.3. Resistência à Rifampicina

O mecanismo molecular da resistência à rifampicina foi primeiramente descrito em *Escherichia coli* e foi elucidado em 1993 em *M. leprae*^(56,57). As mutações que conferem a resistência à rifampicina (RifR) são quase exclusivamente do gene *rpoB* (codificando a subunidade β de RNA polimerase dependente de DNA) em todos os organismos testados, incluindo *E. coli* e *M. tuberculosis*. Análises genéticas abrangentes forneceram detalhes moleculares de alterações de aminoácidos na subunidade β apontando resistência à RIF (Figura 1.10).⁽⁴¹⁾

1.7.4. Resistência à Ofloxacina

A ofloxacina é uma fluorquinolona que tem efeito bacterioestático, tendo como alvo as subunidades A e B da DNA girase, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* do bacilo, prejudicando a replicação de DNA. O medicamento utilizado como droga de segunda linha, juntamente com a monociclina, nos casos de pacientes sensíveis à dapsona, clofazimina e rifampicina⁽⁵⁸⁾. Contudo, dados da literatura mostram que o gene que

codifica a proteína alvo pode apresentar uma mutação conhecida, responsável por conferir ao bacilo resistência medicamentosa (Figura 1.11).

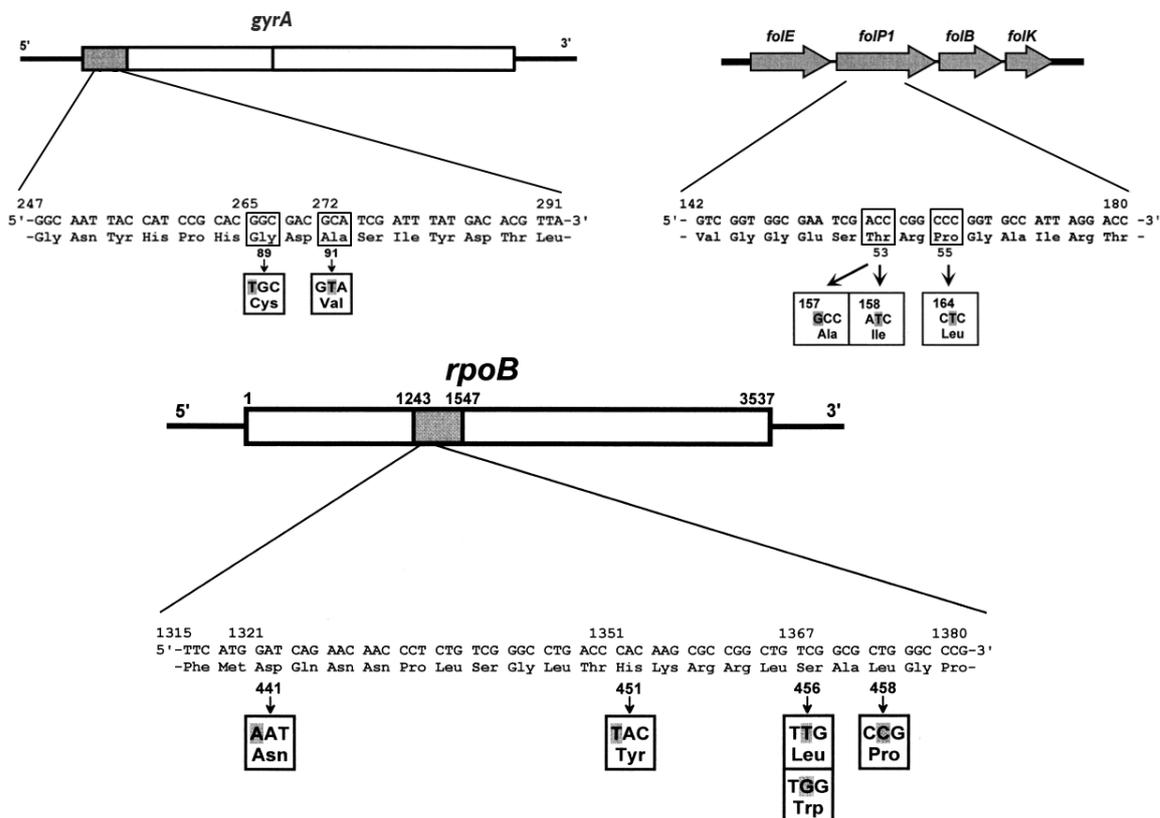


Figura 1.11. Sequências parciais dos genes que codificam os alvos da poliquimioterapia, suas respectivas regiões de polimorfismo e os polimorfismos estudados nesse trabalho (em destaque). Fonte: adaptado de Maeda *et al.*, 2001⁽⁵⁰⁾

1.8. Farmacogenética

A observação de que existem diferenças individuais na resposta ao tratamento farmacológico não é um conceito novo. No início do século XX, o médico britânico Archibald Garrod desenvolveu o conceito de “individualidade química” para interpretar as características de certos indivíduos que apresentam toxicidade com uma dose de fármaco inofensiva para a maioria. O conceito de farmacogenética se originou mais tarde, nos anos 50.⁽⁵⁹⁾

A farmacogenética é o estudo das variações genéticas que geram respostas não padronizadas aos medicamentos incluindo diferenças na eficiência da droga no organismo, interações droga-droga e o risco relativo, por exemplo, de reações adversas. Estudos de mutações e polimorfismos que podem afetar a expressão ou atividade de

receptores farmacológicos, proteínas transportadoras, sinalizadoras e de enzimas metabolizadoras são necessários elucidar esses eventos. ⁽⁶⁰⁾

1.8.1. Polimorfismos de genes e variações de respostas farmacológicas

Os polimorfismos presentes nos genes que codificam enzimas que atuam no metabolismo de drogas exercem um papel fundamental na utilização das mesmas em terapia, principalmente em relação à má absorção, a biotransformação ou excreção, podendo refletir também em fatores que aumentam riscos em doenças (Figura 1.11). ⁽⁶¹⁾

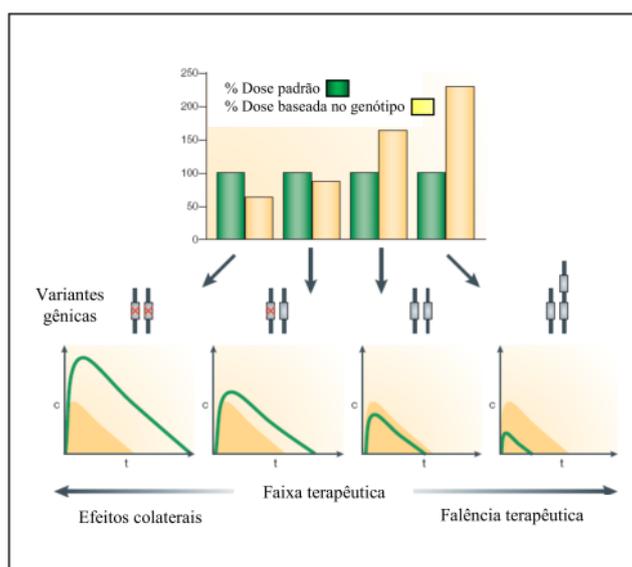


Figura 1.12. Esquema mostrando o benefício do ajuste de dose de uma droga, baseado no genótipo do indivíduo. Indivíduos com variantes gênicas que codificam enzimas metabolizadoras de drogas com baixa atividade têm maior propensão a desenvolver efeitos colaterais. C = concentração da droga; T = tempo. Fonte: Teixeira *et al.*, 2009. ⁽⁶²⁾

A enzima arilamina N – acetiltransferase 2 humana (NAT2) está entre as mais estudadas em relação a polimorfismos associados à metabolização de drogas. As Arilaminas N- acetiltransferases (NATs) são enzimas de metabolismo que catalisam a conjugação de um grupo acetil-Coa em uma fração amina, hidrazina ou hidroxilamina de um composto aromático ⁽⁶³⁾. A enzima NAT2 humana é codificada pelo gene *NAT2*, localizado no braço curto do cromossomo 8 (8p21.3–23.1), contendo uma região codificante de 870 pares de bases (pb). ⁽⁶⁴⁾ A relação os haplótipos e o seu perfil de metabolismo permite a definição de seu perfil de acetilação. Os alelos de NAT2 *5, *6, *7, *14 e *19 conferem um fenótipo de acetilação lenta, enquanto os alelos NAT2 *4 e dos clusters *12 e *13 conferem um fenótipo de acetilação rápida (Tabela 1.4). O s

perfis de acetilação lento são relatados na literatura como os perfis de maior susceptibilidade a hepatotoxicidade. ^(65, 66, 67)

Tabela 1.3. Exemplos de classificações dos genótipos/fenótipos de NAT2. Fonte: adaptado de Teixeira et al., 2009.⁽⁶²⁾

Genótipo de NAT2	Fenótipo de NAT2
*4/*5C	intermediário
*4/*12C	rápido
*4/*14A	intermediário
*4/*14B	intermediário
*4/*14E	intermediário
*5B/*5C	lento
*5B/*14A	lento
*5B/*14B	lento
*5C/*6A	lento
*5C/*7B	lento
*5C/*12A	intermediário
*5C/*13	intermediário
*6A/*12C	intermediário
*6A/*14A	lento
*6A/*14B	lento
*12A/*14B	intermediário
*13/*14B	intermediário
*14A/*14A	lento

Os citocromos P450 (CYPs) são proteínas de uma superfamília contendo heme como cofator, sendo por definição hemoproteínas. Os CYP usam várias moléculas pequenas e grandes como substratos em seu metabolismo. Diversas proteínas da superfamília de CYP450 estão relacionadas ao metabolismo de drogas no tratamento da Hanseníase e tuberculose (Figura 1.13). As enzimas CYP foram identificadas em animais, vegetais, fungos, protistas, bactérias, arqueias e até mesmo em vírus ⁽⁶⁸⁾. Mais de 200 mil proteínas CYP distintas são conhecidas e podem ser classificadas em vários grupos. ^(69, 70)

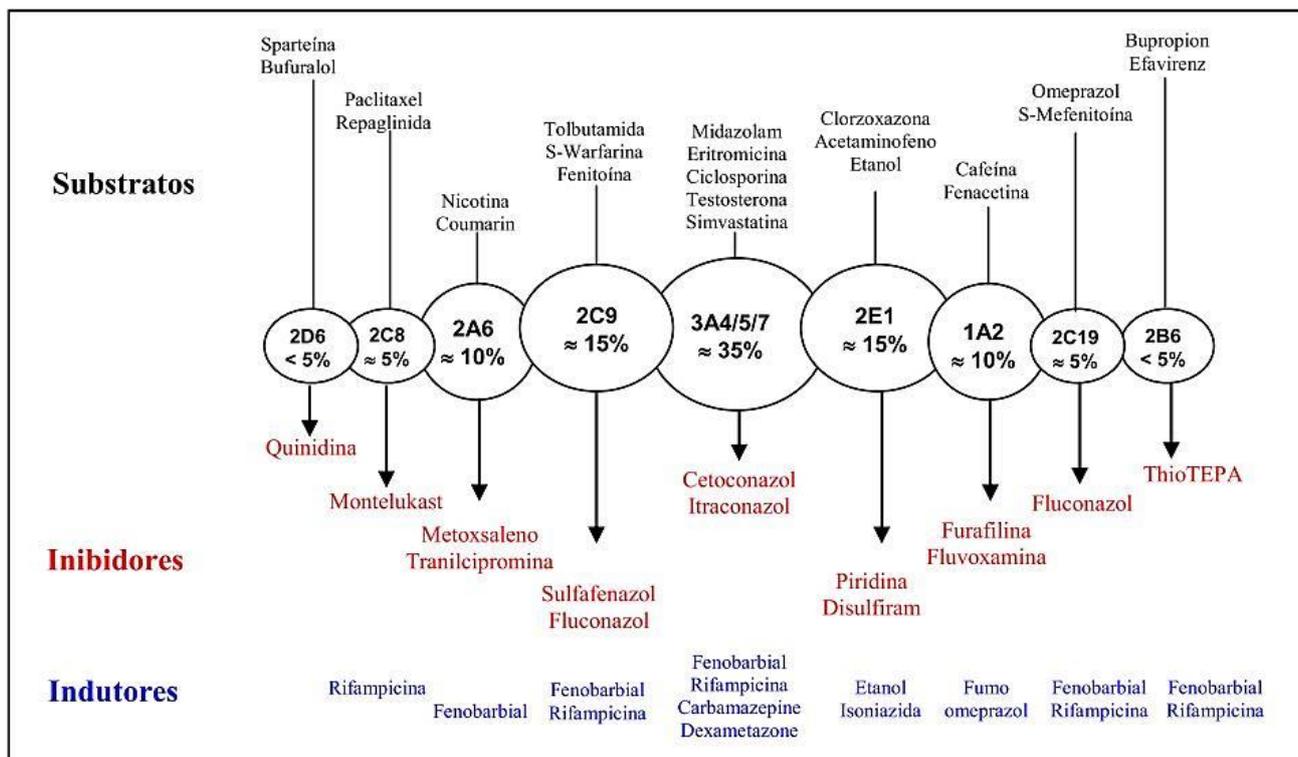


Figura 1.13. Isoformas de CYP450 no fígado e alguns exemplos de substratos, inibidores e indutores. Fonte: Pelkonen *et al.*, 2008 ⁽⁷¹⁾

O CYP3A4 é responsável pelo metabolismo oxidativo de uma grande variedade de xenobióticos, incluindo cerca de 60% de todos os medicamentos clinicamente utilizados. Nos seres humanos, a proteína CYP3A4 é codificada pelo gene *CYP3A4*. Este gene faz parte de um conjunto de genes da super-família do citocromo P450, localizados no cromossomo 7q21.1. Embora a expressão do gene *CYP3A4* seja induzida em resposta a uma variedade de compostos, o mecanismo implícito a essa indução, que representa uma base para interações medicamentosas em pacientes, ainda não foi bem elucidada. ^(72, 73, 74). Em um estudo sobre diferenças nos genótipos nos loci *SRD5A2* e *CYP3A4* de acordo com a etnia, verificou-se que o alelo *CYP3A4* * 1B era mais comum em ganeses e afro-americanos (frequência gênica superior a 50%) do que em caucasianos (menos de 10%) e foi aparentemente inexistente em asiáticos. ⁽⁷⁵⁾. O gene *CYP3A4* pode possuir alelos homozigotos selvagens (AA), heterozigotos com seu variante *CYP3A4**1B (AG) e homozigotos variantes (GG), onde seu alelo variante causa a inatividade catalítica da molécula *in vivo*. ⁽⁷⁶⁾

A CYP3A5, juntamente com a CYP3A4, contabilizam aproximadamente 30% dos citocromos p450 encontrados no fígado. CYP3A5 pertence a super-família do citocromo

P450 e são responsáveis pelo metabolismo de mais de 50% de todos os fármacos clinicamente utilizados e são reguladas diferentemente na próstata, onde a mesma pode metabolizar hormônios sexuais. O CYP3A5 funcional (selvagem) é codificado pelo alelo *CYP3A5*1*.^(77, 78, 79)

O alelo *CYP3A5*3* é o variante não funcional mais comum de CYP3A5. Este alelo é gerado pelo SNP 6986A>G (onde a forma selvagem possui uma A nesta posição), promovendo um sítio de splicing crítico no intron 3, alterando o splicing do RNAm e alterando o códon de terminação, criando uma proteína prematura e não funcional. É considerado que indivíduos com o genótipo *CYP3A5*3/*3* não expressam CYP3A5.⁽⁷⁵⁾ O *CYP3A5*6* é outro alelo não funcional de CYP3A5. É gerado pelo SNP (14690G>A) no éxon 7 e causa um splicing alternativo em *CYP3A5* onde o éxon 7 é ignorado, truncando a proteína e causando a ausência de CYP3A5 no organismo.⁽⁷⁹⁾

A modulação de CYP2E1 é feita por polimorfismos em vários locais do gene, podendo gerar um alto nível de atividade enzimática, produzindo hepatotoxinas em grandes quantidades e levando a hepatotoxicidade. Dois polimorfismos são detectáveis pelas enzimas de restrição *Pst* I e *Rsa* I em CYP2E1 e parecem estar em desequilíbrio de ligação. Os genótipos de CYP2E1 são classificados como *1A / *1A, *1A / *5 e *5 / *5, de acordo com o resultado obtido pela técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) usando *Rsa* I como enzima de restrição. *CYP2E1*1* é considerado o genótipo selvagem, rápido, e sua configuração *1/*1 induz a hepatotoxicidade no tratamento da tuberculose. O alelo *CYP2E1*5* é divide opiniões, pois já foi apontado como alelo que aumenta a atividade enzimática, porém existem artigos que não confirmam essa relação. A enzima CYP2E1 pode ser encontrada nos rins, trato gastrointestinal, cérebro, mas é expressa principalmente no fígado. É estudada amplamente nas áreas toxicológicas e de carcinogênese, pois está envolvida na oxidação de etanol, nitrosaminas, acetona e substratos de baixo peso molecular. Mitra e seus colaboradores relatam que esta enzima pode atuar produzindo substâncias tóxicas, como a hidroxilamina dapsona, após a catalisação da droga.^(62, 80, 81, 82, 83, 84)

Alguns estudos sobre a relação dos genótipos de NAT2 e da família CYP450 para a metabolização de drogas da hanseníase e tuberculose e relações com possíveis efeitos adversos já foram feitos. A dapsona, droga antileprotica desde a monoterapia, e seus derivados são metabolizados pela super família de CYP450 (3A4, 3A5 e 2E1), segundo

dados da literatura. Estes estudos são importantes para uma melhor administração do tratamento para o paciente, diminuindo riscos de toxicidade e efeitos adversos. ^(62, 84) Contudo, sua impotência em relação a viabilidade do bacilo durante o tratamento ainda não foi explorada.

1.9. Métodos de detecção do bacilo

1.9.1. Métodos clássicos de detecção

A metodologia para diagnósticos de doenças se tem mostrado cada vez mais rápida e precisa, entretanto, durante muito tempo, foram utilizados métodos com sensibilidade limitada e com pouca especificidade. É conhecido que o *M. leprae* não é cultivável em meios axênicos, fator que interfere em seu estudo e, como consequência, entendimento da doença. ⁽¹⁰⁾

Tendo como obstáculo seu cultivo, em 1960 foi postulado em artigo científico um método de cultivo do bacilo de Hansen o qual é utilizado até os dias atuais. Esse método, conhecido como “modelo Shepard” foi desenvolvido pelo Dr. Charles Carter Shepard (Figura 1.13), o qual desenvolvia pesquisas sobre doenças no Centro de Controle e Prevenção de Doenças nos Estados Unidos (CDC). O método consiste na inoculação de bacilos vindos de pacientes hansênicos em coxim plantar de camundongos balb/c e, após um período de 4 a 8 meses, a lesão gerada pelo bacilo na pata de camundongo apresentava uma massa de bacilos adequada para estudo. Esse método também foi utilizado para diagnóstico e para determinação de resistência do bacilo às drogas. ⁽⁸⁵⁾



Figura 1.14. Dr. Charles Carter Shepard. Fonte: CDC

Outro método utilizado amplamente desde os estudos primordiais da doença é o método de detecção do bacilo pela coloração de Ziehl Neelsen, desenvolvida pelo bacteriologista Dr. Franz Ziehl e pelo patologista Dr. Friedrich Neelsen. Esta técnica de coloração é eficiente para identificação de bacilos álcool-ácido resistentes, ou seja, micobactérias naturalmente resistentes à descoloração por soluções álcool-ácidas. ⁽⁸⁶⁾ Contudo, sua especificidade e sensibilidade são limitadas, pois não determinam se o bacilo corado é *M. leprae* ou de outra espécie e quanto à viabilidade do bacilo, não é possível dizer com precisão se o bacilo está de fato vivo.

1.9.2. Métodos modernos de detecção

O diagnóstico é um passo importante para o tratamento de doenças. Em 1983, ocorreu uma revolução na área da biologia molecular, onde o estudo de doenças, disfunções genéticas, diagnósticos, entre outros temas ganhou uma tecnologia amplamente utilizada nos dias atuais, a reação em cadeia de polimerase (PCR). A PCR foi inventada pelo bioquímico Dr. Kary Banks Mullis em 1983, permitindo amplificação de amostras utilizando pares de primers da região de interesse no DNA utilizando a enzima DNA polimerase em ciclos que apresentavam temperaturas para desnaturação do DNA, ligação dos primers e extensão/polimerização da região desejada. Tal invenção lhe rendeu um Nobel de química em 1993 junto com o Dr. Michael Smith, desenvolvedor da técnica de mutagênese sítio-dirigida ⁽⁸⁷⁾. A rápida degradação da DNA polimerase na etapa de desnaturação prejudicava a eficiência da técnica. Logo, em 1986, o Dr. Saki e seus colaboradores sugeriram a utilização da DNA polimerase de *Thermus aquaticus*, enzima mais termoestável que possibilitava uma maior eficiência na técnica. ⁽⁸⁸⁾

A utilização da técnica de PCR para diagnóstico e estudo científico foi um grande marco para a ciência. Para o estudo da hanseníase, sua sensibilidade e especificidade ajudaram no diagnóstico das formas da hanseníase, onde até mesmo o polo paucibacilar, forma de menor carga bacilar e difícil identificação pelos métodos clássicos, pode ser diagnosticada. ^(88, 89, 90).

Sua identificação molecular se tornou possível em vários espécimes com a utilização da PCR. Atualmente, é possível detectar o *M. leprae* em amostras de esfregaço de pele, urina, swab nasais e bucais, lesões oculares, sangue, nervos e até mesmo em amostras de pacientes oito anos após o uso da PQT, tanto do polo paucibacilar quanto do polo multibacilar ⁽⁹¹⁻⁹⁸⁾. Os alvos mais comumente utilizados para detecção do bacilo de Hansen são o os genes que codificam as proteínas pra-36 kDa (*Proline-rich-antigen*), o antígeno 18-kDa, Ag85B, a subunidade ribossomal 16S e a sequência repetitiva específica de *M. leprae*, RLEP. ⁽⁹⁹⁾

Durante muito tempo, somente era possível detectar a presença do bacilo por baciloscopia, porém só havia um método para verificar sua viabilidade, o modelo de Shepard. Apesar de funcional, o modelo Shepard era muito demorado para ser utilizado para checar a viabilidade do bacilo, logo, em 2009, Martinez e colaboradores

desenvolveram um método molecular para mensurar a viabilidade do *M. leprae* por PCR quantitativo (qPCR), consistindo na correlação entre os níveis de DNA do gene 16S ribossomal e seu transcrito, na forma de cDNA: produto gerado do RT-PCR do 16S RNAr do *M.leprae*. Sabendo-se da instabilidade inerente à molécula de RNA (normalizador da viabilidade) e da estabilidade inata à molécula de DNA (normalizador da carga bacilar), havendo a inativação do bacilo, a relação entre os níveis de cDNA e DNA irá cair drastimante ⁽¹⁰⁰⁾. No mesmo ano, Lini e seus colaboradores⁽¹⁰¹⁾ também utilizaram a técnica de qPCR, porém em 47 amostras de raspado de pele de pacientes, para a quantificação dos níveis de DNA e RNAm do gene *hsp18*, onde 29 foram positivas para o gene. A técnica se mostrou eficiente em casos reacionas e mostrou que o DNA pôde ser detectado 2 anos após o uso da PQT. Ambos os estudos sugerem que a técnica de qPCR é uma importante ferramenta para o melhoramento e acurácia das técnicas utilizadas no tratamento da doença.

Tendo conhecimento desses dados, este estudo pretende apontar novas causas ou corroborar com a literatura elucidando os motivos da persistência prolongada do bacilo no organismo do paciente.

2. Justificativa

A Hanseníase, ou Mal de Hansen, mesmo sendo uma das doenças mais antigas da humanidade, ainda representa um problema de saúde pública, tendo muitos questionamentos a serem respondidos em relação à sua patofisiologia. O estudo de seu polo lepromatoso é necessário pelo seu alto grau incapacitante e disseminação de bacilos no ambiente, bem como o seu polo tuberculóide, que também pode causar lesões em nervos periféricos.

A introdução da poliquimioterapia na década de 80 foi um grande avanço no tratamento da doença, porém os dados da OMS mostram que o número de novos casos ainda se mantém alta. Portanto, pode-se concluir que a transmissão da doença se mostra ativa em vários países.

A PQT/OMS começou a ser implementada no Brasil em 1986, em 1991 foi adotada oficialmente pelo Ministério da Saúde (MS), sendo o tratamento poliquimioterápico recomendado para todos os casos de Hanseníase. Todavia, sua administração chegou a ser questionada pelos centros de saúde espalhados pelo país, em função dos muitos casos de efeitos adversos. A Sulfona, ou como é conhecida hoje, a Dapsona, é administrada na dose de 100 mg por dia, sem períodos de repouso; a Clofazimina também é administrada nesta dosagem e a dose diária de Rifampicina corresponde a 600 mg. Todas elas são capazes de produzir efeitos colaterais.

A enzima NAT2 é responsável pela biotransformação da dapsona e sua metabolização oxidativa da droga é feita por enzimas da superfamília do citocromo P450. Dependendo da variação alélica do indivíduo, é possível o surgimento de altos níveis de toxicidade no organismo (como a hepatotoxicidade) e efeitos adversos. No Brasil, existe a predominância de grupos com alelos lentos de NAT2. Quanto ao perfil oxidativo, dados mostram que a relação entre os variantes de CYP3A, CYP3A5 (*CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* e *CYP3A5*6*) ou CYP2E1 com a acetilação lenta de NAT2 aumentam as chances de surgimento de efeitos adversos e consequente abandono. ^(62, 84)

Os pacientes de ambos os pólos da doença abandonam o tratamento, com registros de efeitos adversos ou não, existindo a possibilidade de abandono e/ou falta de adesão do paciente ao tratamento, bem como problemas de treinamento dos profissionais de saúde. ⁽⁴⁴⁾. Em outros casos, a falha terapêutica se deve aos hábitos do paciente que por falta de confiança, constrangimento ou até mesmo por motivos confidenciais, não apresentam

seus dados para registro no prontuário, dificultando a formação de um tratamento mais eficaz. ⁽⁴⁷⁾.

O fracasso do tratamento por falta de adesão, falhas terapêuticas ou mau treinamento dos profissionais de saúde pode ter como consequência o surgimento de cepas resistentes às drogas no tratamento de doenças. ^(44, 50, 62, 84) A resistência secundária aparece durante o tratamento da Hanseníase, quando pacientes fazem uso de dose baixa ou irregular das drogas. ⁽⁵²⁾ Logo, uma abordagem molecular é necessária para a diminuição do erro na terapia.

O índice baciloscópico (IB) em amostras de paciente, apesar de amplamente estabelecido, não é um bom parâmetro para monitoramento de desfecho de cura, pois o IB diminui muito lentamente durante o tratamento, e em alguns casos, ele se mantém estável durante e depois o final do tratamento. ^(58, 100)

Martinez ⁽¹⁰⁰⁾ e Lini ⁽¹⁰¹⁾, juntos com seus colaboradores em 2009 mostraram a capacidade da detecção da viabilidade de *M. leprae* em espécimes clínicos. O emparelhamento feito em estudos anteriores foi feito com amostras de pacientes antes, um e dois anos após do tratamento. No entanto, não foram testadas amostras emparelhadas de pacientes antes, durante (mensal) e depois do tratamento, de modo que a presente proposta visa preencher essa lacuna no entendimento do tratamento.

Diante desta situação emerge a necessidade urgente do desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e controle desta endemia, o que requer uma clara compreensão dos mecanismos que contribuem para o sucesso ou fracasso do tratamento. Além da curva de viabilidade do emparelhamento das amostras durante o tratamento, o projeto tem como foco os outros possíveis fatores que podem auxiliar na viabilidade do bacilo, sejam eles metabólicos, presença de resistência ao medicamento, entre outros fatores, tais como maus hábitos de saúde, descontinuação do tratamento, treinamento inadequado dos profissionais da saúde, etc. É necessária uma maior relação nas abordagens moleculares e clínicas para o melhor monitoramento e adequação de tratamento aos pacientes. Tendo em mãos este conhecimento, podemos observar com maior clareza os reais motivos da persistência do bacilo.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Este projeto tem como objetivo geral identificar por PCR em tempo real a viabilidade do *M. leprae* em raspados nasais e bucais de pacientes multibacilares do Mal de Hansen ao longo da poliquimioterapia, construindo curvas de sobrevivência bacteriana ao longo dos primeiros 6 meses do tratamento e avaliar os possíveis motivos de sua viabilidade.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Construir um banco de DNA e RNA de raspados da mucosa nasal e cavidade oral de pacientes multibacilares com intervalos mensais ao longo dos 6 primeiros meses de tratamento;

- Mensurar a viabilidade e a carga bacilar por PCR em tempo real a partir de amostras de swab nasal e bucal de 15 pacientes multibacilares de hanseníase ao longo dos 6 meses de tratamento poliquimioterápico;

- Identificar as mutações (em amostras de pacientes que apresentarem níveis detectáveis de RNA micobacteriano ao fim do tratamento) em genes envolvidos em resistência a fármacos: *folP1*, *gyrA* e *rpoB*.

- Verificar a interação medicamentosa observada em pacientes durante o tratamento, identificando as características dos genes envolvidos na metabolização de drogas como o gene *NAT2* e os genes *CYP3A4*, *3A5*, e *2E1*, da família do *CYP450*.

- Avaliar dados dos pacientes que podem interferir no tratamento, tais como a obesidade, co-morbidades, tabagismo, etilismo, etc.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta de amostras de pacientes e controles durante o tratamento e coleta de amostras de indivíduos não acometidos pela doença.

Uma coorte de 15 pacientes acometidos por Hanseníase multibacilar iniciou o tratamento com a PQT após a confirmação da forma da doença através do exame dermatológico e índice baciloscópico concluídos. Os pacientes convidados apresentam o IB acima de 3,5 e aceitaram participar do projeto aprovado pelo comitê de ética (Parecer nº 1.950.165) após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, coletando raspado nasal e bucal nos dias de administração assistida no Ambulatório Souza Araújo (ASA - Fiocruz). Foram coletados tubos de sangue para posterior análise genotípica de genes envolvidos no metabolismo de drogas. Vinte indivíduos (10 do Pavilhão Hanseníase e 10 de um laboratório que não trabalha com micobacterioses) foram convidados a participar do estudo como controle após terem assinado o Termo de consentimento livre e esclarecido e tiveram amostras coletadas com a finalidade de ser controle do estudo.

4.2. Análise de Viabilidade de *M. leprae*

4.2.1. Extração de RNA e DNA

Após a obtenção do material, o reagente Trizol Reagent (Invitrogen) foi adicionado em um volume de 500 µl imediatamente. As amostras foram homogeneizadas utilizando o vórtex. Os tubos foram resfriados no gelo por 2 minutos entre as homogeneizações. Após as homogeneizações os tubos foram resfriados por 5 minutos e em seguida adicionou-se 100 µl de clorofórmio. Após rápida mistura por inversão, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g a 4°C por 15 minutos. O líquido sobrenadante (fase aquosa que contém o RNA) foi transferido para um novo tubo e precipitado com álcool isoamílico (24:1). O pellet de RNA foi centrifugado por 30 minutos a 12.000 x g e lavado em etanol 70%, sendo centrifugado por 15 minutos a 12.000 x g. O pellet foi dissolvido em 30 µl de água destilada e estéril, e armazenada a -70°C até o uso. O DNA foi purificado a partir da fase orgânica e interfases restantes dos tubos de amostras. Foram adicionados 50 µl de solução 10 mM de Tris-EDTA (pH 8,0) e 75 µl de solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e homogeneizadas no vórtex. Após uma centrifugação de 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e o DNA foi precipitado com álcool isoamílico. O pellet de

DNA foi lavado em etanol 70%, centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g e dissolvido em 20 µl de água destilada e estéril, e armazenada a -70°C até o uso. Para análise quantitativa foi a densidade ótica a 260 e 280 nm foi medida no aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) tanto para RNA quanto para DNA.

4.2.2.cDNA do RNA de *Mycobacterium leprae*.

Após a extração do RNA, o mesmo foi tratado com o kit *Turbo DNA-free kit* (Thermo Fisher Scientific), utilizando as recomendações do fabricante, para a degradação do DNA contaminante nas amostras de RNA e sua melhor qualidade. A transcrição reversa do RNA foi feita utilizando o *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, utilizando entre 40 a 500 ng de RNA por reação.

4.2.3. PCR em tempo real

Os níveis de 16S RNAr de *M. leprae* das amostras coletadas foram determinados por PCR em tempo real. Foram adicionadas nas reações uma quantidade de 10 a 50 ng de DNA e 10 a 50 ng de cDNA (de acordo com o rendimento da extração das amostras (ng/µl) e respeitando o padrão de quantidade de amostra por paciente), utilizando 5,0 µl de Master Mix *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 0,2 µl de sonda, 0,2 µl de Mix de primer de 16S RNAr (Tabela 4.1) a 10 mM e água livre de nucleases, complementando a quantidade de amostra adicionada, até o volume final de 10 µl na reação. As reações foram submetidas a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, e em seguida 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto usando o sistema de PCR em tempo *StepOne Plus®* (Applied Biosystems). Para garantir que não houve contaminação por DNA no cDNA, foram utilizadas amostras de RNA tratadas com DNase nas reações de RT-PCR com a ausência da transcriptase reversa (amostras RT-), juntamente com controles negativos nas reações de PCR (contendo água ao invés da amostra) e controles positivos (contendo *M. leprae* purificado).

4.2.4. Análise dos dados da PCR

Os CTs gerados através do PCR em tempo real foram mensurados por *fold change* ($2^{-\Delta\Delta CT}$), medindo os níveis de cDNA de 16S RNAr, normalizando com o DNA do bacilo. Os dados foram inseridos e analisados no programa *GraphPad Prism* 5. As análises das replicatas experimentais foram feitas separadamente para a geração das barras de erro dos experimentos.

4.3. Análise de resistência

4.3.1. PCR de resistência

As amostras de DNA de raspado bucal e nasal que apontaram viabilidade até o sexto mês de tratamento foram preparadas para uma PCR utilizando o *QUIAGEN Multiplex PCR Kit* (QUIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando os primers dos genes de resistência (*folP1*, *gyrA* e *rpoB*) (Tabela 4.1) e submetidas à ciclagem de 95°C por 15 minutos, 6 ciclos de 94°C por 45 segundos, 68°C e 63°C por 45 segundos, 72°C por 90 segundos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos, 72°C por 90 segundos e, por fim, 72°C por 10 minutos no aparelho Veriti 96 Thermal Cycler® (Applied Biosystems).

4.3.2. Análise dos produtos de PCR

O material purificado foi analisado em um gel de agarose a 2% para determinar a quantidade a ser aplicada na reação de purificação. Os padrões de peso molecular utilizados foram o *GeneRuler 50 bp DNA Ladder* e o *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Sigma-Aldrich) para avaliação dos produtos de PCR.

4.3.3. Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

As amostras positivas após a PCR foram purificadas utilizando as colunas de sílica do *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante. O material purificado foi analisado em um gel de agarose a 2% para verificar a quantidade a ser aplicada na reação de sequenciamento.

4.3.4. Reação de sequenciamento

Os produtos amplificados foram diluídos e foram adicionados primers *Foward* ou *Reverse* numa concentração de 3,2 pmol e 0,5 µl do *Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit* que contém nucleotídeos livres (dNTPs), nucleotídeos marcação de fluorescência (ddNTPs), cloreto de magnésio (MgCl₂), tampão e a enzima *Taq* Polimerase. A reação de sequenciamento foi realizada em um termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems) nas seguintes condições de temperatura: 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

4.3.5. Precipitação da reação de sequenciamento

Foi adicionado no produto da reação de sequenciamento 30 µl de isopropanol 75%, incubando por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 1180 x g por 45 minutos a 20°C. Posteriormente, a placa foi invertida em papel toalha para eliminação do líquido. Foi aplicado ao pellet 50 µl de etanol 75%, centrifugando a 1180 x g por 15 minutos a 20°C. A placa foi invertida em papel toalha mais uma vez para a remoção de todo o líquido. O *pellet* foi seco em um termociclador por 10 minutos a temperatura de 60°C. O material seco foi ressuspenso em 10 µl de formamida Hi-Di, aquecido a 95°C com 3 minutos e inserido no gelo.

4.3.6. Análise dos genes de resistência

A análise dos eletroferogramas das sequências com possíveis mutações nos genes alvo das drogas da PQT foi feita através do programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 7.0.

4.4. Extração de DNA para análise farmacogenética

A extração foi feita a partir de 200 µl de sangue periférico com o *kit QIAmp DNA blood*[®] (Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. A eluição do DNA foi feita em TE (10 mM Tris-Cl pH 9,0; 0,5 mM EDTA) e estocado a -20°C.

4.5. Análise de NAT2

4.5.1. PCR de NAT2

Para a amplificação do gene *NAT2* foram utilizadas as condições utilizadas por Teixeira *et al.*, 2009⁽⁶²⁾. A reação foi realizada em um volume de 50 µl contendo 3,5 mM MgCl₂; 0,4 mM dNTPs, tampão 1X, glicerol 10%, 200 ng de cada primer, *Taq Gold* polimerase (Applied Biosystems) e 50 ng de DNA genômico. A condição para a amplificação consistiu em 94°C por 15 minutos, seguidos de 20 ciclos de 94°C por 1 minuto, 67°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto diminuindo 0,5°C a cada ciclo. Após a ciclagem, foram adicionados mais 15 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e, por fim, 72°C por 5 minutos.

4.5.2. Eletroforese em gel de agarose para NAT2

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,2% a 90 V em TAE (Tris base 400 mM, EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM). O DNA foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz U.V. (312 nm) no transiluminador *DNR Minibis Pro* (Uniscience).

4.5.3. Purificação dos produtos de PCR de NAT2

Para a purificação do produto de PCR foi utilizado o *kit ChargeSwitch*[®] PCR Clean-Up (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante.

4.5.4. Reação de Sequenciamento de NAT2

Para identificar os possíveis SNPs em *NAT2*, as reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *kit ABI PRISM Big Dye*[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems) de acordo com a instrução do fabricante.

4.5.5. Análise das sequências de *NAT2*

As sequências foram analisadas utilizando o programa *SeqScape* (Applied Biosystems) utilizando a sequência AY331807 da base de dados do PUBMED como referência (*NAT2**4, tipo selvagem).

4.5.5. Verificação dos haplótipos

Após a identificação dos SNPs, a reconstrução dos haplótipos foi realizada através do programa *PHASE* v2.1.1. Tal reconstrução é essencial para analisar os alelos paternos e maternos simultaneamente. O algoritmo do programa como base o teorema de bayes para a reconstrução de haplótipos para obter genótipos não ambíguos, o que determina o par de alelos mais provável.

4.6. Análises dos CYPs

A metodologia utilizada para a análise farmacogenética dos genes *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*1*, *CYP3A5*6* e *CYP2E1* foi baseada na tese de doutorado da Dr^a. Márcia Quinhones Pires Lopes⁽⁸⁴⁾.

4.6.1. Análise de *CYP3A4*1B*

A genotipagem deste gene foi realizada através do método de detecção da variante⁽¹⁰²⁾ na posição -290 (A→G) na região promotora (5''PR) do gene *CYP3A4*. A amplificação da região de interesse por PCR (-318 a +67) foi realizada utilizando os mesmos primers (Tabela 4.1) descritos no método, contendo um volume de reação de 25µL composto por 12,5µL de *KAPA2G fast Hot Start ReadyMix* (Sigma-Aldrich), 0,2µM de cada primer e 2 µL de DNA. A reação foi programada com uma desnaturação inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e, por último, uma extensão final de 72°C durante 5 minutos.

As mutações foram analisadas por sequenciamento do produto da PCR (385pb), após purificação com o kit *Charge Switch® PCR Clean-Up* (Invitrogen) conforme descrito anteriormente para o gene *NAT2*. A análise do sequenciamento foi feita utilizando o programa *SeqScape* v2.6 como descrito para o gene *NAT2*. A sequência referência utilizada para a análise foi a mesma utilizada por Cavalli⁽¹⁰²⁾ para o desenho

dos iniciadores publicada no *GenBank*, D11131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

4.6.2. Análise de *CYP3A5*

Para a genotipagem dos alelos *CYP3A5**3 e *6 e a identificação dos três genótipos (1A/1A; 1A/*3 e 3*/*3) e (1A/1A; 1A/*6 e *6/*6) utilizamos a técnica PCR-RFLP ⁽¹⁰³⁾ a qual consistiu na amplificação de uma região de interesse (200 pb) e (237 pb) respectivamente, flanqueando o SNP, onde é criado um erro na sequência do DNA amplificado. Desta maneira, as amostras que apresentarem o alelo mutante, criam ou destroem o sítio de restrição para a enzima *Dde I*. O alelo *3 (A6986G) muda a sequência CTCAA criando um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Dde I* CTCAG (Figura 4.1). O alelo *6 (G14690A) muda a sequência CTAAG destruindo um sítio de reconhecimento para a enzima *Dde I* CTAAA (Figura 4.1)

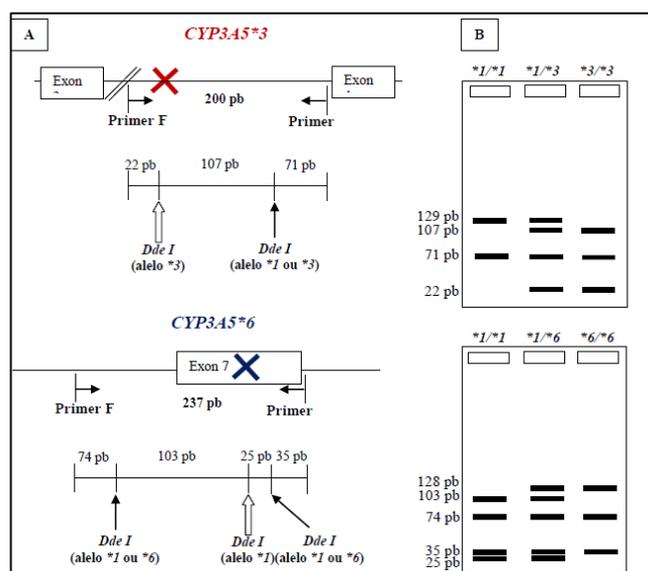


Figura 4.1. Estratégia de genotipagem (A) dos alelos *CYP3A5**3 e *CYP3A5**6 e representação esquemática (B) do perfil de digestão com a enzima *Dde I* após a eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

4.6.2.1. PCR de *CYP3A5**3

Algumas adaptações foram feitas na metodologia descrita por Fukuen e colaboradores ⁽¹⁰³⁾ para melhor rendimento do experimento. Contudo, os primers utilizados não foram alterados (Tabela 4.1) A reação foi realizada em um volume de 25µL contendo 12,5µL de *KAPA2G fast Hot Start ReadyMix* (Sigma-Aldrich), e 0,2µM de cada primer.

O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 57°C por 15 segundos, 72°C por 4 segundos e, por último, uma extensão final de 72°C durante 3 minutos.

4.6.2.2. Digestão de *CYP3A5*3* com *DdeI*

Após a amplificação, a genotipagem do alelo *CYP3A5*3* foi realizada através da digestão enzimática (RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*) do material amplificado conforme descrito por Fukuen e colaboradores ⁽¹⁰³⁾. Em suma, 7 µL do produto de PCR foi digerido com 5U da enzima *DdeI*, incubando o tudo da reação de digestão 2 horas a 37°C. A reação foi interrompida pela adição do tampão (*Loading Buffer 5X*), contendo azul de bromofenol, xilenocianol e glicerol. O produto da digestão foi aplicado em gel de poliacrilamida 15% contendo tampão TAE para separação dos fragmentos e identificação dos genótipos.

4.6.2.3. PCR de *CYP3A5*6*

O método descrito por Fukuen e colaboradores ⁽¹⁰³⁾ também foi adaptado mudando a concentração dos iniciadores e a enzima *Taq* polimerase, para melhor rendimento do experimento. A reação foi realizada em um volume de 25µL contendo 12,5µL de *KAPA2G fast Hot Start ReadyMix* (Sigma-Aldrich), 0,2µM de cada primer (Tabela 4.1)].

O termociclador foi configurado para uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 58°C por 15 segundos, 72°C por 4 segundos e, por último, uma extensão final de 72°C durante 3 minutos.

4.6.2.4. Digestão de *CYP3A5*6* com *DdeI*

Após a amplificação, a genotipagem do alelo *CYP3A5*6* foi realizada através da digestão enzimática (RFLP) do material amplificado conforme descrito por Fukuen e colaboradores ⁽⁹⁵⁾. Como o alelo 3, foi utilizado 7 µL do produto amplificado para a digestão com 5U da enzima *DdeI*. O tubo contendo a reação de digestão foi incubado por 2 horas a 37°C. A reação foi interrompida após o tempo de incubação pela adição do tampão (*Loading Buffer 5X*), contendo azul de bromofenol, xilenocianol e glicerol. O produto da digestão foi aplicado em gel de poliacrilamida 15% contendo TAE para identificação dos genótipos.

4.6.3. Análise de *CYP2E1*

Para analisar o polimorfismo na região -1053 C>T e identificar os três genótipos de *CYP2E1* (1A/1A; 1A/5; 5/5) utilizamos a técnica de PCR-RFLP descrita por Huang e seus colaboradores ⁽¹⁰⁴⁾, é amplificada uma região de interesse de 413 pb, flanqueando o SNP, e o mesmo é identificado pela digestão da enzima de restrição *Rsa* I e posterior gel de agarose para observação dos fragmentos. A amplificação foi realizada em um volume de reação de 50 µL contendo (MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,2 mM, glicerol 5%, 200ng de cada primer (Tabela 4.1), 1U de *Taq* polimerase (Invitrogen®) nas seguintes condições: 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos de 94°C 1min, 57°C 30 segundos, 72°C 30 segundos e 1 ciclo de 72°C 5 minutos.

A genotipagem do gene *CYP2E1* foi feita através da digestão enzimática (RFLP) do material amplificado. Foram utilizados 7 µL do produto de PCR para digestão com 5U da enzima *Rsa* I, incubando por 2 horas ou até 16 horas a 37°C para a digestão. Após a etapa de incubação, a reação foi interrompida pela adição do tampão (*Loading Buffer* 5X), contendo azul de bromofenol, xilenocianol e glicerol. O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 2% contendo TAE para identificação dos genótipos.

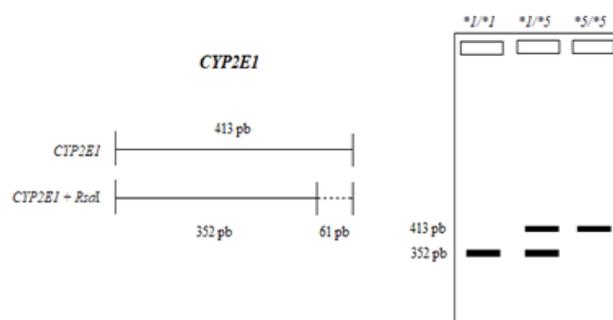


Figura 4.2. Estratégia de genotipagem do gene *CYP2E1* e perfil de digestão com a enzima *Rsa* I após a eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

4.7. Sequenciamento das amostras do estudo

As reações foram analisadas no sequenciador ABI PRISM® 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems), da Plataforma Genômica para Sequenciamento de DNA - PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A).

Tabela 4.1. Primers e sonda utilizados no estudo.

Primers/sonda	Sequências	Produto	Referência
Sonda 16S	6FAM - CATCCTGCACCGCA - MGBNFQ	---	
<i>16S RNAr</i>	<i>Foward</i> 5'-GCATGTCTTGTGGTGGAAAGC-3' <i>Reverse</i> 5'-CACCCCACCAACAAGCTGAT-3'	71 pb	Martinez <i>et al.</i> , 2009.
<i>folP1</i>	<i>Foward</i> 5'-TACTTACTGTAATCCCCTGTGCTG-3' <i>Reverse</i> 5'-TTGATCCTGACGATGCTGTC-3'	173 pb	
<i>rpoB</i>	<i>Foward</i> 5'-GGTGGTCGCCGCTATCAAG-3' <i>Reverse</i> 5'-TTTGCGGTACGGTGTTCG-3'	289 pb	Rocha <i>et al.</i> , 2011.
<i>gyrA</i>	<i>Foward</i> 5'-CCCGGACCGTAGCCACGCTAAGTC-3' <i>Reverse</i> 5'-CATCGCTGCCGGTGGGTCATTA-3'	178 pb	
<i>CYP3A4*1B</i>	<i>Foward</i> 5'- GAATGAGGACAGCCATAGAGACAAGGGGA – 3' <i>Reverse</i> 5'- CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTCTTTGCTG – 3'	385 pb	
<i>CYP3A5*3</i>	<i>Foward</i> 5'- CTTTAAAGAGCTCTTTTGTCTCTC – 3' <i>Reverse</i> 5'- CCAGGAAGCCAGACTTTGAT – 3'	200 pb	
<i>CYP3A5*6</i>	<i>Foward</i> 5'- CTGGGTTTCTTGCTGCATGT - 3' <i>Reverse</i> 5'- GCCCACATACTTATTGAGAG – 3'	237 pb	Lopes <i>et al.</i> , 2015
<i>CYP2E1</i>	<i>Foward</i> 5'- CCAGTCGAGTCTACATTGTCA – 3' <i>Reverse</i> 5'- TTCATTCTGTCTTCTAACTGG – 3'	413 pb	
<i>NAT2</i>	<i>Foward</i> 5'- TTAGTCACACGAGGAAATCAAA – 3' <i>Reverse</i> 5'- AAATGCTGACATTTTTATGGATGA – 3'	1093pb	Teixeira <i>et al.</i> , 2009

5. RESULTADOS

5.1. População do estudo

Após aceitarem a participação no estudo assinando o termo de compromisso livre e esclarecido, os pacientes ainda virgens de tratamento e indivíduos sadios iniciaram imediatamente a coleta das amostras. Os pacientes possuem idades entre 12 e 61 anos, em um grupo onde 60% são do sexo masculino e 40% do sexo feminino, 53% se declararam brancos, 27% pardos e 20% negros. A grande maioria não possui hábitos de etilismo e, quanto ao tabagismo, a maior frequência está entre ex-fumantes e não fumantes (Tabela 4.1)

Os IBs dos pacientes acompanhados variavam entre 3,5+ e 5,75+, onde todos os casos foram diagnosticados como hanseníase MB, um dos critérios de inclusão no estudo. Quatorze casos que nunca utilizaram o tratamento e somente 1 tratava-se de recidiva. A maioria recebeu a administração da PQT padrão e houve somente um caso de PQT/INF, dois de PQT/ALT, onde a PQT foi mudada durante o acompanhamento devido a intercorrências e um dos pacientes já iniciou o tratamento com PQT/ALT. Os pacientes encontram-se sob tratamento, em alta com orientação (fim da administração da PQT, porém ainda sob observação médica) ou tiveram alta. Os ex-tabagistas do estudo não especificaram o tempo que estão sem fumar (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Dados gerais dos pacientes

Paciente	Sexo	Cor	Tabagismo	Etilismo	Diagnóstico	Tratamento	PQT	Intercorrência	E. Adverso	Alta (IB)
1	M	Branco	não	não	5	Virgem	MB	não	não	1.75+
2	M	Pardo	ex	não	5	Virgem	MB	não	não	orientação (3.75+)
3	F	Branco	não	não	5.5+	virgem	MB	não	não	4.75+
4	F	Branco	não	não	5.75+	virgem	MB	não	não	4.75+
5	M	Branco	ex	sim	4+	Virgem	MB/ALT	pneumonia	A. Hemolítica	orientação
6	M	Pardo	não	não	4+	Virgem	MB	não	não	2.5+
7	F	Parda	não	não	5+	Virgem	MB/INF	não	não	Em andamento
8	M	Branco	ex	sim	5+	Virgem	MB	não	não	Em andamento
9	M	Negro	não	não	5,5	Virgem	MB	não	não	4.5+
10	M	Branco	ex	não	4,75	Virgem	MB/ALT	não	não	Em andamento
11	F	Negro	não	não	5+	Virgem	MB/ALT	S. dapsona	A. Hemolítica	Em andamento
12	M	Branco	não	não	5,25	Virgem	MB	não	não	Em andamento
13	F	Branco	não	não	5+	Virgem	MB	não	não	Em andamento
14	M	Negro	sim	não	3.5+	Virgem	MB	não	não	Em andamento
15	F	parda	-	-	5.5+	Recidiva	MB	Abandono	não	-

MB/ALT = Multibacilar alterativa; MB/INF = Multibacilar infantil; S. dapsona = Sensibilidade à dapsona; A. Hemolítica = Anemia Hemolítica

5.2. Dados domiciliares dos pacientes

A maioria dos pacientes desse estudo é da baixada fluminense ($n = 9$) e os demais residem em bairros da cidade do Rio de Janeiro ($n = 4$), região dos lagos ($n = 1$) e região metropolitana ($n = 1$). Os 15 indivíduos residem em casas de alvenaria e possuem saneamento básico. Quanto ao contato com a doença, 47% tiveram contato devido a algum contato próximo já ter contraído a enfermidade (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Dados domiciliares dos pacientes.

Paciente	Local	Saneamento	Contatos Intradomiciliares	Contato com a doença
1	Magé	Sim	4	não
2	S. J. Meriti	sim	4	não
3	S. J. Meriti	sim	3	não
4	Rocha Miranda, RJ	sim	6	Pai e irmã
5	Vista Algre, RJ	Sim	3	não
6	Nova Iguaçu	Sim	1	não
7	Nova Iguaçu	Sim	5	Mãe
8	Campo Grande, RJ	Sim	2	não
9	Nova Iguaçu	Sim	3	Cunhado
10	São Gonçalo	Sim	3	Pai e irmã
11	Japerí	Sim	5	Tia
12	Seropédica	Sim	3	Primo
13	Benfica, RJ	Sim	4	não
14	Nova Iguaçu	Sim	5	vizinho
15	Araruama	Sim	-	-

5.3. Viabilidade em amostras bucais e nasais

Durante o acompanhamento dos 13 pacientes (devido ao abandono do paciente 15 e do tratamento do paciente 14 em andamento) nos 5 meses iniciais de tratamento, foi feita por PCR em tempo real a mensuração da viabilidade através dos níveis de DNA e cDNA correspondentes ao gene 16S RNAr em amostras de raspado bucal. Tendo conhecimento da estabilidade da molécula de DNA, com o bacilo viável ou morto, a mesma foi utilizada como normalizadora para os níveis de RNA, molécula que possui maior instabilidade, encontrada sem degradação somente em bacilos viáveis. Portanto, em cada coleta (feita em cada dose mensal de rifampicina administrada no ambulatório), presume-se que os níveis de detecção de DNA continuarão constantes, enquanto os níveis de RNA gradualmente diminuirão ao longo do tratamento.

A variação nos gráficos pode ser explicada se considerarmos a baixa quantidade de amostra coletada (uma amostra nasal e bucal de cada paciente mensalmente), o método de coleta pouco invasivo e os hábitos de higiene dos pacientes, pois estes fatos podem alterar a qualidade e quantidade do material estudado. Não foi possível analisar os raspados bucais dos pacientes 9 e 13 devido a grande

quantidade de inibidores na região de coleta ou a ausência do bacilo nessa região.

Foi possível observar 3 casos distintos com a utilização da poliquimioterapia alternativa (Figura 5.1). O paciente 5 apresentou intolerância à dapsona logo na primeira dose e em seguida foi acometido pela pneumonia. Houve uma pausa de 3 meses na PQT para o tratamento da pneumonia e, após sua cura, o tratamento foi retomado com a utilização do tratamento alternativo. Aparentemente, apesar do grande intervalo de tempo, não houve progresso da doença, mesmo sem a administração da PQT. O paciente 10, antes de iniciar o tratamento, já havia sido diagnosticado com a intolerância à dapsona, portanto já iniciou seu tratamento com o uso da ofloxacina, substituta da dapsona na PQT alternativa. Os sinais do bacilo na cavidade bucal não tiveram muita mudança ao longo dos 5 meses de tratamento, com exceção do ponto da terceira dose da PQT. O paciente 11, após o início do tratamento apresentou um efeito adverso normalmente causado pela dapsona, a anemia hemolítica. Houve suspensão no tratamento devido à internação e seu estado delicado após o ocorrido. Os dados mostram que após o início do uso da PQT alternativa, a carga bacilar aparenta diminuir na região bucal.

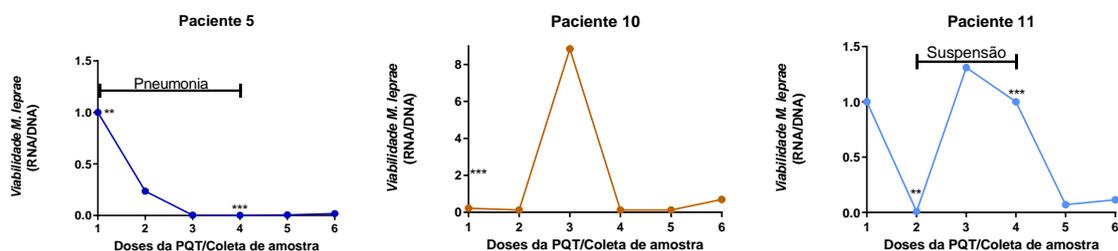


Figura 5.1. Análise em *fold change* de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado bucal de pacientes de sua primeira coleta (virgem de tratamento/primeira dose) até o quinto mês subsequente (5 meses após a primeira dose) que houveram mudanças no tratamento. Análise de amostras de pacientes multibacilares virgens de tratamento utilizando a razão do DNA e cDNA micobacteriano, determinando sua viabilidade. ** = Efeito adverso; * = Início de poliquimioterapia alternativa**

Em alguns casos, como os dos pacientes 2, 4, 6 e o já citado 5, os dados sugerem que a carga bacilar foi praticamente eliminada da região bucal concluindo dois meses de início do tratamento, mesmo com suspensão (Paciente 5) ou atraso (paciente 6, um dia de atraso), mostrando assim uma possível regressão da doença (figura 5.2).

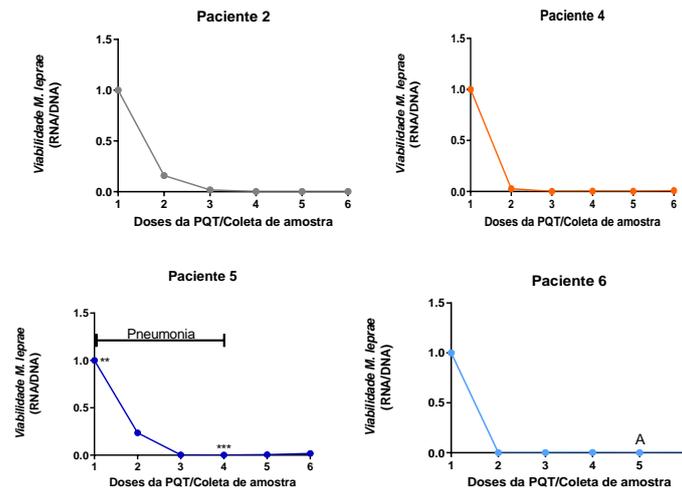


Figura 5.2. Análise em *fold change* de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado bucal pacientes com picos de viabilidade até a terceira dose do tratamento (dois meses desde a primeira coleta). Análise de amostras de pacientes multibacilares virgens de tratamento utilizando a razão do DNA e cDNA micobacteriano, determinando sua viabilidade. ** = Efeito adverso; *** = Início de poliquimioterapia alternativa; A = Atraso na administração da dose.

A grande maioria dos pacientes mostrou picos de viabilidade até a conclusão de 5 meses de tratamento (Figura 5.3). O paciente 1, mesmo com oscilações durante os meses, manteve uma carga bacilar até o ponto estudado. Os pacientes 3, 7, 11 e 12, apesar dos sinais abaixo da primeira coleta, ainda mostram pontos detectáveis. O paciente 7 atrasou a quinta dose em 14 dias. O paciente 10 manteve-se com estabilidade da carga bacilar durante o período de tempo, tendo uma queda na conclusão de dois meses de tratamento.

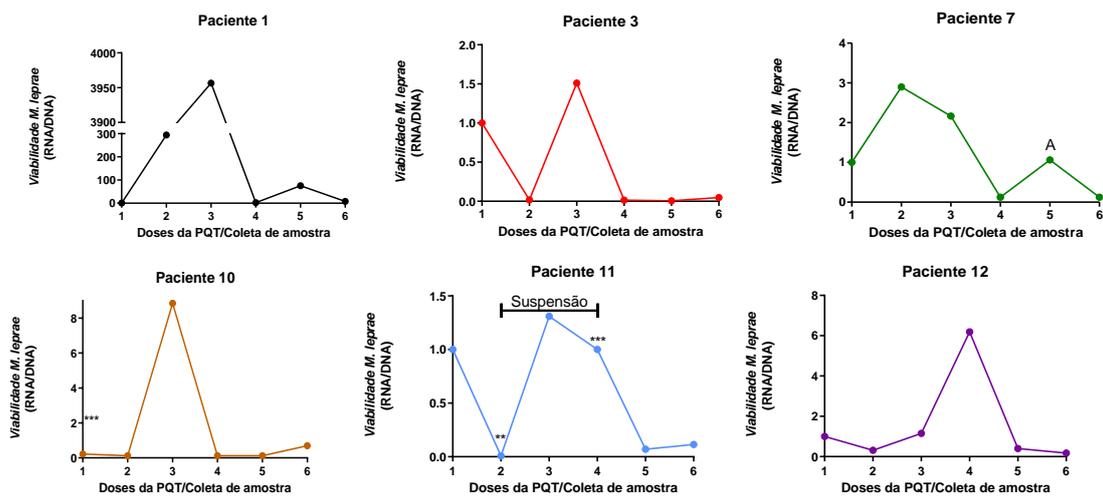


Figura 5.3. Análise em *fold change* de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado bucal pacientes com picos de viabilidade até a sexta dose do tratamento (cinco meses desde a primeira coleta). Análise de amostras de pacientes multibacilares virgens de tratamento utilizando a razão do DNA e cDNA micobacteriano, determinando sua viabilidade. ** = Efeito adverso; *** = Início de poliquimioterapia alternativa; A = Atraso na administração da dose.

A análise das amostras de raspado nasal mostraram dados interessantes sobre esta região. Era esperado que na via aérea superior o sinal do bacilo fosse maior, uma vez que já é bastante embasada na literatura que esta é a principal via de entrada do bacilo no organismo. Contudo, a coleta de amostras nessa via também pode ser prejudicada devido à quantidade de inibidores encontrados na mucosa nasal.

Os casos distintos na utilização da PQT alternativa, citados no tópico de amostras bucais, mostram também sinais de queda da carga bacilar nas amostras nasais (Figura 5.4).

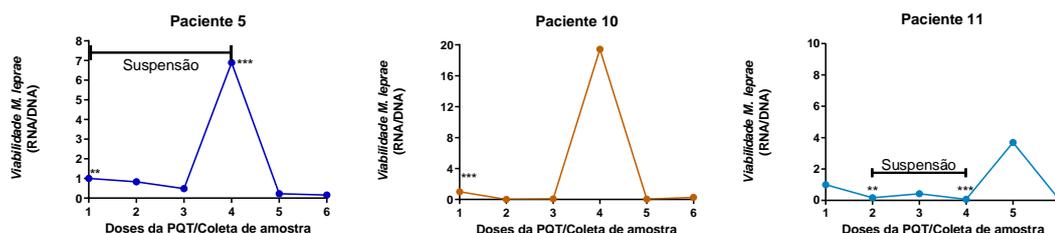


Figura 5.4. Análise em *fold change* de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado nasal de pacientes de sua primeira coleta (virgem de tratamento/primeira dose) até o quinto mês subsequente (5 meses após a primeira dose) que houveram mudanças no tratamento. Análise de amostras de pacientes multibacilares virgens de tratamento utilizando a razão do DNA e cDNA micobacteriano, determinando sua viabilidade. ** = Efeito adverso; *** = Início de poliquimioterapia alternativa

Em contraste aos resultados bucais no tempo de dois meses desde a primeira coleta, apenas os pacientes 2 e 4 não mostraram sinais de viabilidade após concluírem 3 meses desde a primeira coleta na região nasal (Figura 5.5).

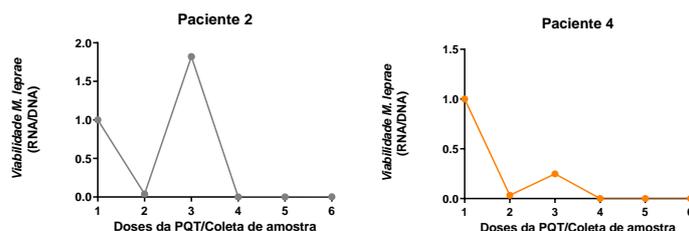


Figura 5.5. Análise em *fold change* de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado nasal de pacientes com picos de viabilidade até a quarta dose do tratamento (três meses desde a primeira coleta). Análise de amostras de pacientes multibacilares virgens de tratamento utilizando a razão do DNA e cDNA micobacteriano, determinando sua viabilidade.

Os pacientes 8, 9, 11 e 12 tiveram diminuições em suas cargas bacilares apontadas somente na coleta feita no dia da administração da sexta dose, possuindo picos de viabilidade até a quinta coleta (Figura 5.6).

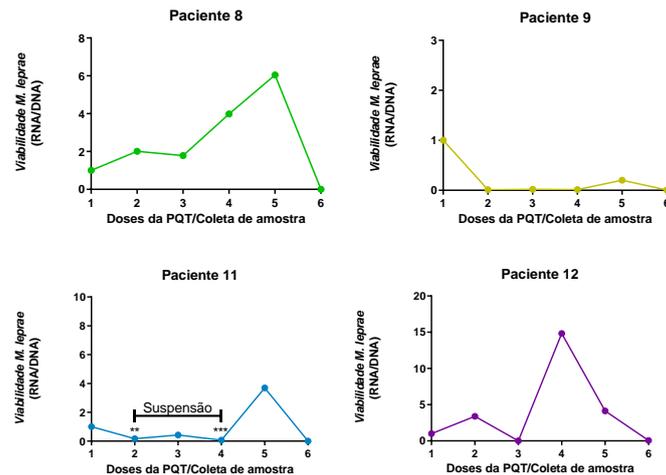


Figura 5.6. Análise em *fold change* de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado nasal de pacientes com picos de viabilidade até a quinta dose do tratamento (quatro meses desde a primeira coleta). Análise de amostras de pacientes multibacilares virgens de tratamento utilizando a razão do DNA e cDNA micobacteriano, determinando sua viabilidade. ** = Efeito adverso; *** = Início de poliquimioterapia alternativa.

Como esperado, os sinais de detecção mais persistentes durante o tratamento são encontrados na região nasal, onde 7 pacientes (1, 3, 5, 6, 7, 10 e 13) ainda possuem picos de viabilidade variados na sexta coleta de material, em outras palavras, concluindo 5 meses desde a primeira coleta, independente do uso de tratamento alternativo.

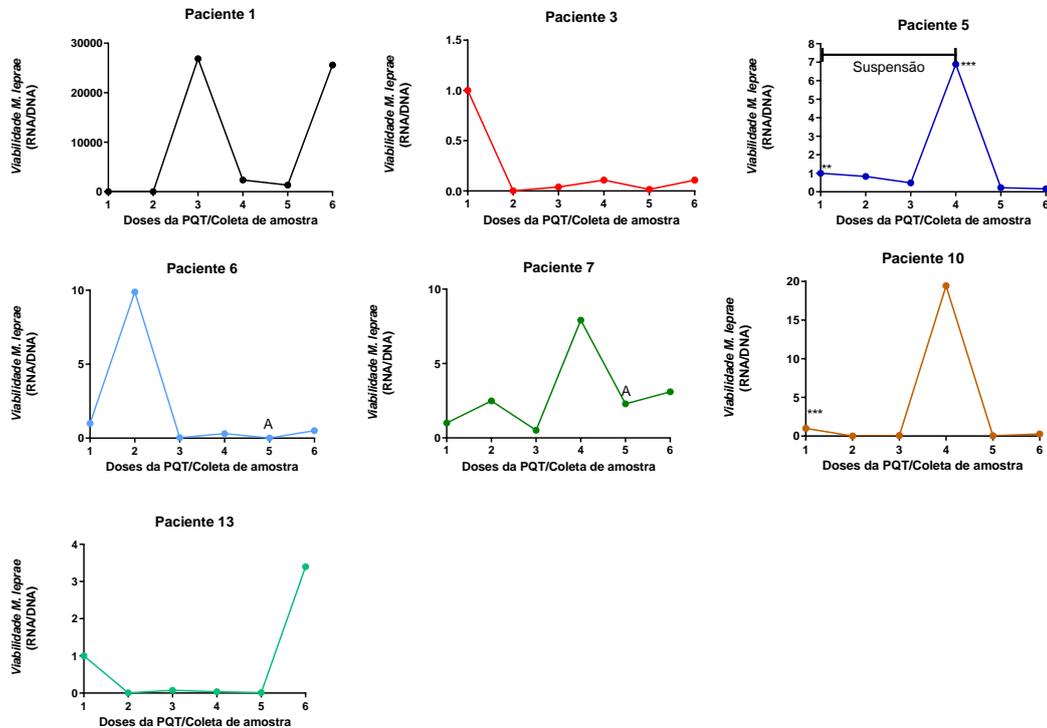


Figura 5.7. Análise em *fold change* de níveis de 16s RNAr em amostras de raspado nasal pacientes com picos de viabilidade até a sexta dose do tratamento (cinco meses desde a primeira coleta). Análise de amostras de pacientes multibacilares virgens de tratamento utilizando a razão do DNA e cDNA micobacteriano, determinando sua viabilidade. ** = Efeito adverso; *** = Início de poliquimioterapia alternativa; A = Atraso na administração da dose.

5.4. PCR de detecção de *M. leprae* em indivíduos sadios

De modo a iniciar uma análise sobre a especificidade e sensibilidade do método, amostras de raspados bucais e nasais foram coletadas de 10 voluntários do Pavilhão Hanseníase (IOC – Fiocruz, RJ) que rotineiramente manipulam amostras de *M. leprae* viável e não viável, e 10 indivíduos do Pavilhão Leônidas Deane (IOC – Fiocruz, RJ), onde não há manipulação do bacilo em questão. A detecção de DNA foi realizada utilizando o gene 16S RNAr no sistema *Taqman*, onde a sonda adicionada emite sinal somente em caso de amplificação do gene de *M. leprae*. Após os PCRs, foi feita uma média dos CTs encontrados e, como esperado, não é possível detectar sinal significativo de DNA de *M. leprae* em raspados de indivíduos sadios de área endêmica (Rio de Janeiro, RJ). Não foi encontrada diferença estatística entre os dois grupos (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. PCR de detecção do bacilo em indivíduos sadios

Voluntários sadios	Pav. Hanseníase		Pav. Leônidas Deane	
	Nasal (CT)	Bucal (CT)	Nasal (CT)	Bucal (CT)
1	37,43	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	37,98	-	-
4	39,69	-	-	-
5	-	-	-	-
6	37,12	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	38,5	-
10	-	-	38,5	-

5.5. Resistência às drogas

Da coorte de pacientes que apresentaram viabilidade após 6 meses de acompanhamento, selecionamos os pacientes 3, 5 e 7. Estes pacientes foram escolhidos por suas distintas características na viabilidade. O paciente 3 responde razoavelmente ao tratamento, tendo redução da viabilidade, mas o sinal continua visível. O paciente 5 também responde ao tratamento de forma razoável, porém a sua intolerância à dapsona pode omitir outras características que podem tornar o bacilo viável, como a resistência ao medicamento. Por fim, o paciente 7 não responde ao tratamento, possibilitando a existência de bacilos resistentes. Foram, então, analisadas as amostras de DNA total oriundas das coletas de raspados nasais do primeiro ao sexto mês desses pacientes, para a análise de resistência do *M. leprae* às drogas que compõe a PQT-OMS.

As amostras contendo *M. leprae* presentes nos três pacientes amplificaram nas PCR contendo como genes os alvos das drogas da PQT (*folP1*, *gyrA* e *rpoB*). Contudo, para reduzir o número de amostras analisadas e para reduzir o gasto com amostras possivelmente degradadas ou com muito inibidores, as 18 coletas foram amplificadas para o alvo da rifampicina (*rpoB*), bactericida do tratamento. As coletas que apresentaram amplificação neste gene foram posteriormente amplificadas para os alvos da dapsona e ofloxacina e submetidas ao sequenciamento.

5.5.1. Géis da análise de resistência à poliquimioterapia

As 18 amostras de raspados nasais dos pacientes que foram submetidas a uma PCR utilizando o gene *rpoB*, que é codificado na proteína alvo da rifampicina, obteve 7 ampliações. As amostras dos meses 1 e 5 de tratamento do paciente 3 (poços 1 e 5), mês 2 do paciente 5 (poço 9), meses 1, 3, 4 e 5 do paciente 7 (poços 15, 17, 18 e 19) foram submetidos ao sequenciamento (Figura 5.6.).

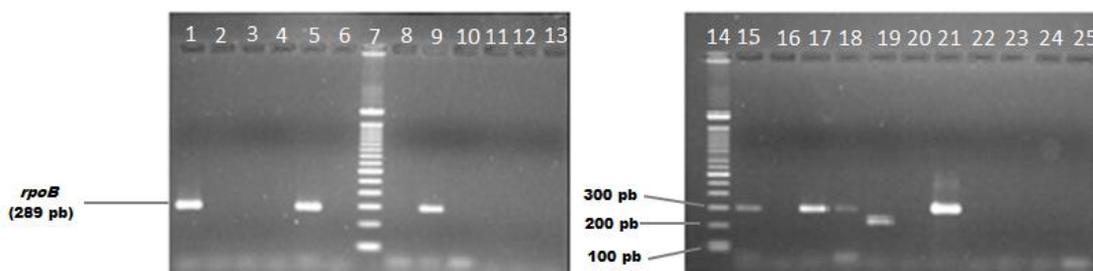


Figura 5.4. Gel dos produtos de PCR do gene *rpoB*. Gel de agarose a 2% para observação do produto de PCR do gene *rpoB*. Poços de 1-6 = Paciente 3; poços de 8-13 = Paciente 5; poços de 15-20 = Paciente 7; poços 7 e 14 = Padrão molecular (100 pb); poço 21 = controle positivo; poços de 22-25 = Controle negativo.

Das 7 amostras que amplificaram para *rpoB*, 6 apresentaram amplificação. As amostras dos meses 1 e 5 de tratamento do paciente 3 (poços 1 e 2), mês 2 do paciente 5 (poço 3), meses 1, 3 e 4 do paciente 7 (poços 4, 5 e 6) foram submetidas ao sequenciamento (Figura 5.5).

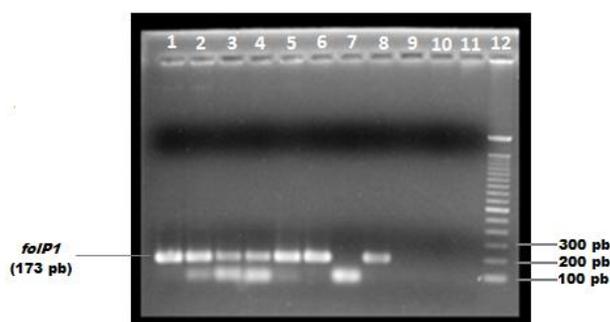


Figura 5.5. Gel dos produtos de PCR do gene *folP1*. Gel de agarose a 2% para observação do produto de PCR do gene *folP1*. Poços 1 e 2, Paciente 3; poço 3, Paciente 5; poços 4-7, Paciente 7; poço 8, controle positivo; poços 9-11, controle negativo; poço 12, padrão de peso molecular (100 pb).

Das 7 amostras amplificadas para *rpoB*, apenas 6 amplificaram para o gene da proteína alvo da ofloxacina, o *gyrA*. As amostras dos meses 1 e 5 de tratamento do paciente 3 (poços 2 e 3), mês 2 do paciente 5 (poço 4) e meses 3 e 4 do paciente 7 (poços 5 e 6) foram sequenciados em busca da mutação gênica que confere o fenótipo de resistência à droga (Figura 5.6.). O PCR da amostra do mês 5 do paciente 3 foi repetida e uma banda do tamanho esperado foi observada (resultado não mostrado).

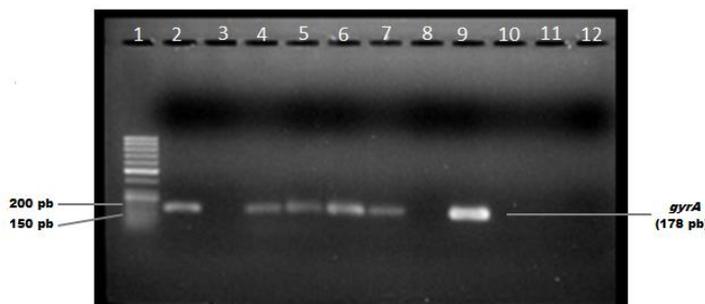


Figura 5.6. Gel dos produtos de PCR do gene *gyrA*. Gel de agarose a 2% para observação do produto de PCR do gene *folP1*. Poço 1 = Padrão molecular (50 pb); Poços 2 e 3 = Paciente 3; poço 4 = Paciente 5; poços de 5-8 = Paciente 7; poço 9 = Controle positivo; poços de 10-12 = Controle negativo.

5.5.2. Análise de resistência à poliquimioterapia por sequenciamento de DNA

A área em destaque (amarelo) é a região mostrada nas imagens do artigo de Maeda e seus colaboradores⁽⁵⁰⁾ e, em destaque vermelho, são as posições que podem sofrer mutação. A posição 53 pode sofrer duas mutações (157 A > G e 158 C > T) e a posição 55 pode sofrer uma mutação (164 C > T). As amostras submetidas à análise de sequenciamento tendo como o gene alvo *folP1* não apresentam os possíveis SNPs que conferem resistência à dapsona em nenhuma das amostras de coleta mensal amplificadas na PCR (Figra 5.7.). Os dados sugerem que a viabilidade não está ligada à dapsona, apesar de ser utilizada desde o regime monoterápico da doença.

Species/Abbrv	Group Name	*****
1. Referencia folP1		TCGACC GGG CCCCGGT
2. Paciente 3		TCGACC GGG CCCCGGT
3. Paciente 5		TCGACC GGG CCCCGGT
4. Paciente 7		TCGACC GGG CCCCGGT
5. Positivo		TCGACC GGG CCCCGGT

Figura 5.7. Análise de investigação de sequenciamento do gene *folP1*. A área amarela determina a uma região para o alinhamento dos nucleotídeos e em destaque (vermelho) a localização das regiões onde os SNPs que conferem resistência podem ser encontrados. Os meses correspondem às coletas de raspado nasal feitas em cada dose assistida no ambulatório.

A ofloxacina, utilizada como droga alternativa em casos de sensibilidade à dapsona, também possui casos de resistência medicamentosa. As mutações em *gyrA* podem ser encontradas nas posições 89 (265 G > T) e 91 (272 C > T) Contudo, o gene *gyrA* não apresenta os SNPs que configuram a resistência à ofloxacina nas amostras que amplificaram na PCR. Logo, a viabilidade do bacilo não está relacionada à resistência neste gene (Figura 5.8.).

Species/Abbrv	Group Name	*****
1. Referencia <i>gyrA</i>		CCGCACGGCGACGCA
2. Paciente 3		CCGCACGGCGACGCA
3. Paciente 5		CCGCACGGCGACGCA
4. Paciente 7		CCGCACGGCGACGCA
5. Positivo		CCGCACGGCGACGCA

Figura 5.8. Análise de investigação de sequenciamento do gene *gyrA*. A área amarela determina a uma região para o alinhamento dos nucleotídeos e em destaque (vermelho) a localização das regiões onde os SNPs que conferem resistência podem ser encontrados. Os meses correspondem às coletas de raspado nasal feitas em cada dose assistida.

As mutações de *rpoB* podem ser encontradas nas posições 441 (1312 G > A), 451 (1351 C > T), 456 (1367 C > T ou C > G) e 458 (1373 T > C). Na rifampicina, bactericida da PQT, também não foi observada resistência no sequenciamento. A persistência da viabilidade do *M. leprae* nos pacientes após 6 meses de acompanhamento aparentemente não tem relação com mecanismos de resistência conhecidos do bacilo às drogas da poliquimioterapia. Logo, para elucidar essa questão, foi realizada uma análise farmacogenética.

Species/Abbrv	Group Name	*****
1. Referencia <i>rpoB</i>		TTCATGGATCAGAACAACCCCTCTGTGCGGGCCTGACCACAAAGCGCCGGCTGTCGGGGCTG
2. Paciente 3		TTCATGGATCAGAACAACCCCTCTGTGCGGGCCTGACCACAAAGCGCCGGCTGTCGGGGCTG
3. Paciente 7		TTCATGGATCAGAACAACCCCTCTGTGCGGGCCTGACCACAAAGCGCCGGCTGTCGGGGCTG
4. Positivo		TTCATGGATCAGAACAACCCCTCTGTGCGGGCCTGACCACAAAGCGCCGGCTGTCGGGGCTG

Figura 5.9. Análise de investigação de sequenciamento do gene *rpoB*. A área amarela determina a uma região para o alinhamento dos nucleotídeos e em destaque (vermelho) a localização das regiões onde os SNPs que conferem resistência podem ser encontrados. Os meses correspondem às coletas de raspado nasal feitas em cada dose assistida.

5.6. Análises farmacogenéticas

5.6.1. Análise dos alelos *CYP3A5*3* e *CYP3A5*6* através da digestão por *DdeI*

As amostras de sangue dos pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 11 coletadas no estudo foram submetidas a reações de PCR com primers referentes aos genes da família CYP450 e a enzima NAT2. As amostras de sangue selecionadas são de pacientes que foram diagnosticados com sensibilidade à dapsona (pacientes 5 e 11) ou que tiveram persistência do bacilo durante os 6 meses (pacientes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9). Os genes *NAT2* (não mostrado na figura), *CYP3E4*1B*, *CYP3A5*3*, *CYP3A5*6* e *CYP2E1* foram amplificados com êxito (figura 5.6), e os fragmentos obtidos foram analisados por digestão com a enzima *DdeI* (*CYP3A5*3* e *CYP3A5*6*) e *RsaI* (*CYP2E1*) ou sequenciados (*CYP3E4* e *NAT2*) (Figura 5.10)

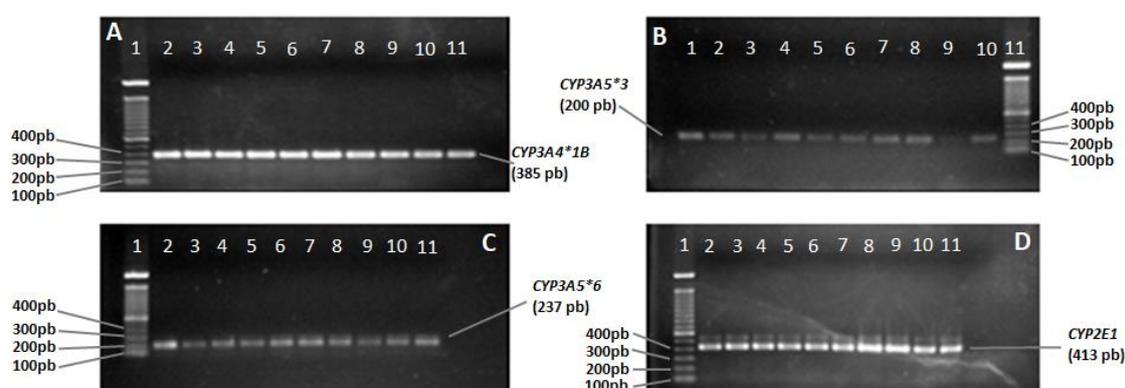


Figura 5.10. Amplificação dos genes da família do CYP450. Gel de agarose a 2% para observação do produto de PCR de *CYP3E4*1B* (A), *CYP3A5*3* (B), *CYP3A5*6* (C) e *CYP2E1* (D). Paciente (Gel/poço): 1 (A2, B1, C2, D2); 2 (A3, B2, C3 e D3); 3 (A4, B3, C4 e D4); 4 (A5, B4, C5 e D5), 5 (A6, B5, C6 e D6); 6 (A7, B6, C7 e D7); 7 (A8, B7, C8 e D8); 8 (A9, B8, C9 e D9); 9 (A10 B9, C10 e D10); 11 (A11, B10, C11 e D11). Padrão de peso molecular (Gel/poço): 100 pb (A1, B11, C1 e D1).

No ensaio de digestão dos alelos de CYP3A5 os produtos de PCR do alelo *CYP3A5*3* resultaram em 2 indivíduos **1/*1* (fragmentos de 129 pb e 71 pb), 7 indivíduos **3/*3* (fragmentos de 107 pb, 74 pb e 22 pb) e 1 indivíduo **1/*3* (fragmentos de 129 pb, 107 pb, 71 pb e 22 pb), ou seja, foi possível identificar indivíduos homozigotos selvagens (**1/*1*), homozigotos mutantes (**3/*3*) e heterozigoto (**1/*3*), respectivamente (Figura 5.11). O fragmento de 22 pb não pode ser observado devido ao seu tamanho e intensidade das bandas. O genótipo **1/*1* (pacientes 9 e 11) codifica uma enzima funcional, enquanto o genótipo **1/*3* (paciente 7) apresenta uma baixa atividade e o genótipo **3/*3* (pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8) uma enzima não funcional.

Na digestão para conferir o alelo *CYP3A5*6*, 8 indivíduos apresentaram o genótipo **1/*1* (fragmentos de 103 pb, 74 pb, 35 pb e 25 pb) e 2 indivíduos o genótipo **1/*6* (fragmentos de 128 pb, 103 pb, 74 pb, 35 pb e 25 pb), que configuram os genótipos homozigoto selvagem e heterozigoto, respectivamente. Os fragmentos de 35 pb e 25 pb não podem ser vistos devido ao seu tamanho e intensidade das bandas. O genótipo **1/*1* (pacientes 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 e 11) codifica uma enzima funcional e o genótipo **1/*6* apresenta baixa atividade enzimática. O genótipo **6/*6*, relacionada à ausência da enzima segundo a literatura⁽⁷⁹⁾, não foi encontrada no estudo.

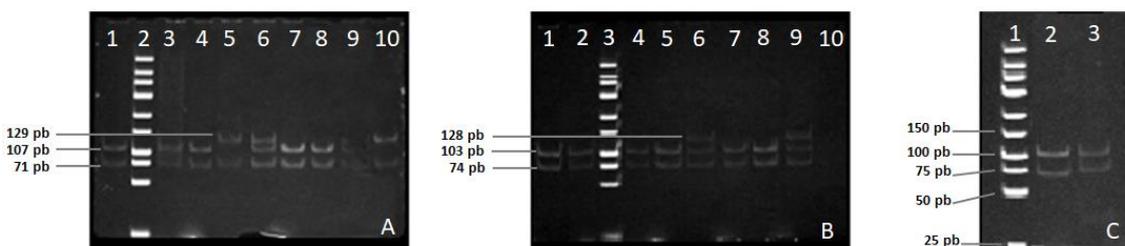


Figura 5.11. Digestão dos produtos de PCR dos alelos de *CYP3A5*. Géis de poliacrilamida do produto de PCR digerido para a análise dos alelos *CYP3A5*3* e *CYP3A5*6*. Pacientes (gel/poço): paciente 1 (A1 e B1); paciente 2 (A3 e B2); paciente 3 (A4 e B4); paciente 4 (A5 e B5); paciente 5 (A6 e B6); paciente 6 (A7 e B7); paciente 7 (A8 e B8); paciente 8 (A9 e B9); paciente 9 (A10 e B10); paciente 11 (C2 e C3); Padrão de peso molecular (gel/poço) 25 pb (A2, B3 e C1).

5.6.2. Análise dos alelos de *CYP2E1* através da digestão por *RsaI*

O *CYP2E1* possui relação com o metabolismo de dapsona e produção de substâncias tóxicas em seu genótipo **1A/*1A*, segundo a literatura.^(62, 80, 81, 82) O genótipo homozigoto selvagem encontrado é apresentado no gel com uma banda de 352 pb após a digestão. Todos os 10 pacientes apresentaram genótipo selvagem homozigoto (Figura 5.12). O genótipo **1A/*1A* é considerado um hidroxilador rápido, ou seja, a atividade enzimática é maior e, como consequência, a produção de metabólitos tóxicos também pode aumentar.

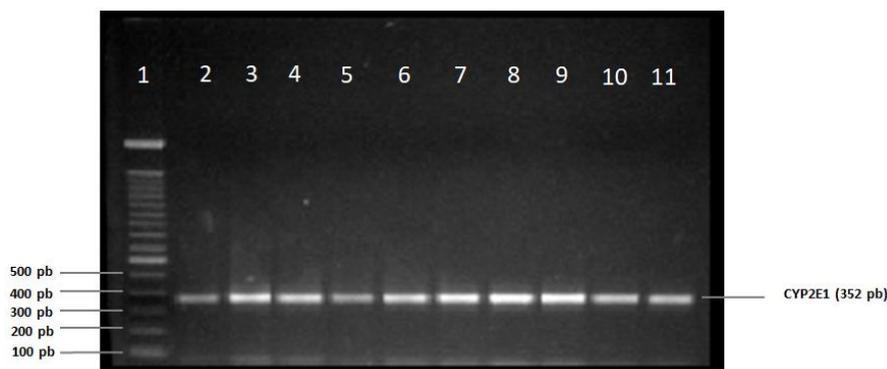


Figura 5.12. Digestão dos produtos de PCR dos alelos de CYP2E1. Gel de agarose de 2% do produto de PCR digerido para análise dos alelos de *CYP2E1*. Pacientes (poço): paciente 1 (2); paciente 2 (3); paciente 3 (4); paciente 4 (5); paciente 5 (6); paciente 6 (7); paciente 7 (8); paciente 8 (9); paciente 9 (10); paciente 11 (11). Padrão de peso molecular (poço) 100 pb (1).

5.6.3 Análise dos alelos de CYP3A4 através do sequenciamento

A enzima CYP3A4 já foi apontada como uma das enzimas que metabolizam dapsona. Sua atividade, portanto, também pode estar relacionada ao surgimento de reações adversas, de acordo com o genótipo encontrado. Neste estudo, o sequenciamento dos produtos de PCR verificando a presença ou ausência do alelo **1B* apontaram 7 genótipos homozigotos selvagens (AA), 1 genótipo heterozigoto (AG) e 2 genótipos homozigotos mutantes (GG) (Tabela 5.5). O genótipo homozigoto selvagem tem como característica a atividade normal da enzima, enquanto o homozigoto mutante está relacionado à diminuição da atividade enzimática. ⁽⁷⁶⁾

5.6.4. Análise dos alelos de NAT2 através do sequenciamento

Amostras de sangue foram coletadas dos pacientes para análise do perfil de acetilação de N-acetiltransferase2 (NAT2), a fim de definir se tais perfis poderiam interferir no tratamento. É conhecido que o perfil de acetilação lento aumenta as chances de hepatotoxicidade e efeitos adversos. Dos pacientes analisados, 3 apresentaram perfil rápido (pacientes 1, 6 e 8), 5 o perfil intermediário (pacientes 2, 4, 5, 9 e 11) e 2 o perfil lento (pacientes 3 e 7) (Tabela 5.4). Segundo Lopes e seus colaboradores⁽⁸⁴⁾ a presença de somente um alelo lento no genótipo de NAT2 é o suficiente para aumentar as chances de efeito adverso em 2,4 vezes durante o tratamento. Foi visto nos dados do prontuário que os pacientes 5 e 11 tiveram efeitos

adversos durante o acompanhamento. Ambos possuem perfil acetilador intermediário, ou seja, um alelo lento e outro rápido.

Tabela 5.4. Perfis de acetilação dos pacientes.

Paciente	Sexo	Cor	Alelos	Perfil
1	M	Branco	*12C/*12C	Rápido
2	M	Pardo	*4/*5U	Intermediário
3	F	Branco	*5J/*5J	Lento
4	F	Branco	*4/*5B	Intermediário
5	M	Branco	*4/*5B	Intermediário
6	M	Pardo	*12C/*12C	Rápido
7	M	Branco	*6H/*6A	Lento
8	F	Pardo	*12C/*12C	Rápido
9	M	Negro	*4/*5U	Intermediário
11	F	Negro	*4/*5R	Intermediário

6. DISCUSSÃO

Os dados de Martinez ⁽¹⁰⁰⁾ mostraram a capacidade da detecção da viabilidade de *M. leprae* em espécimes clínicas (esfregaços de pele e biopsias de pele). Esta técnica não tem sido apenas aplicada em amostras de biopsia de pele, mas também em outros tipos de espécimes como esfregaço de pele, nervos, urina, swabs nasal e bucal, sangue e lesões oculares ⁽⁹⁹⁾. É possível detectar o bacilo em amostras de raspados bucais por qPCR, como visto em Rosa *et al.* 2013 ^(94, 105) e nasais por PCR, como visto em Martinez e colaboradores ⁽¹⁰⁰⁾. Embora não tenham sido testadas em amostras emparelhadas de pacientes antes, durante e depois do tratamento, a técnica desenvolvida possibilita o acompanhamento da eficácia do tratamento de maneira sensível e específica. Este projeto tem como um dos objetivos o preenchimento desta lacuna que foi citada.

A decisão para coleta destes tipos de amostra foi feita devido à detecção de bacilos nas vias aéreas superiores e por se tratar de uma forma de coleta menos invasiva. Em nossos dados envolvendo 13 pacientes, a utilização do gene 16S RNAr como alvo em amostras de raspados bucais e nasais mostrou que níveis de DNA e cDNA são detectáveis até a 6ª coleta de amostra (cinco meses de tratamento concluído). Uma grande dificuldade encontrada no presente estudo reside na sua coleta, a qual extrai uma

quantidade de material muito baixa por ser pouquíssimo invasiva e o material possuir muitos resíduos, dificultando a análise mais fina do estudo. Contudo, a técnica escolhida para análise de viabilidade do bacilo tem como limite de detecção de 100 fg, podendo detectar de 30 a 300 bacilos. ⁽¹⁰⁰⁾

Entre os pacientes que aderiram ao projeto, dois tiveram anemia hemolítica (Pacientes 5 e 11), devido a sensibilidade a dapsona. O paciente 5, que é hipertenso e possui cálculo renal, demonstrou a sensibilidade e reação reversa na primeira dose da PQT/MB e em seguida teve pneumonia. O paciente seguiu o tratamento da pneumonia, paralisando a PQT por 3 meses e meio, acompanhado pelos médicos do Ambulatório Souza Araújo (ASA - Fiocruz), porém a coleta de amostras não foi paralisada. Após o diagnóstico da sensibilidade a dapsona, foi iniciada PQT/ALT, onde a dapsona foi substituída por ofloxacina, seguindo a coleta, dessa vez com a PQT alternativa. Observamos que a interrupção do tratamento foi deletéria para a negatificação do paciente, que permaneceu positivo para o RNA do bacilo mesmo após 3 meses de tratamento alternativo.

Alguns pacientes cometeram descontinuação do tratamento ou erros durante o acompanhamento. Foram registrados atrasos no tratamento de 1 até 14 dias após a data marcada para a dose seguinte, ou seja, os pacientes não seguiram a administração da PQT neste espaço de tempo. O Paciente 15, recidiva e com quadro lepromatoso, abandonou o tratamento após a terceira dose da PQT ainda possuindo bacilos viáveis na via aérea superior (dados não mostrados). Não há registros de efeito adverso em seu prontuário, uma das causas que poderiam levar ao abandono do tratamento. O que possivelmente prejudicou seu tratamento foram as questões socioeconômicas do paciente e seu deslocamento para o tratamento, pois reside na cidade de Araruama, região dos lagos, e o ambulatório encontra-se no bairro de Mangueiros, na cidade do Rio de Janeiro.

Os nossos dados mostram que mesmo num pequeno grupo de pacientes, existe a presença de vários elementos que podem prejudicar o tratamento, tais como abandono, descaso, etilismo, tabagismo, etc. A questão econômica também pode interferir, pois o deslocamento do indivíduo até o ambulatório gera um custo e, dependendo da distância percorrida, pode se tornar um fator que desencoraja ou causa abandono do tratamento. No entanto, o tratamento poliquimioterápico se mostra eficaz mesmo sendo paralisado em casos de enfermidades como pneumonia ou efeitos adversos no paciente. Todos os

casos abordados nesse trabalho são de pacientes lepromatosos virgens de tratamento ou recidiva. Apesar do tratamento para forma LL durar 12 meses, tem sido visto até o momento que parte dos casos monitorados neste trabalho tem a curva de viabilidade do bacilo drasticamente reduzida entre a terceira e quarta dose de rifampicina.

A queda de viabilidade nasal e bucal significa que o paciente pode estar sendo curado da doença, porém um dado importante desta análise é a diminuição do número de bacilos nas vias aéreas superiores, diminuindo a disseminação do bacilo. Se confirmado em uma coorte maior de pacientes, esse achado sugere que a faixa de tempo para administração da PQT pode ser ajustada, reduzindo-se a quantidade de drogas a serem administradas, tendo como consequência a redução de efeitos adversos ao tratamento, maior adesão e barateamento.

As análises das mutações mais estudadas dos genes que codificam as proteínas alvo das drogas que compõem a PQT mostram que na coorte recrutada para o presente estudo não foi encontrada nenhuma amostra de *M. leprae* resistente, demonstrando que essas flutuações de viabilidade ao longo do tratamento são comuns entre as cepas sensíveis. No entanto não é possível descartar a presença de algum outro mecanismo de resistência, como por exemplo, as bombas de efluxo ⁽¹⁰⁶⁾ vistas em *Mycobacterium tuberculosis*, onde proteínas transmembrana bombeiam ativamente xenobiontes para o lado externo da parede. O *M. leprae* possui alguns genes homólogos às bombas de *M. tuberculosis*, no entanto esse tipo de estudo de associação ainda não foi realizado.

Lopes⁽⁸⁴⁾ e seus colaboradores, com seu extenso estudo sobre as associações dos genótipos de NAT2 e de CYP na chance de ocorrência de efeitos adversos, mostrou que existem grupos mais suscetíveis a efeitos adversos dependendo da sua relação de genótipos de NAT2 e CYP. A análise dos dados tendo como objetivo compreender a relação entre o perfil metabólico e a viabilidade durante o tratamento da hanseníase multibacilar não foi possível por alguns fatores. O número de amostras deste estudo é pequeno, não gerando um dado estatístico relevante, mesmo assim, puderam ser vistos alguns episódios relacionados à viabilidade do bacilo e efeitos adversos. É conhecido que o perfil metabólico de um indivíduo depende de muitos mecanismos encontrados no organismo, sejam transportadores, acetiladores, hidroxiladores, entre outros. Logo, não podemos apontar que somente esses alvos do estudo geraram o resultado visto nos experimentos. É visto na literatura que alelos lentos de NAT2 aumentam as chances de efeitos adversos, mesmo com a presença de somente um alelo lento ^(67, 84). Os perfis de

acetilação rápida e intermediária em associação com CYPs possuem respostas variáveis quando associados com CYPs diferentes. Os acetiladores lentos geralmente estão presentes nas respostas ruins ao tratamento e relacionados aos CYPs de perfis intermediários ou rápidos. Este dado é coerente, uma vez que acetiladores lentos podem causar falha terapêutica, podendo ter como consequência efeitos adversos. Contudo, não é possível determinar que esses perfis tenham relação com a viabilidade do bacilo no organismo dos indivíduos, pois essa questão abrange um contexto não só farmacogenético, mas também imunológico, ambiental, entre outros.

É visto que outras enfermidades, tabagismo e etilismo não influenciaram no resultado da coorte deste estudo. É visto em estudos casos de contatos intradomiciliares onde o paciente possui um parente próximo ou vizinho que já contraiu a doença. Como é de conhecimento da doença, o bacilo possui alta infectividade, mas não necessariamente a doença é iniciada naquele instante, podendo surgir anos após a infecção. Outra hipótese que talvez explique a viabilidade do bacilo em 6 meses de acompanhamento é a situação epidemiológica do estado do Rio de Janeiro. A maioria dos pacientes são de regiões com alta endemicidade, ou seja, existe a possibilidade de que os pacientes de alguma forma possam estar entrando em contato com o local ou grupo em que se infectaram, sendo reinfetados, mantendo a carga bacilar no organismo. Isso possivelmente explicaria o motivo pelo qual o bacilo é visto viável e sensível ao tratamento mesmo após 6 meses de acompanhamento.

As coletas de amostras de membros do Pavilhão Hanseníase e no Pavilhão Leônidas Deane foram feitas com o intuito de determinar o grau de contato necessário para a possível detecção do bacilo nas pessoas que o estudam. Como esperado, não foi possível detectá-lo de forma significativa. As pessoas que tiveram ou tem maior contato com o bacilo apresentaram o mesmo nível de detecção residual observado em voluntários de outros laboratórios, que não manipulam o patógeno rotineiramente.

É inegável a eficácia da poliquimioterapia da hanseníase. Entretanto, vários fatores podem interferir o tratamento. Dos mais frequentes, temos as cepas resistentes aos medicamentos, falhas terapêuticas, negligência ao tratamento pelo paciente, negligência ou falta de treinamento adequado para funcionários do sistema de saúde público, entre outros fatores. Neste estudo, foi visto que a PQT é eficaz, mas requer tempo para ser efetiva, em alguns casos (tabela 5.1) mais do que os 12 meses

determinados, precisando de orientação após o tratamento. A rifampicina, bactericida da PQT, mostrou sua eficácia descrita na literatura. Contudo, ela não possui um efeito imediato, tendo respostas variáveis de acordo com o paciente. Por este motivo, ainda podia ser vista a viabilidade após a 6ª coleta de material, o que corrobora com o tempo de 12 meses de tratamento. Contudo, alguns gráficos sugerem a possibilidade de tratamento personalizado.

O tratamento personalizado para a hanseníase e o seu melhor rendimento, a fim de diminuir falhas terapêuticas e efeitos adversos é um objetivo louvável, porém de difícil alcance. O melhor entendimento de um estudo populacional da correlação de NAT2 e CYP ,a viabilidade do bacilo, entre outros fatores que contribuem para a metabolização das drogas pode ser um passo para amenizar os efeitos negativos do tratamento. Um projeto de maior escala baseado neste projeto possivelmente auxiliaria na compreensão desse tema.

7. Perspectivas

Este estudo mostra que em amostras emparelhadas por 6 meses de acompanhamento dos pacientes, a viabilidade do bacilo ainda é observada. Logo, o longo tempo do esquema PQT/MB aparentemente está correto.

A cada dia os estudos de resistência medicamentosa têm crescido. O estudo mais amplo de mecanismos recentes, como bombas de efluxo, deve ser levado em consideração na análise de resistência em amostras de pacientes para melhor entendimento da persistência da viabilidade observada ao longo do tratamento.

Os dados de PCR de indivíduos sadios não apresentaram grande diferença entre quem trabalha ou não com o bacilo. Entretanto, uma melhor análise de risco de contaminação no trabalho deve ser considerada em projetos futuros.

Além da correlação entre o perfil metabólico do paciente e efeitos adversos observados, aparentemente a viabilidade do bacilo parece ter uma relação com o genótipo de NAT2 relacionado à acetilação lenta de fármacos, o que contradiz alguns dados da literatura. Dessa forma, um estudo com uma coorte maior de pacientes é necessária para confirmarmos esse achado.

8. Conclusões

Este estudo mostra que em amostras emparelhadas por 6 meses de acompanhamento dos pacientes, a viabilidade do bacilo é mantida em alguns casos por até seis meses. Logo, apesar de um pronunciado efeito bactericida, a efetividade da rifampicina observada em nosso estudo não corresponde ao que é citado na literatura.

Cepas resistentes são uma ameaça cada vez mais frequente, o que é de extrema necessidade o estudo. Neste estudo não foram encontradas cepas resistente para os alvos clássicos de resistência. Contudo, outros mecanismos de evasão às drogas, como as bombas de efluxo, devem também ser monitoradas.

A nível epidemiológico, a possível reinfecção e em áreas endêmicas é uma hipótese, porém a chance da pessoa estar sempre frequentando lugares ou encontrando grupos que possuem o bacilo podem interferir no tratamento.

A presença do perfil de NAT2 que confere a acetilação lenta de fármacos parece impactar na persistência da viabilidade do bacilo.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1 IRGENS, L. "The discovery of the leprosy bacillus". **Tidsskr nor Laegeforen**. V. 122, n.7, p. 708–9, 2002.
- 2 JAY, V. The Legacy of Armauer Hansen. **Archives of pathology & laboratory medicine**. V. 124, 2000.
- 3 DOGRA, S; NARANG, T, KUMAR, B. Leprosy - Evolution of the path to eradication. **Indian Journal of Medical Research**, v. 137, n. 1, p 15-35, 2013.
- 4 IRGENS, L.; RABSON, S. M. The discovery of *Mycobacterium leprae*. A medical achievement in the light of evolving scientific methods. **The American Journal of Dermatopathology**. V. 6, n. 4, p. 337–43, 1984.
- 5 E. F. L., JR. Status of the generic name *Mycobacterium* Lehmann and Neumann. **International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy**. V. 15, n. 2, p. 87–95, 1965.
- 6 KING, H. C.; KHERA-BUTLER, T.; JAMES, P.; OAKLEY, B. B.; ERENZO, G.; ASEFFA, A.; KNIGHT, R.; WELLINGTON, E. M.; COURTENAY, O. Environmental reservoirs of pathogenic mycobacteria across the Ethiopian biogeographical landscape. **PLoS One**. v. 12, n. 3, e0173811, 2017.
- 7 MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2005. 33 p.
- 8 TRUMAN, R. W.; ANDREWS, P. K.; ROBBINS, N. Y.; ADAMS, L. B.; KRAHENBUHL, J. L.; GILLIS, T. P. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using Real-Time PCR. **PLOS Neglected Tropical diseases**, v. 2, n. 11, p. e328, 2008.
- 9 SHEPARD, C. C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v.112, n. 1, p 445–454, 1960.
- 10 SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n.2, p338–381, 2006.
- 11 COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P. R.; HONORE, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.;

- DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; BARRELL, B. G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p.1007-1011, 2001.
- 12 BROSCH, R.; PYM, A. S.; GORDON, S. V.; COLE, S. T. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. **Trends in microbiology**. V.9, n. 9, p.452-8, 2001.
- 13 V. MEHRA; R. L. MODLIN. T-lymphocytes in leprosy lesions. In: Dr. Stefan H. E. Kaufmann (Ed.). *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin Heidelberg. **Springer-Verlag**. 1990. P. 97-109.
- 14 RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A fivegroup system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**.v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966.
- 15 FOSS N.T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**, V. 30, p.335-339,1997.
- 16 FOSS, N. T. Episódios reacionais na hanseníase. **Medicina, Ribeirão Preto**. V. 36, p. 453-459, 2003.
- 17 ANDRADE, M. & BOMFIM, F. S. Considerações sobre hanseníase e reações hansênicas. **Informe-se em promoção da saúde**.v.4, n.1.p.13-15, 2008
- 18 URA, S. Tratamento e controle das reações hansênicas. **Hansenologia Internationalis**. V. 32, n. 1, p. 67-70, 2007.
- 19 KAHAWITA, I. P., Walker, S. L., Lockwood, D. N. J. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. V. 83, n.1, p.75-82, 2008.
- 20 TRUMAN, R. Leprosy in wild armadillos. **Leprosy Review**. V. 76, n. 3, p. 198-208, 2005.
- 21 MEYERS, W. M.; GORMUS, B. J.; WALSH, G. P.; BASKIN, G. B.; HUBBARD, G. B. Naturally acquired and experimental leprosy in nonhuman primates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 44, n.4 Pt 2, p. 24-7, 1991.

- 22 HUBBARD, G. B.; LEE, D. R.; EICHBERG, J. W.; GORMUS, B. J.; XU, B. J.; MEYERS, W. M. Spontaneous leprosy in a chimpanzee (*Pan troglodytes*). **Veterinary Pathology**. V. 28, p. 546-548, 1991.
- 23 STINEAR, T. P.; BROSCHE, R. Leprosy in red squirrels. **Science**. V. 354, n. 6313, p. 702-703, 2016.
- 24 NEUMANN, A. S.; DIAS, F. A.; FERREIRA, J. S.; FONTES, A. N. B.; ROSA, P.S.; MACEDO, R.E.; OLIVEIRA, J. H.; TEIXEIRA, R. L. F.; PESSOLANI, M. C. V.; MORAES, M. O.; SUFFYS, P. N.; OLIVEIRA, P. L.; SORGINE, M. H.F.; LARA, F. A. Experimental Infection of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* Indicates Potential for Leprosy Transmission. **PLoS ONE**. V. 11, n.5, e0156037, 2016
- 25 LAHIRI, R., KRAHENBUHL, J. L. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. **Leprosy Review**. v. 79, n. 4, p 401-9, 2008.
- 26 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/lep/epidemiology/en/> (Acessado em 24/05/2017).
- 27 SOEIRO, D.; SANTOS, M. Direitos Sociais – Desoneração fiscal. **Radis**. V. 150, n. 35, 2015.
- 28 GRACIE, R.; PEIXOTO, J. N. B.; SOARES, F. B. R.; HACKER, M. A. V. B. Análise da distribuição geográfica dos casos de hanseníase. Rio de Janeiro, 2001 a 2012. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 5, p. 1695-1704, 2017
- 29 MINISTÉRIO DA SAÚDE. SAGE – Sala de Apoio à Gestão Estratégica. Disponível em: <http://sage.saude.gov.br/#>
- 30 SCOTT, A.; NORTON, M. D. Useful plants of dermatology. I. *Hydnocarpus* and chaulmoogra. **Journal of the American Academy of Dermatology**. V. 31, n. 4, p. 683-686, 1994.
- 31 POSSOLO, H. As flacourtiáceas antilepróticas. São Paulo: s.n. 1945
- 32 PARASCANDOLA, J. Chaulmoogra oil and the treatment of leprosy. **Pharmacy in History**, Madison, v.45, n.2, p.47-57.2003
- 33 SANTOS, F. S. D.; S., L. P. A.; SIANI, A. C. O óleo de chaulmoogra como conhecimento científico: a construção de uma terapêutica antileprótica. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.15, n.1, p.29-47, 2008.

- 34 MANCUSO, M. I. R. O estigma da lepra: experiência da exclusão. **Teoria e Pesquisa**, São Carlos, v.16-17, p.34-44, 1996.
- 35 DAMASCO, M. S. História e Memória da Hanseníase no Brasil do século XX: o Olhar e a Voz do Paciente. Rio de Janeiro. PUC-Rio. 2005. 50p.
- 36 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Vocabulário básico de recursos naturais e meio ambiente**. Rio de Janeiro.
- 37 REES, R. J.; PEARSON, J. M.; WATERS, M. F. Experimental and Clinical Studies on Rifampicin in Treatment of Leprosy. **British Medical Journal**. V. 688, n. 1, p. 89–92, 1970.
- 38 WHO. Chemotherapy of Leprosy. **WHO technical report series**. Geneva, 1994.
- 39 World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/lep/mdt/regimens/en/>
- 40 COLEMAN, M. D. Dapsone : modes of action , toxicity and possible strategies for increasing patient tolerance.**The British Journal of Dermatology**.V. 129, n. 5, p. 507–13, 1993.
- 41 CAMPBELL, E. A.; KORZHEVA, N.; MUSTAEV, A.; MURAKAMI, K.; NAIR, S.; GOLDFARB, A. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase.**Cell**. V. 104, p. 901–12, 2001.
- 42 MORRISON, M. E.; MORLEY, G. E. Clofazimine binding with deoxyribonucleic acid. **International Journal of Leprosy**. V. 44, p. 475-481, 1976.
- 43 ANDERSON, R. Enhancement by Clofazimine and inhibition by dapsone of production of prostaglandin E2 by human polymorphonuclear leucocytes in vitro. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. V. 27, p. 257-262, 1985.
- 44 GOULART, I. M. B.; ARBEX, G. L.; CARNEIRO, M. H. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase : um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 35, n. 5, p.453–60, 2002.
- 45 JOPLING, W. H. References to “side-effects of antileprosy drugs in common use”. **Leprosy Review**.V. 56, p. 61-70, 1985
- 46 KUBOTA, R. M. M.; BRANCINI, V. C. L.; GOUVEIA, A. S.; NARDI, S. M. T.; PASCHOAL, V. D. A.; VENDRAMINI, S. H. F. Efeitos adversos da

- poliquimioterapia para hanseníase: utilização de doses alternativas e avaliação pós alta. **Hansenologia Internationalis**. V. 39, n. 1, p. 8-21, 2014.
- 47 TEMOTEO, R. C. A.; SOUZA, M. M.; FARIAS, M. C. A. D.; ABREU, L. C.; NETTO, E. M. Hanseníase: avaliação em contatos intradomiciliares. **ABCS Health Science**. v. 38, n. 3, p. 133-141, 2013.
- 48 DESSUNTI, E. M.; SOUBHIA, Z.; ALVES, E.; ARANDA, C. M.; BARRO, M. P. A. A. Hanseníase: o controle dos contatos no município de Londrina-PR em um período de dez anos. **Revista Brasileira de Enfermagem**. v.61, n.spe, p.689-693, 2008.
- 49 LOBATO, D. C.; XAVIER, M. B.; NEVES, D. C. O. Avaliação das ações da vigilância de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase no Município de Igarapé- Açu, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. V. 7, n. 1, p. 45-53, 2016.
- 50 MAEDA, S.; MATSUOKA, M.; NAKATA, N.; KAI, M.; MAEDA, Y.; HASHIMOTO, K.; KIMURA, H.; KOBAYASHI, K.; KASHIWABARA, Y. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V. 45, n. 12, p. 3635-3639, 2001.
- 51 LIU, D.; ZHANG, Q.; SUN, Y.; WANG, C.; ZHANG, Y.; FU, X.; CHEN, M.; ZHOU, G.; YU, X.; WANG, J.; LIU, H.; ZHANG, F. Drug resistance in *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy in China. **Clinical and Experimental Dermatology**. V. 40, n. 8, p. 908-11, 2015.
- 52 GUERRERO, M. I.; COLORADO, C. L.; TORRES, J. F.; LEÓN, C. L. Is drug-resistant *Mycobacterium leprae* a real cause for concern? First approach to molecular monitoring of multibacillary Colombian patients with and without previous leprosy treatment. **Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud**. V. 34, n. 1, p. 137-47, 2014.
- 53 LIMALDE, S.; OPRMOLLA, D.V. First Results on the Treatment of Leprosy with Rifamycin Sv. **Chemotherapy**. V.10, p. 668-78, 1963.
- 54 KAR, H. K.; GUPTA, R. Treatment of leprosy. **Clinics in Dermatology**. v. 33, p. 55-65, 2015.
- 55 ZHANG, S.; CHEN, J.; CUI, P.; SHI, W.; ZHANG, W.; ZHANG, Y. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in

- Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**.v.70, n. 9, p. 2507-10, 2015.
- 56 JIN, D. J.; GROSS, C. A. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* gene that lead to rifampicin resistance. **Journal of molecular biology**. v. 202, n. 1, p. 45-58, 1988.
- 57 HONORE, N.; COLE, S.T. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 37, n. 3, p. 414-8, 1993.
- 58 RIO DE JANEIRO. Linha de cuidado da hanseníase. Secretaria Municipal de Saúde e Defesa Civil, 2010.
- 59 LUBOMIROV, R.; TELENTI, A.; ROTGER, M. Conceptos generales y métodos de estudio en farmacogenética. **Enfermedades Infecciosasy Microbiología Clínica**. V. 26, n. 6, p.4-9, 2008.
- 60 INGELMAN-SUNDBERG, M. Pharmacongenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. **Journal of International Medicine**. V. 250, p. 186-200, 2001.
- 61 CASCORBI, I.; BROCKMÖLLER, J.; MROZIKIEWICZ, P. M.; MÜLLER, A.; ROOTS, I. Arylamine N-acetyltransferase activity in man. **Drug Metabolism Reviews**. V. 31, p. 489-502, 1999.
- 62 TEIXEIRA, R. L. F. Influência da variabilidade genética humana dos genes NAT2, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 na ocorrência de reações adversas hepáticas induzidas pela isoniazida em pacientes com tuberculose ativa. Rio de Janeiro. 2009. 207p. Tese de doutorado. Pós graduação em Biologia Celular e Molecular - Fundação Oswaldo Cruz.
- 63 WEBER, W. W.; HEIN, D. W. N-acetylation pharmacogenetics. **Pharmacology Review**. V. 37, p. 25-79, 1985.
- 64 BLUM, M.; GRANT, D. M.; MCBRIDE, W.; HEIM, M.; MEYER, U. A. Human N- acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization and functional expression. **DNA and Cell Biology**. V. 9, p.193-203, 1990.
- 65 HEIN, D. W.; DOLL, M. A.; FLETLAND, A. J.; LEFF, M. A.; WEBB, S. J.; XIAO, G. H.; UDAYA-SANKAR, D.; NANGJU, N. A.; FENG, Y. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. **Cancer Epidemiology, biomarkers and Prevention**. V. 9 p. 29-42, 2000.

- 66 HEIN, D. W. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. **Mutation Research**. V. 506-507, p. 65-77, 2002.
- 67 HUANG, Y. S.; CHERN, H. D.; SU, W. J.; WU, J. C.; LAI, S. L.; YANG, S. Y. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis. **Hepatology**. V. 35, n. 4, p. 883-9, 2002.
- 68 LAMB, D.C.; LEI, L.; WARRILOW, A.G.; LEPESHEVA, G.I.; MULLINS, J.G.; WATERMAN, M.R.; KELLY, S.L. The first virally encoded cytochrome p450. **Journal of Virology**. V. 83, n. 16, p. 8266-9, 2009.
- 69 NELSON, D. Cytochrome P450 Homepage. University of Tennessee. Retrieved 2014-11-13.
- 70 HANUKOGLU, I. Electron Transfer Proteins of Cytochrome P450 Systems. **Advances in Molecular and Cell Biology**. V. 14, p. 29-56, 1996.
- 71 PELKONEN, O.; TURPEINEN, M.; HAKKOLA, J.; HONKAKOSKI, P.; HUKKANEN, J.; RAUNIO, H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. **Archives of Toxicology**. V. 82, p. 667- 715, 2008.
- 72 OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em: <http://www.omim.org/entry/124010?search=CYP%203A4&highlight=cyp%203a4>
- 73 HASHIMOTO, H.; TOIDE, K.; KITAMURA, R.; FUJITA, M.; TAGAWA, S.; ITOH, S.; KAMATAKI, T. Gene structure of CYP3A4, an adult-specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. **European Journal of Biochemistry**. V. 218, n. 2, p. 585-95, 1993.
- 74 INOUE, K.; INAZAWA, J.; NAKAGAWA, H.; SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; GUENGERICH, F. P.; ABE, T. Assignment of the human cytochrome P-450 nifedipine oxidase gene (CYP3A4) to chromosome 7 at band q22.1 by fluorescence in situ hybridization. **The Japanese Journal of Human Genetics**. V. 37, n.2, p. 133-8, 1992.
- 75 ZEIGLER-JOHNSON, C. M.; WALKER, A. H.; MANCKE, B.; SPANGLER, E.; JALLOH, M.; MCBRIDE, S.; DEITZ, A.; MALKOWICZ, S. B.; OFORI-ADJEI, D.; GUEYE, S. M.; REBBECK, T. R. Ethnic differences in the

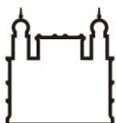
- frequency of prostate cancer susceptibility alleles at *SRD5A2* and *CYP3A4*. **Human Heredity**. V. 54, p. 13-21, 2002.
- 76 ALBEKAIRY, A.; ABDULMALIK, A.; FUJITA, S.; HEMMING, A.; HOWARD, R.; REED, A.; KARLIX, J. Cytochrome P450 *3A4*1B* as pharmacogenomic predictor of tacrolimus pharmacokinetics and clinical outcome in the liver transplant recipients. **The Saudi journal of gastroenterology**. V. 19, n. 2, p. 89-95.
- 77 PAULUSSEN, A.; LAVRIJSEN, K.; BOHETS, H.; HENDRICKX, J.; VERHASSELT, P.; LUYTEN, W.; KONINGS, F.; ARMSTRONG, M. Two linked mutations in transcriptional regulatory elements of the *CYP3A5* gene constitute the major genetic determinant of polymorphic activity in humans. **Pharmacogenetics**.v.10, p. 415-424, 2000.
- 78 YAMAKOSHI, Y.; KISHIMOTO, T., SUGIMURA, K., KAWASHIMA, H. Human prostate *CYP3A5*: identification of a unique 5-prime-untranslated sequence and characterization of purified recombinant protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 260, p. 676-681, 1999.
- 79 KUEHL, P.; ZHANG, J.; LIN, Y.; LAMBA, J.; ASSEM, M.; SCHUETZ, J.; WATKINS, P. B.; DALY, A.; WRIGHTON, S. A.; HALL, S. D.; MAUREL, P.; RELING, M.; BRIMER, C.; YASUDA, K.; VENKATARAMANAN, R.; STROM, S.; THUMMEL, K.; BOGUSKI, M. S.; SCHUETZ, E. Sequence diversity in *CYP3A* promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic *CYP3A5* expression. **Nature Genetics**. V. 27, p. 383-391, 2001.
- 80 WATANABE, J.; HAYASHI, S.; KAWAJIRI, K. Different regulation and expression of the human *CYP2E1* gene due to *Rsa* I polymorphism in the 5'-flanking region. **Journal of Biochemistry**. V. 116, n. 2, p.321-326, 1994.
- 81 VUILLEUMIER, N.; ROSSIER, M. F.; CHIAPPE, A.; DEGOUMOIS, F.; DAYER, P.; MERMILLOD, B.; NICOD, L.; DESMEULES, J.; HOCHSTRASSER, D. *CYP2E1* genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis. **European Journal of Clinical Pharmacology**. V. 62, n. 6, p. 423-429, 2006.
- 82 MITRA, A. K.; THUMMEL, K. E.; KALHORN, T; F.; KHARASCH, E. D.; UNADKAT, J. D.; SLATTERY, J. T. Metabolism of dapsone to its

- hydroxylamine by CYP2E1 in vitro and in vivo. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. v. 58, n. 5, p. 556–66, 1995.
- 83 WATKINS, P. B. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. **Pharmacogenetics**. v. 4, n. 4, p. 171–84, 1994.
- 84 LOPES, M. Q. P. Avaliação dos fenótipos de acetilação e hidroxilação predominantes nas populações de cinco macrorregiões do Brasil baseada no genoma: possível influência da farmacogenética na conduta terapêutica da hanseníase. Rio de Janeiro. 2015. 152p. Pós graduação em Biologia Celular e Molecular - Fundação Oswaldo Cruz.
- 85 CDC – Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/od/science/aboutus/shepard/history/> (acessado em 11/07/2017)
- 86 ELLIS, R. C.; ZABROWARNY, L. A. Safer staining method for acid fast bacilli. *Journal of Clinical Pathology*. V. 46, p. 559-560, 1993.
- 87 NOBEL PRIZE. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-facts.html (acessado em 11/07/2017)
- 88 SAIKI, R.; GELFAND, D.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K.; ERLICH, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. V. 239, n.4839, p. 487–491, 1988.
- 89 PHETSUKSIRI, B.; RUDEEANESKIN, J.; SUPAPKUL, P.; WACHAPONG, S.; MAHOTARN, K.; BRENNAN, P. J. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, V. 48, n. 3, p. 319–328, 2006.
- 90 JADHAV, R. S.; KAMBLE, R. R.; SHINDE, V. S.; EDWARD, S.; EDWARD, V. K. Use of reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in the slit-skin smears of leprosy patients. **Indian journal of leprosy**. V. 77, n. 2, p. 116-127, 2005.
- 91 MARTINEZ, A. N.; BRITTO, C. F.; NERY, J. A.; SAMPAIO, E. P.; JARDIM, M. R. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**. V.44, p. 3154–3159, 2006.

- 92 CALEFFI, K. R.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; CALEFFI, E. R.; SIQUEIRA, V. L. Use of the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium leprae* in urine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 45, p. 153–157, 2012.
- 93 DE WIT, M. Y.; DOUGLAS, J. T.; MCFADDEN, J.; KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. **Journal of Clinical Microbiology** v. 31, p. 502–506, 1993.
- 94 ROSA, F. B.; DE SOUZA, V. C.; ALMEIDA, T. A.; NASCIMENTO, V. A.; VASQUEZ, F.G. Detection of *Mycobacterium leprae* in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 108, p. 572–577, 2013.
- 95 SHAMSI, F. A.; CHAUDHRY, I. A.; MORAES, M. O.; MARTINEZ, A. N.; RILEY, F. C. Detection of *Mycobacterium leprae* in ocular tissues by histopathology and realtime polymerase chain reaction. **Ophthalmic Research**.v.39, p. 63–68, 2007.
- 96 ALMEIDA, E. C.; MARTINEZ, A. N.; MANIERO, V.C.; SALES, A.M.; DUPPRE, N.C. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 99, p. 509–511, 2004.
- 97 JARDIM, M. R.; ANTUNES, S. L.; SANTOS, A. R.; NASCIMENTO, O. J.; NERY, J. A. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **Journal of Neurology** 250: 806–809, 2003.
- 98 SANTOS, A. R.; BALASSIANO, V.; OLIVEIRA, M. L. W.; PEREIRA, M. A. S.; SANTOS, P. B.; DEGRAVE, W. M.; SUFFYS, P. N. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood of Individuals, Eight Years after Completion of Anti-leprosy Therapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. V. 96, n. 8, p. 1129-1133, 2001
- 99 MARTINEZ, A. N., TALHARI, C., MORAES, M. O., TALHARI, S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. V. 8, n. 4. e2655, 2014.
- 100 MARTINEZ, A. N.; LAHIRI, R.; PITTMAN, T. L.; SCOLLARD, D.; TRUMAN, R.; MORAES, M. O.; WILLIAMS, D. L. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. **Journal of clinical Microbiology**, v. 47 n. 7, p 2124 – 2130, 2009.

- 101 LINI, N.; SHANKERNARAYAN, N.P.; DHARMALINGAM, K. Quantitative real-time PCR analysis of *Mycobacterium leprae* DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases. **Journal of Medical Microbiology**. V. 58, p.: 753-759, 2009.
- 102 AGÚNDEZ, J. A. G.; GOLKA, K.; MARTÍNEZ, C.; SELINSKI, S.; BLASZKEWICZ, M.; GARCÍA-MARTÍN, E. Unraveling ambiguous NAT2 genotyping data. **Clinical Chemistry**. V. 54, n.8, p.1390-4, 2008.
- 103 CAVALLI, S. A.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. Detection of *MboII* polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4 **Clinical Chemistry**. V. 47, n. 2, p. 348-51, 2001.
- 104 FUKUEN, S.; FUKUDA, T.; MAUNE, H.; IKENAGA, Y.; YAMAMOTO, I.; INABA, T. Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs, *CYP3A5**3 and *6, in a Japanese population. **Pharmacogenetics**. V. 12, n. 4, p. 331-4, 2002.
- 105 HUANG, Y. S.; CHERN, H.D.; SU, W. J.; WU, J. C.; CHANG, S. C.; CHIANG, C. H. Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis. **Hepatology**. V. 37, n. 4, p. 924-30, 2003.
- 106 MARTINEZ, T. S.; FIGUEIRA, M. M. N. R; COSTA, A. V.; GONÇALVES, M. A.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clinical Microbiology and Infection**. V. 17, n. 11, p.1653-1658 2011.
- 107 SZUMOWSKI, J. D.; ADAMS, K. N.; P. H. EDELSTEIN, P. H.; L. RAMAKRISHNAN, L.. Antimicrobial Efflux Pumps and *Mycobacterium Tuberculosis* Drug Tolerance: Evolutionary Considerations. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. DOI: 10.1007/82_2012_300, 2012.

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido (Paciente)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) _____

para participar da Pesquisa “**Análise molecular do tempo de persistência da viabilidade do *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes sob tratamento poliquimioterápico**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr. Flávio Alves Lara Dr^o. Roberta Olmo Pinheiro.

Atualmente é disponibilizado na rede pública de saúde a medicação para o tratamento da Hanseníase e da Tuberculose. No entanto, alguns pacientes apresentam algumas reações quando utilizam tais medicamentos e, na literatura há relatos da existência de resistência a alguns dos medicamentos utilizados pela bactéria. Assim, no presente estudo, estamos propondo avaliar a presença de micobactérias vivas em amostras de raspado nasal e bucal de pacientes em tratamento para a Hanseníase ou tuberculose. Caso concorde, a sua participação será voluntária e consistirá na coleta de raspado bucal e nasal mensalmente, nos dias de administração de dose assistida do medicamento no Ambulatório Souza Araújo.

Não há riscos decorrentes de sua participação na pesquisa. Você receberá uma espátula de plástico e deverá, seguindo as instruções do enfermeiro/farmacêutico responsáveis, realizar o procedimento. O material obtido será levado para o laboratório onde permanecerá armazenado até a realização dos exames que identificarão a presença de bactérias vivas. Se você aceitar participar, estará contribuindo para uma maior compreensão sobre o tratamento das doenças causadas por micobactérias e a ocorrência de resistência aos medicamentos em uso atualmente.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço: Laboratório de Hanseníase - Avenida Brasil, 4365 – Manginhos – Rio de Janeiro, pelo telefone (21) 2562-1541, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Informações adicionais sobre o

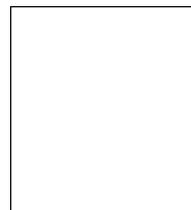
CEP podem ser obtidas pelo e-mail etica@fiocruz.br, pelo telefone (21) 3882-9000 (Ramal 9011) ou pelo fax (21) 2561-4815.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do Paciente

Data: ____/____/____

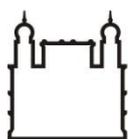


Impressão do dedo polegar

Caso não saiba assinar

Assinatura do Pesquisador(a) Responsável

Anexo 2– Termo de consentimento livre e esclarecido (Participante)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) _____

para participar da Pesquisa “**Análise molecular do tempo de persistência da viabilidade do *Mycobacterium leprae* em pacientes sob tratamento poliquimioterápico**”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Flávio Alves Lara e Roberta Olmo Pinheiro.

Atualmente é disponibilizada na rede pública de saúde a medicação para o tratamento da Hanseníase. No entanto, alguns pacientes apresentam algumas reações quando utilizam tais medicamentos e, na literatura, há relatos da existência de resistência a alguns dos medicamentos utilizados pela bactéria. Assim, no presente estudo, estamos propondo avaliar a presença de micobactérias vivas em amostras de raspado nasal e bucal de pacientes em tratamento para a Hanseníase. Caso concorde, a sua participação será voluntária e consistirá na coleta de raspado bucal e nasal, utilizando-as como controle para as amostras coletadas mensalmente de pacientes no Ambulatório Souza Araújo.

Não há riscos decorrentes de sua participação na pesquisa. Você receberá uma espátula de plástico e deverá, seguindo as instruções dos responsáveis, realizar o procedimento. O material obtido será levado para o laboratório onde permanecerá armazenado até a realização das análises dos grupos de amostras que identificarão a presença de bactérias vivas nas amostras de pacientes e das amostras de pessoas saudáveis para controle. Se você aceitar participar, estará contribuindo para uma maior compreensão sobre o tratamento das doenças causadas por micobactérias e a ocorrência de resistência aos medicamentos em uso atualmente.

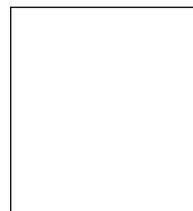
Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com os pesquisadores no seguinte endereço: Avenida Brasil, 4365 – Pavilhão de Hanseníase, salas 05 ou 27 - Manguinhos – Rio de Janeiro, pelo telefone (21) 2562-1541, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Informações adicionais sobre o CEP podem ser obtidas pelo e-mail etica@fiocruz.br, pelo telefone (21) 3882-9000 (Ramal 9011) ou pelo fax (21) 2561-4815.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do participante

Data: ____/____/____



Impressão do dedo polegar

Caso não saiba assinar

Assinatura do Pesquisador(a) Responsável