

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

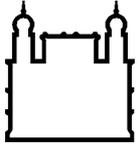
RICARDO DOS SANTOS PEREIRA

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, SOROLÓGICA
E GENÉTICA DA HANSENÍASE NO
MUNICÍPIO DE RIO BRANCO/AC**

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RICARDO DOS SANTOS PEREIRA

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, SOROLÓGICA
E GENÉTICA DA HANSENÍASE NO
MUNICÍPIO DE RIO BRANCO/AC**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO
2018

Pereira, Ricardo dos Santos.

Análise Epidemiológica, Sorológica e Genética da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC. / Ricardo dos Santos Pereira. – Rio de Janeiro: 2018.

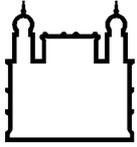
160 f.; il.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Milton Ozório Moraes.

Bibliografia: f. 90-110

1. *M. leprae*. 2. Análise espacial. 3. Testes rápidos. 4. Análise molecular.
5. Acre. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: RICARDO DOS SANTOS PEREIRA

**ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, SOROLÓGICA
E GENÉTICA DA HANSENÍASE NO
MUNICÍPIO DE RIO BRANCO/AC**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Aprovada em: 04/05/2018.

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes / IOC-Fiocruz – Presidente.

Prof. Dra. Maria Leide Wan Del Rey de Oliveira / UFRJ-HUCFF.

Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira / IOC-Fiocruz.

Prof. Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz / PROCC-Fiocruz.

Prof. Dr. Adalberto Rezende Santos / IOC-Fiocruz.

Rio de Janeiro, 04 de maio de 2018.

À minha família e aos meus amigos por sempre terem me incentivado a concretizar meus objetivos e nunca desistir de meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Dr. Milton Ozório Moraes, pelo aprendizado e confiança.
- Ao meu revisor, Dr. Harrison Magdinier Gomes, por ter aceitado o convite para revisar este trabalho.
- Aos membros da banca, pela gentileza de terem aceitado o convite.
- A todas as instituições colaboradoras: Secretaria Estadual de Saúde (Setor de Dermatologia do HC/Acre: Franciely Gonçalves, Vânia Barros, Valcir Cunha, Gercina Silva, Roberto Batista, Dário Cavalcante e Roseneide Bispo); Vigilância Epidemiológica Municipal/AC (Mônica Inácio); Hemoacre (Elba Souza); Casa de Acolhida Souza Araújo (Adalcineide Farias, Daniella Souza); Mohan (Elson Dias).
- Aos meus alunos de Iniciação Científica Cleilson Silva e Elândia Lima, que colaboraram imensamente com o meu trabalho durante sua execução.
- A todos do Laboratório de Hanseníase (LAHAN), em especial Suelen Moreira, Ohanna Bezerra, Laís Ferreira, Fernanda Manta e Thyago Leal, que me ajudaram diretamente na realização dos experimentos/análises do doutorado.
- Ao Dr. Oswaldo Gonçalves Cruz, por ter me orientado quanto a Análise Espacial da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC.
- Ao Programa de Biologia Celular e Molecular e aos professores do curso que contribuíram enormemente com a minha formação acadêmica.
- Ao IFAC e a FAPAC, pelo suporte financeiro que possibilitaram a realização do presente trabalho.
- Ao Instituto Federal do Acre, pela realização do Convênio Institucional (IFAC/IOC-Fiocruz), que possibilitou meu doutoramento.
- À minha família, que sempre serviu de alicerce para as minhas conquistas.
- À Jussara Pereira, que me apoiou durante esta longa jornada.
- Aos meus amigos, por toda força que sempre me deram.
- A todos os colegas do doutorado, principalmente aos doutorandos do IFAC, com os quais pude dividir alegrias, tristezas, angústias, incertezas, mas fundamentalmente a certeza de que no final tudo daria certo.

“Mesmo que a vida pareça difícil, sempre há algo que você pode fazer para ter sucesso nela. Enquanto houver vida, haverá esperança”.

(Stephen Hawking)

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	xi
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
Resumo	xix
Abstract	xx
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Caracterização da Doença	1
1.1.1. Histórico da Hanseníase	1
1.1.2. Causa e Transmissão da Doença	3
1.1.3. Biologia do <i>Mycobacterium leprae</i>	4
1.1.4. Relação Patógeno-Hospedeiro	7
1.1.5. Resistência ou Susceptibilidade Genética à Hanseníase	10
1.1.6. Classificação, Sintomas e Diagnóstico Padrão da Doença	13
1.1.7. Tratamento e Prevenção da Doença	17
1.2. Prevalência da Hanseníase no Mundo e no Brasil	19
1.3. A Hanseníase no Estado do Acre	22
1.4. Esforços Atuais na Pesquisa em Hanseníase	26
1.4.1. Análise Espacial da Hanseníase	26
1.4.2. Diagnóstico Sorológico da Hanseníase	28
1.4.3. Diagnóstico Molecular da Hanseníase	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo Geral	31
2.2. Objetivos Específicos	31

3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Autorização para Realização da Pesquisa	31
3.2. Desenho Experimental	31
3.3. Avaliação Epidemiológica e Espacial da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC	34
3.3.1. Avaliação Epidemiológica da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC	34
3.3.2. Análise Espacial da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC	35
3.4. Análise da Sorologia para LID-1 e/ou PGL-1 de <i>M. leprae</i>	37
3.4.1. Coleta e Processamento das Amostras	37
3.4.2. Análise das Amostras	38
3.5. Análise Molecular do DNA de <i>M. leprae</i>	39
3.5.1. Coleta e Processamento das Amostras	39
3.5.2. Análise das Amostras	40
3.6. Genotipagem de Polimorfismos (SNPs)	40
3.6.1. Coleta e Processamento das Amostras	40
3.6.2. Análise das Amostras	41
4. RESULTADOS	44
4.1. Epidemiologia da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC	44
4.2. Análise Espacial da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC	46
4.3. Diagnóstico Sorológico da Hanseníase	59
4.4. Diagnóstico Molecular da Hanseníase	64
4.5. Análise Molecular de Polimorfismos para a Hanseníase	68
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

8. APÊNDICES	111
8.1. APÊNDICE I – TCLE (HC/Acre)	112
8.2. APÊNDICE II – TCLE (Hemoacre)	116
8.3. APÊNDICE III – Adaptação do Protocolo <i>DNeasy Blood & Tissue Kit</i>	118
8.4. APÊNDICE IV – Adaptação do Protocolo de <i>Salting Out</i>	122
9. ANEXOS	126
9.1. ANEXO I – Linha do Tempo: Bacurau	127
9.2. ANEXO II – Pareceres CEP	131

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACS	Agentes comunitários de saúde
AG	Arabinogalactana
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	<i>Borderline-borderline</i>
BL	<i>Borderline-lepromatosa</i>
BT	<i>Borderline-tuberculóide</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CGD	Coeficiente geral de detecção
CNV	Variação no número de cópias, do inglês <i>Copy number variation</i>
Cts	Ciclo de threshold, do inglês <i>Cycle threshold</i>
DEPASA	Departamento estadual de pavimentação e saneamento/AC
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
GPS	Sistema de posicionamento global
GWAS	Estudos pangenômicos de associação, do inglês <i>Genome wide association study</i>
HC/Acre	Hospital das Clínicas do Estado do Acre
I	Indeterminada
IB	Índice baciloscópico
IDRI	Instituto de Pesquisa em Doenças Infeciosas, do inglês <i>Infectious Disease Research Institute</i>
IP-10	Proteína 10 induzida pelo IFN- γ
LAM	Lipoarabinomanana
LAMA-2	Laminina-2
LBP21	Proteína 21 que liga à laminina
LD	Desequilíbrio de ligação

LID-1	Proteína de fusão recombinante para diagnóstico da hanseníase (proteínas de fusão ML0304 e ML0331)
LL	Lepromatosa-lepromatosa
LTA	Gene que codifica linfotoxina alfa
MA	Ácidos micólicos
Mb	Megabase
MB	Multibacilar
MCA	Ácidos micocerósicos
ML Flow Test	Teste de fluxo lateral para <i>M. leprae</i> (PGL-1)
Mohan	Movimento de reintegração das pessoas atingidas pela hanseníase
MP	Proteínas de membrana
MRC1	Receptor de manose C-tipo 1
NDO-LID	Conjugado de ND-O (dissacarídeo sintético mimético do PGL-1) e proteína LID-1 (proteínas de fusão ML0304 e ML0331)
NOD2	Gene que codifica o receptor NOD2
OAS	Oligoadenilato sintetases
OASL	Enzima oligoadenilato sintetase-like
PACRG	Gene que compartilha o promotor do gene PARK2
PARK2	Gene que codifica a proteína parkina
PB	Paucibacilar
PEP	Profilaxia pós-exposição, do inglês <i>Post-Exposure Prophylaxis</i>
PFK	Fosfofrutoquinase
PGL-1	Glicolípido fenólico 1
PK	Enzima piruvato-quinase
PKLR	Enzima piruvato-quinase de células vermelhas e do fígado

PM	Membrana plasmática
PNL	Hanseníase neural pura
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
PQT	Poliquimioterapia
PQT-MB	Poliquimioterapia multibacilar
PQT-TB	Poliquimioterapia paucibacilar
QGIS	Quantum GIS
qPCR	PCR em tempo real quantitativa, do inglês “Quantitative real time PCR”
qRT-PCR	PCR em tempo real quantitativa com transcrição reversa, do inglês “Real-time quantitative reverse transcription PCR”
RLEP	Do inglês <i>M. leprae-specific repetitive element</i>
RR	Reação Reversa
SIG	Sistema de Informações Geográficas, do inglês <i>GIS – Geographic information system</i>
SINAN	Sistema de Informação sobre Agravos Notificação
SNPs	Polimorfismo de base única, do inglês <i>Single nucleotide polymorphism</i>
sodA	Gene que codifica superóxido dismutase
STRs	Sequência de repetições em tandem, do inglês <i>Short tandem repeats</i>
T1R	Reação tipo 1
T2R	Reação tipo 2
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
THP-1	Linhagem celular monocítica humana, derivada de pacientes com leucemia monocítica aguda
TLRs	Receptores do tipo-Toll

Treg	Células T regulatórias
TT	Tuberculóide-tuberculóide
VDR	Gene que codifica o receptor de vitamina D
VNTRs	Repetição em tandem de número variável, do inglês <i>Variable number of tandem repeats</i>

LISTA DE FIGURAS

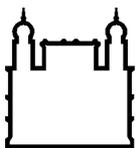
Figura 1.1: Classificação filogenética do <i>M. leprae</i>	4
Figura 1.2: Interação do <i>M. leprae</i> com a célula de Schwann	6/7
Figura 1.3: Influência genética no controle da hanseníase <i>per se</i> , na definição das diferentes formas clínicas da doença e na ocorrência/gravidade dos episódios reacionais	8
Figura 1.4: Classificação clínica da hanseníase (TT, BT, BB, BL, LL) e classificação operacional da doença (PB e MB)	14
Figura 1.5: Mapa de distribuição de casos novos de hanseníase no mundo no ano de 2015	20
Figura 1.6: Áreas endêmicas (<i>clusters</i>) de hanseníase no Brasil (2011-2013)	21
Figura 1.7: Taxa de incidência de hanseníase no Brasil, dividida por regiões (1990-2012)	22
Figura 1.8: Mapa de localização do município de Rio Branco, no estado do Acre, Brasil	23
Figura 1.9: Taxa de incidência de hanseníase no Acre, em relação ao Brasil e a região Norte (1990-2012)	24
Figura 1.10: Taxa de incidência (por 100.000 habitantes) de hanseníase, por municípios do Acre, no ano de 2010	25
Figura 3.1: Desenho experimental do estudo	33
Figura 3.2: Análises experimentais realizadas no estudo	34
Figura 3.3: Validação de testes rápidos	39
Figura 3.4: Representação do <i>plot</i> de discriminação alélica	42
Figura 4.1: Número de contatos registrados, contatos examinados e casos novos da doença no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016	45
Figura 4.2: Números de casos novos da doença no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016, classificados em Paucibacilar ou Multibacilar	45

Figura 4.3: Taxa de detecção de hanseníase no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016	46
Figura 4.4: Divisão dos bairros do município de Rio Branco/AC por regionais	47
Figura 4.5: Casos novos de hanseníase por bairros no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016	49
Figura 4.6: Taxa de detecção de hanseníase (por 10.000 habitantes) por bairros no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016	51
Figura 4.7: Histograma apresentando a frequência percentual da taxa de detecção de hanseníase (por 10.000 habitantes) no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016	53
Figura 4.8: <i>Boxplot</i> da taxa de detecção média de hanseníase (por 10.000 habitantes) no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016	54
Figura 4.9: Taxa de prevalência de hanseníase (por 10.000 habitantes) por bairros no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016	56
Figura 4.10: Histograma apresentando a frequência percentual da taxa de prevalência acumulada de hanseníase (por 10.000 habitantes) no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016	57
Figura 4.11: <i>Boxplots</i> da taxa de prevalência acumulada de hanseníase (por 10.000 habitantes) no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016	58
Figura 4.12: Classificação dos testes rápidos NDO-LID de pacientes (multibacilares e paucibacilares) e contatos para hanseníase	61
Figura 4.13: Classificação dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) de pacientes (multibacilares e paucibacilares), contatos e controles para hanseníase	63
Figura 4.14: Relação entre a qPCR e a baciloscopia dos pacientes avaliados para a hanseníase	66
Figura 5.1: Propostas de ações para a identificação, triagem, diagnóstico e tratamento da hanseníase	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Esquema padrão de tratamento da hanseníase, de acordo com a classificação operacional da doença	17
Tabela 3.1: Caracterização dos SNPs utilizados na genotipagem em PCR em Tempo Real	42
Tabela 4.1: Dados referentes à hanseníase levantados junto à Vigilância Epidemiológica Municipal de Rio Branco/AC	44
Tabela 4.2: Classificação da taxa de detecção (por 10.000 habitantes) bruta e suavizada da doença por bairros no município de Rio Branco/AC	50
Tabela 4.3: Medidas sumárias para a taxa de detecção média (por 10.000 habitantes) bruta e suavizada da doença no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016	54
Tabela 4.4: Classificação da taxa de prevalência acumulada (por 10.000 habitantes) bruta e suavizada da doença por bairros no município de Rio Branco/AC	55
Tabela 4.5: Medidas sumárias para a taxa de prevalência acumulada (por 10.000 habitantes) bruta e suavizada da doença no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016	58
Tabela 4.6: Classificação dos testes rápidos (NDO-LID e ML-Flow (PGL-1)) de pacientes, contatos e controles para hanseníase	59
Tabela 4.7: Testes rápidos (NDO-LID e ML-Flow (PGL-1)) de pacientes (multibacilares e paucibacilares) tratados, em tratamento e não-tratados para a hanseníase	59
Tabela 4.8: Testes rápidos (NDO-LID e ML-Flow (PGL-1)) de contatos positivos e negativos para a hanseníase	60
Tabela 4.9: Classificação dos testes rápidos NDO-LID de pacientes (multibacilares e paucibacilares) e contatos para a hanseníase	60
Tabela 4.10: Classificação dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) de pacientes (multibacilares e paucibacilares), contatos e controles para hanseníase	62

Tabela 4.11: Avaliação dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) utilizados no estudo no grupo de pacientes multibacilares	63
Tabela 4.12: Avaliação dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) utilizados no estudo no grupo de pacientes paucibacilares	63
Tabela 4.13: Caracterização dos pacientes com hanseníase que participaram do estudo de diagnóstico molecular (qPCR)	64
Tabela 4.14: Amostras de pacientes e contatos para hanseníase analisadas pela qPCR	65
Tabela 4.15: Amostras de pacientes e contatos para hanseníase, agrupadas em relação ao grupo de estudo retrospectivo (anterior a 2016) e prospectivo (2016-2017), analisadas pela qPCR	65
Tabela 4.16: Amostras de pacientes (multibacilares e paucibacilares) analisadas pela qPCR em relação a fase de tratamento para a hanseníase	67
Tabela 4.17: Amostras de contatos para a hanseníase analisadas pela qPCR em relação aos pacientes (multibacilares e paucibacilares) tratados e não-tratados	67
Tabela 4.18: Caracterização da população (Casos x Controles) utilizada no estudo da genotipagem de SNPs	68
Tabela 4.19: Frequências alélicas e genotípicas do SNP rs4620533 (gene <i>PKLR</i>) em casos e controles do município de Rio Branco/AC, relativas ao estudo de associação com a hanseníase	69
Tabela 4.20: Frequências alélicas e genotípicas do SNP rs4971072 (gene <i>PKLR</i>) em casos e controles do município de Rio Branco/AC, relativas ao estudo de associação com a hanseníase	70
Tabela 4.21: Frequências alélicas e genotípicas do SNP rs11264355 (gene <i>PKLR</i>) em casos e controles do município de Rio Branco/AC, relativas ao estudo de associação com a hanseníase	71
Tabela 4.22: Frequências alélicas e genotípicas do SNP rs3213545 (gene <i>OASL</i>) em casos e controles do município de Rio Branco/AC, relativas ao estudo de associação com a hanseníase	72



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

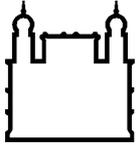
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA, SOROLÓGICA E GENÉTICA DA HANSENÍASE NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO/AC

RESUMO

Ricardo dos Santos Pereira

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica, de evolução lenta e formas clínicas distintas, causada pelo *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis*, que infectam células nos nervos e na pele. É relatado que animais atuam como reservatórios e podem ser hospedeiros intermediários do bacilo. Entretanto, a transmissão da doença ocorre principalmente pelo contato direto entre pacientes multibacilares e contatos intradomiciliares, onde a principal via de eliminação de bacilos ocorre pelas vias aéreas superiores. Neste trabalho, foram utilizadas estratégias baseadas em métodos epidemiológicos, sorológicos e moleculares para a identificação, a triagem e o diagnóstico precoce de casos novos de hanseníase no município de Rio Branco/AC. A análise epidemiológica da doença no ano de 2016 revelou taxas de detecção altas (1,62/10.000 habitantes), sendo hiperendêmica a taxa de prevalência acumulada (29,76/10.000 habitantes) no período 2006-2016. A análise espacial revelou que houve redução no número de casos novos de hanseníase no triênio 2014-2016, ocorrendo o mesmo para a taxa de detecção média no período. Para avaliar a soropositividade de pacientes e contatos intradomiciliares, foram realizados testes rápidos (NDO-LID e ML-Flow (PGL-1)) em 150 pacientes, 119 contatos e 89 controles. Destes, 53,6% (59/110) foram positivos em pacientes multibacilares e 22,5% (9/40) em pacientes paucibacilares. Nos contatos, 37% (44/119) dos testes foram positivos, sendo considerado muito alto. Para os controles, 30,3% (27/89) dos testes rápidos foram positivos, o que sugere uma alta taxa de infecção e possivelmente uma transmissão ativa da doença. A detecção do DNA de *M. leprae*, a partir de amostras de pacientes (n=213) e contatos (n=213), foi realizada através da qPCR para o gene 16S (rDNA). Das amostras positivas para a qPCR, observada no grupo de estudo mais recente (2016-2017), 19 amostras (86,36%) foram de pacientes multibacilares, 01 amostra (4,5%) de paciente paucibacilar e 02 amostras (9,1%) de contatos. Os resultados obtidos apresentaram 100% de positividade em pacientes multibacilares não-tratados ou no início do tratamento (até três meses). As análises genéticas em relação aos polimorfismos associados à hanseníase, realizadas a partir de um estudo caso-controle, recrutou um total de 768 indivíduos (pacientes (n=157) e controles (n=611)). A genotipagem de polimorfismos para os SNPs dos genes *PKLR* (rs4620533, rs4971072, rs11264355) e *OASL* (rs3213545) revelou que não houve uma diferença significativa entre as frequências dos genótipos e alelos no grupo de casos e controles na população estudada. A análise espacial demonstrou que ainda existem muitas áreas hiperendêmicas para a hanseníase, onde pode ser realizada a busca ativa de casos novos. A alta positividade dos testes rápidos em contatos e controles indica a circulação ativa do *M. leprae*, o que coloca em dúvida sua utilização para a triagem da doença. A análise molecular (qPCR) teve baixa taxa de positividade, mas poderia ser utilizada no rastreamento e diagnóstico precoce da população de risco para a hanseníase. Os loci investigados no estudo genético não replicaram achados anteriores do nosso grupo, demonstrando que são necessários estudos de ancestralidade e a investigação de novas regiões do genoma na tentativa de se definir um painel de SNPs de suscetibilidade à hanseníase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EPIDEMIOLOGICAL, SEROLOGICAL AND GENETIC ANALYSIS OF LEPROSY IN THE MUNICIPALITY OF RIO BRANCO/AC

ABSTRACT

Ricardo dos Santos Pereira

Leprosy is a chronic infectious and slow-evolving disease with distinct clinical forms, caused by *Mycobacterium leprae* and *lepromatosis*, which infects cells in the nerves and skin. It is reported that animals act as reservoirs and may be intermediate hosts of the bacillus. However, transmission of the disease occurs mainly through direct contact between multibacillary patients and intradomiciliary contacts, where the main route of elimination of bacilli occurs through the upper airways. In this work, strategies based on epidemiological, serological and molecular methods were used for the identification, screening and early diagnosis of new cases of leprosy in the city of Rio Branco/AC. The epidemiological analysis of the disease in 2016 revealed high detection rates (1.62 / 10,000 inhabitants) and the cumulative prevalence rate (29.76 / 10,000 inhabitants) in the 2006-2016 period was hyperendemic. Spatial analysis revealed that there was a reduction in the number of new leprosy cases in the 2014-2016 triennium, occurring the same for the mean detection rate in the period. To assess the seropositivity of patients and household contacts, rapid tests (NDO-LID and ML-Flow (PGL-1)) were performed in 150 patients, 119 contacts and 89 controls. Of these, 53.6% (59/110) were positive in multibacillary patients and 22.5% (9/40) in paucibacillary patients. In the contacts, 37% (44/119) of the tests were positive, being considered very high. For the controls, 30.3% (27/89) of the rapid tests were positive, suggesting a high infection rate and possibly an active transmission of the disease. Detection of *M. leprae* DNA, from patient samples (n=213) and contacts (n=213), was performed by qPCR for the 16S gene (rDNA). Of the qPCR-positive samples, 19 samples (86.36%) were from multibacillary patients, 01 sample (4.5%) from paucibacillary patients and 02 samples (9, 1%) of contacts. The results obtained were 100% positive in untreated multibacillary patients or at the beginning of treatment (up to three months). Genetic analysis of leprosy-associated polymorphisms from a case-control study enrolled a total of 768 subjects (patients (n=157) and controls (n = 611)). Genotyping polymorphisms for the SNPs of the *PKLR* genes (rs4620533, rs4971072, rs11264355) and *OASL* (rs3213545) revealed that there was no significant difference between genotype and allele frequencies in the case-control group in the studied population. Spatial analysis has shown that there are still many hyperendemic areas for leprosy, where active search for new cases can be performed. The high positivity of rapid tests on contacts and controls indicates the active circulation of *M. leprae*, which calls into question its use for the screening of the disease. Molecular analysis (qPCR) had a low positivity rate, but could be used in the screening and early diagnosis of the population at risk for leprosy. The loci investigated in the genetic study did not replicate previous findings of our group, demonstrating that ancestral studies and the investigation of new regions of the genome are necessary in an attempt to define a panel of SNPs susceptible to leprosy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização da Doença

1.1.1. Histórico da Hanseníase

A hanseníase é uma das enfermidades mais antigas do mundo, afetando a humanidade há mais de 4.000 anos, sendo os primeiros registros encontrados no Antigo Egito e em outras civilizações como a China e a Índia (Robbins *et al.*, 2009). Apesar destas evidências, as teorias sobre a origem da hanseníase são controversas. Uma hipótese indica que a doença apareceu no Oeste africano e foi propagada para outras regiões do mundo através do fluxo de migrações contínuas durante a história da humanidade (Monot *et al.*, 2009). No entanto, evidências moleculares mais recentes sugerem que a origem da doença teria ocorrido na Eurásia, muito provavelmente no Extremo Oriente (Avanzi, 2018; Benjak, 2018).

Na Europa, o período de maior incidência da chamada “lepra” (do grego lepros, que significa descamação) foi ao longo dos séculos VI e VII. O aumento da sua incidência se agravou com as invasões árabes e os possíveis fatores associados à doença (má alimentação, promiscuidade, pobreza, más condições de higiene, entre outras). No século XII, já havia cerca de 19.000 leprosários em toda a Europa, onde os “leprosos” eram isolados da “população sadia”. No século XVIII, os casos de hanseníase continuavam aumentando, sendo encontrada tanto em Portugal como nas ilhas africanas. Em meados de 1800, importantes mudanças ocorreram na Europa (melhoria sanitária, urbanização e nível de vida da população), fazendo com que em torno de 1870 a doença se encontrasse praticamente erradicada. Além disso, devido a colonização e ao tráfico de escravos, a doença diminuiu na Europa e foi introduzida nas Américas (Browne, 1985; Brasil, 1989; Ura & Opromolla, 2000; Monot *et al.*, 2005; Marzliak, *et al.*, 2008).

No Brasil, os primeiros casos da doença foram notificados por volta do ano de 1600. Com o crescimento da endemia, nos séculos seguintes se observou a adoção de medidas por parte das autoridades sanitárias, sendo mais evidente no período de 1912 a 1920, passando a ser reconhecida como um problema de saúde pública. Em 1904, pelo Regulamento Sanitário da União, implantado por Oswaldo Cruz, a hanseníase passou a fazer parte das doenças de notificação compulsória em todo território nacional. Em 1920, começou a construção de Leprosários para o isolamento dos doentes pelo Departamento Nacional de Saúde Pública, assemelhando-se às ações da Europa. O censo, criado em 1941 pelo Serviço

Nacional de Lepra, passou a fornecer informações mais detalhadas sobre a doença no País (Brasil, 1989). Em 1962, foi extinto oficialmente do Brasil o modelo de isolamento dos doentes, através do Decreto Federal nº 956. No entanto, esta medida foi considerada ineficaz, uma vez que alguns estados não respeitaram essa lei e continuaram a usar este modelo durante alguns anos. Na década de 1970, houve a mudança do nome “lepra” para “hanseníase”, medida defendida por estudiosos com a expectativa de diminuir o preconceito em relação à doença. Em 1976, na tentativa de acabar com esse estigma, o termo “lepra” foi abolido oficialmente no Brasil através da portaria nº 165/Bsb, de 14 de maio de 1976, passando então a se chamar hanseníase (Brasil, 1976). No entanto, o estigma da hanseníase continua existindo nos dias atuais, possivelmente devido ao isolamento de doentes nos séculos passados e a relação de impureza com a doença (Ura & Opromolla, 2000; Marzliak *et al.*, 2008).

Nesse sentido, o Mohan (Movimento de reintegração das pessoas atingidas pela hanseníase) vem apresentando um papel fundamental em relação a doença a partir da década de 1980. Foi fundado em 06 de junho de 1981, na cidade de Bauru/SP, por Bacurau, Cachoeira e Nélio Ribeiro (ver Linha do Tempo de Bacurau – Anexo I). Suas atividades são voltadas para a eliminação da hanseníase, através de atividades de conscientização e foco na construção de políticas públicas eficazes para a população. Tem um grande papel na luta pelos direitos dos hansenianos, como na: aprovação da Lei nº 2875/1984, que instituía pensão aos hansenianos que atuavam profissionalmente nas antigas colônias (1984); primeira campanha de massa na grande mídia sobre a hanseníase no Brasil (1987); conquista da promulgação da Lei nº 9010/1995, que dispõe sobre a proibição do uso do termo “lepra” em documentos oficiais (1995); mobilização de todos os seus núcleos no Brasil para a comemoração do dia Mundial do Hanseniano (1998), instituído como Dia Nacional de Combate e Prevenção da Hanseníase no Brasil pela Lei nº 12.135/2009; aprovação da Medida Provisória nº 373/2007, que institui a pensão vitalícia às pessoas atingidas pela hanseníase que viveram a internação compulsória no Brasil (2007); criação e publicação da Cartilha “Hanseníase e Direitos Humanos: Direitos e Deveres dos Usuários do SUS” (2008) (Vieira, 2009).

1.1.2. Causa e Transmissão da Doença

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular que apresenta tropismo por macrófagos da pele e células de Schwann dos nervos periféricos, afetando também as mucosas das vias aéreas superiores, os olhos, as vísceras, os linfonodos, a medula óssea, os testículos e os ovários (Coura, 2013). Mais recentemente, foi descrito por Han *et al.* (2008) que a doença também é causada pelo *Mycobacterium lepromatosis*, uma espécie que possui patogenicidade similar ao *M. leprae*. No entanto, parece causar um tipo específico da doença, a hanseníase lepromatosa difusa (DLL) (Avanzi, 2018; Benjak, 2018).

O *M. leprae* foi o primeiro patógeno bacteriano a ser associado a uma doença infecciosa humana, em 1847, quando foi descrito o acometimento dos nervos periféricos. A doença apresenta este nome devido à descrição do bacilo, em 1873, pelo cientista norueguês Gerhard Armauer Hansen (Coura, 2013).

Evidências epidemiológicas sugerem que a principal forma de transmissão da doença seja o contato direto entre pacientes multibacilares não-tratados e seus contatos intradomiciliares. Acredita-se que a principal via de eliminação de bacilos ocorra através das vias aéreas superiores (secreções nasais e gotículas da fala). No entanto, como o *M. leprae* pode sobreviver durante meses fora do corpo humano e em condições ambientais favoráveis, discute-se a participação de alguns reservatórios, e mais recentemente de vetores, na incidência da hanseníase. Alguns estudos sugerem que a doença pode ser uma zoonose em algumas regiões, como no Sul dos Estados Unidos. Essa hipótese foi levantada quando da identificação do *M. leprae* em espécies animais, como o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) (Loughry *et al.*, 2009; Truman *et al.*, 2011). Um estudo conduzido no Brasil, no estado do Ceará, apontou que muitos dos casos novos podem não estar ligados ao contato intradomiciliar, sugerindo a existência de fatores desconhecidos envolvidos na transmissão. Foi observado que pessoas que manipularam a carne de animais silvestres foram diagnosticadas com a doença, sem aparentemente nunca terem sido expostas aos pacientes ou áreas de transmissão da doença (Kerr-Pontes *et al.*, 2006). Mais recentemente, foi reportado nas ilhas britânicas esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) como possíveis reservatórios da hanseníase (*M. leprae* e *M. lepromatosis*) (Avanzi *et al.*, 2016). Alguns estudos também sugerem que reservatórios no ambiente poderiam participar como fonte de transmissão da

doença, o que foi apoiado através da detecção de *M. leprae* em amostras de água (Matsuoka *et al.*, 1999) e em amostras de solo de áreas endêmicas (Lavania *et al.*, 2008; Turankar *et al.*, 2014). Uma vertente também levanta a possibilidade da participação de artrópodes como vetores na cadeia de transmissão da hanseníase (Ferreira *et al.*, 2013). Nesse sentido, recentemente foi descrito por da Silva *et al.* (2016) que o barbeiro pode atuar como um possível vetor da doença, uma vez que o *M. leprae* permaneceu viável em seu trato digestório por mais de 20 dias após infecção. Embora necessite de estudos mais aprofundados, a existência de bacilos em animais selvagens que atuem como reservatórios ou vetores da doença teria sérias implicações para o programa de controle e erradicação da hanseníase em humanos (Magalhães & Rojas, 2007).

Alguns trabalhos discutem o papel do ambiente, da história de ocupação dos territórios (movimentos migratórios e processos de urbanização) e de condições desfavoráveis de vida (condições higiênicas, saneamento, pobreza e desnutrição), como fundamento para a distribuição espacial de muitas doenças infecciosas, como a hanseníase (Magalhães & Rojas, 2007; Sampaio *et al.*, 2013).

1.1.3. Biologia do *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* é um bacilo gram positivo intracelular obrigatório, de crescimento lento, que infecta preferencialmente macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos (Nath *et al.*, 2015). Apresenta a seguinte classificação filogenética: filo *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae*, subfamília *Mycobacteria*, gênero *Mycobacterium*, espécie *leprae* (Figura 1.1).

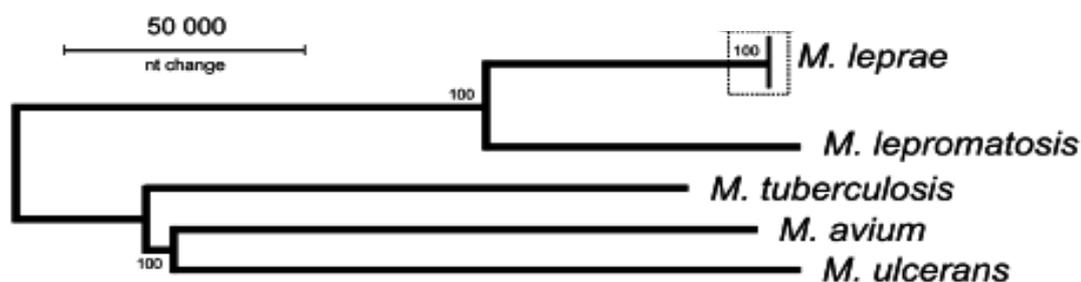


Figura 1.1: Classificação filogenética do *M. leprae* em relação a outras espécies do gênero *Mycobacterium*. Fonte: Adaptação de Singh *et al.*, 2015.

O genoma do *M. leprae* é altamente conservado e apresenta um total de 3,27 Mb. Ao longo da evolução, essa espécie sofreu reduções no seu genoma, resultando na perda de mais de 2000 genes envolvidos no metabolismo. Sugere-se

que a perda de genes ocorreu devido a uma evolução adaptativa do bacilo, que alterou sua forma de vida livre para o parasitismo intracelular (Cole *et al.*, 2001; Monot *et al.*, 2009). Apesar da evolução reductiva, a comparação entre diferentes cepas de *M. leprae* mostram que a variabilidade genética entre elas é baixa (Monot *et al.*, 2005). Nesse sentido, a comparação de amostras obtidas de corpos preservados com 800 a 1000 anos de idade sugere que o *M. leprae* praticamente não sofreu mudanças genéticas neste período, não havendo alteração nos genes de virulência do bacilo ao longo dos últimos séculos, indicando uma adaptação muito antiga ao ambiente intracelular humano (Schuenemann *et al.*, 2013; Avanzi, 2018).

Uma característica interessante do *M. leprae* é a presença elevada de pseudogenes, que ocupam mais da metade do genoma. Acredita-se que essa característica, associada a perda de genes, possa ser responsável pelo longo período de crescimento da bactéria (Singh & Cole, 2011).

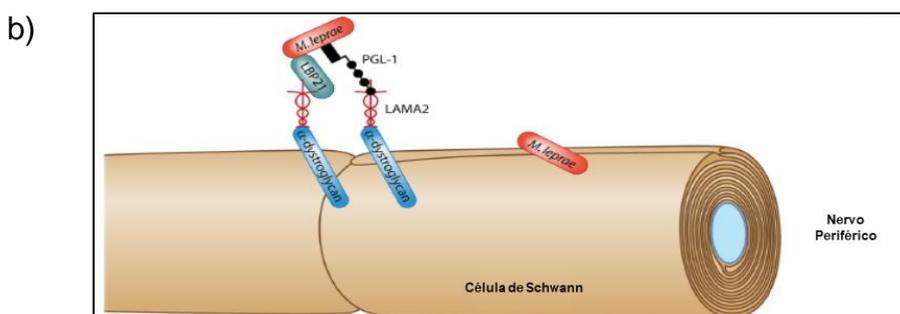
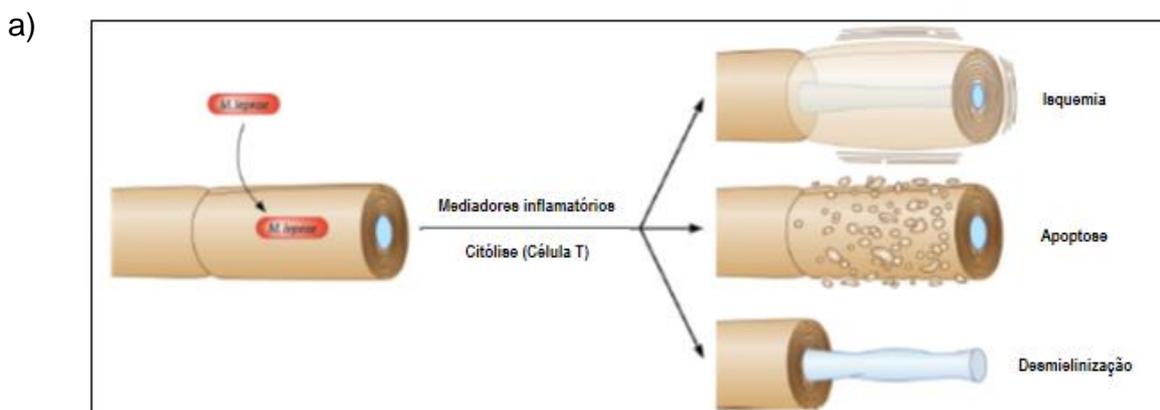
Em nível de comparação, o *M. tuberculosis* apresenta o genoma maior e cerca de 90% dos seus genes codificam para proteínas funcionais, enquanto no genoma do *M. leprae* apenas 49,5% contém genes funcionais (Cole *et al.*, 1998). Já a comparação entre as espécies *M. leprae* e o *M. lepromatosis* revelou que seus genomas são de tamanhos similares (3,27 Mb e 3,21 Mb, respectivamente), os genes codificadores de proteínas apresentam 93% de identidade e os pseudogenes 82% de identidade (Singh *et al.*, 2015). Apesar de terem acumulado novos pseudogenes e adquirido novas deleções ao longo da evolução, estas espécies se mantiveram capazes de causar a doença.

O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), patogênico, que tem preferência por temperaturas em torno de 33° C, sendo coletado normalmente na linfa de regiões frias do corpo humano (lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos). O *M. leprae* não cresce em meios de cultura axênicos *in vitro*, o que dificulta as investigações acerca da biologia da micobactéria (Avanzi, 2018). O modelo de infecção em camundongos constitui uma alternativa para o estudo da patogênese da hanseníase, permitindo o crescimento de bacilos viáveis para estudos estruturais e bioquímicos (Nogueira *et al.*, 1999). Outro modelo de infecção utilizado é o tatu, que tem sido proveitoso para o entendimento do dano neural provocado pelo *M. leprae* (Sharma *et al.*, 2013).

O patógeno possui envelope celular complexo e com estrutura rica em lipídeos, sendo formado por membrana celular e parede celular. A parede celular é composta majoritariamente por peptídeoglicanos e ácidos micólicos, além de uma cápsula rica

em PGL-1 (glicolípido fenólico 1), o qual lhe confere especificidade imunológica (Spencer *et al.*, 2011; Oldenburg & Demangel, 2017). Vale ressaltar que as proteínas do envelope celular possuem um papel essencial na patogênese do *M. leprae*. Um exemplo disso são as adesinas, que participam da interação do bacilo com as células epiteliais, endoteliais e com as células de Schwann (Pessolani *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2013).

O tropismo do *M. leprae* pelos nervos periféricos leva a perda de mielina e inflamação neural, o que pode gerar sequelas irreversíveis (Figura 1.2). No processo de infecção, o patógeno fixa-se à lâmina basal da célula de Schwann do nervo periférico. Neste processo, é sugerido que a LBP21 (Proteína 21 que liga a laminina), fração membrana do *M. leprae* (ML-LBP21), atue como ligante para a laminina e promova o processo de invasão da célula de Schwann pela micobactéria. Além disso, foi demonstrado que o PGL-1 é capaz de se ligar de forma específica a laminina- α 2 da lâmina basal. Durante a invasão, o complexo *M. leprae*-laminina- α 2 utiliza como receptor a α -distroglicana presente na superfície da célula de Schwann. Após a sua interiorização, o *M. leprae* tende a proliferar dentro das células de Schwann, que estão em contato com os axônios. Nesse sentido, a desmielinização pode ocorrer em algumas formas clínicas da hanseníase como uma manifestação tardia da doença (Rambukanna, 2001; Ottenhoff, 2002; Misch *et al.*, 2010).



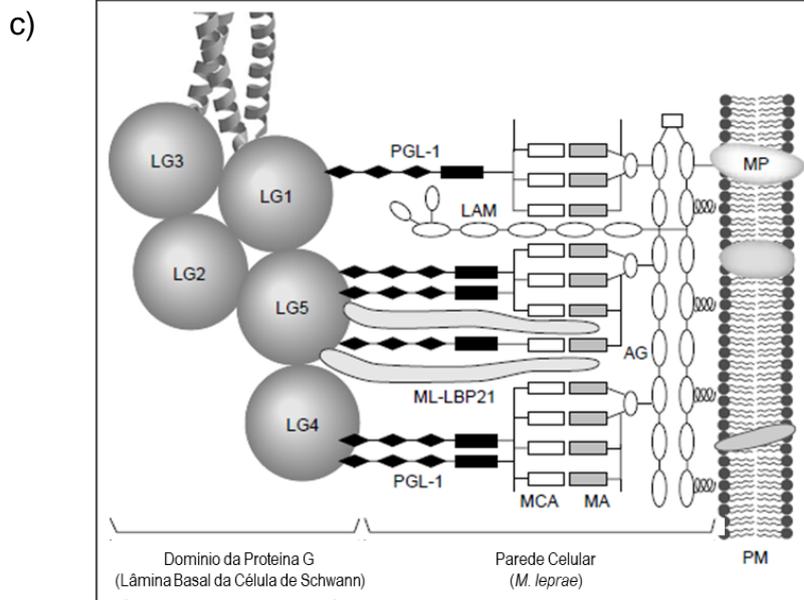


Figura 1.2: Interação do *M. leprae* com a célula de Schwann. a) A interação do *M. leprae* com a célula de Schwann leva a liberação de mediadores inflamatórios e a morte das células nervosas, possivelmente através de um mecanismo de isquemia e apoptose, que levaria a desmielinização do nervo periférico. b) O *M. leprae* interage com a célula de Schwann do nervo periférico através da LBP21 e do PGL-1 da parede celular da bactéria, que promovem a interação com a LAMA-2 e a α -dístroglicana da matriz extracelular da célula nervosa. Isto possibilitaria a entrada do patógeno e a posterior lesão no nervo periférico. c) Interação dos ligantes PGL-1 e ML-LBP21 do patógeno aos módulos α 2LG da proteína G (LG1–LG5), presentes na lâmina basal da célula de Schwann. A figura sugere que o PGL-1 é o principal ligante de interação patógeno-célula nervosa. Legenda: LBP21 (proteína 21 que liga à laminina), PGL-1 (glicolípido fenólico 1), LAMA-2 (laminina-2), LAM (lipoarabinomanana), AG (arabinogalactana), MCA (ácidos micocerósicos), MA (ácidos micólicos), PM (membrana plasmática), MP (proteínas de membrana). Fonte: Adaptação de Misch *et al.*, 2010 (a, b) e de Rambukkana, 2001 (c).

1.1.4. Relação Patógeno-Hospedeiro

As doenças infecciosas são caracterizadas como doenças complexas, na qual as características do patógeno, a genética do hospedeiro e o ambiente atuam de forma conjunta para o desfecho da infecção (Alter *et al.*, 2011). A interação entre esses fatores pode resultar no desenvolvimento de diferentes quadros clínicos (Chapman & Hill, 2012).

O espectro clínico da hanseníase confundiu profissionais de saúde e investigadores até a compreensão de que sua diversidade se baseava na habilidade do hospedeiro de desenvolver uma resposta imune celular ao *M. leprae*. É sugerido que a hanseníase seja influenciada pelo perfil genético do hospedeiro em pelo menos três estágios distintos: no controle da hanseníase *per se* (desenvolvimento ou não da doença), na definição das diferentes formas clínicas da doença (polo tuberculóide (TT), polo lepromatoso (LL) e formas intermediárias) e na ocorrência/gravidade dos episódios reacionais (Reação reversa (RR) e Eritema nodoso hansênico (ENH)) (Figura 1.3). Desse modo, a hanseníase tem sido utilizada

como “modelo humano” para o estudo dos mecanismos da resposta imune frente a micobactérias e patógenos intracelulares (Nóbrega Martínez, 2009).

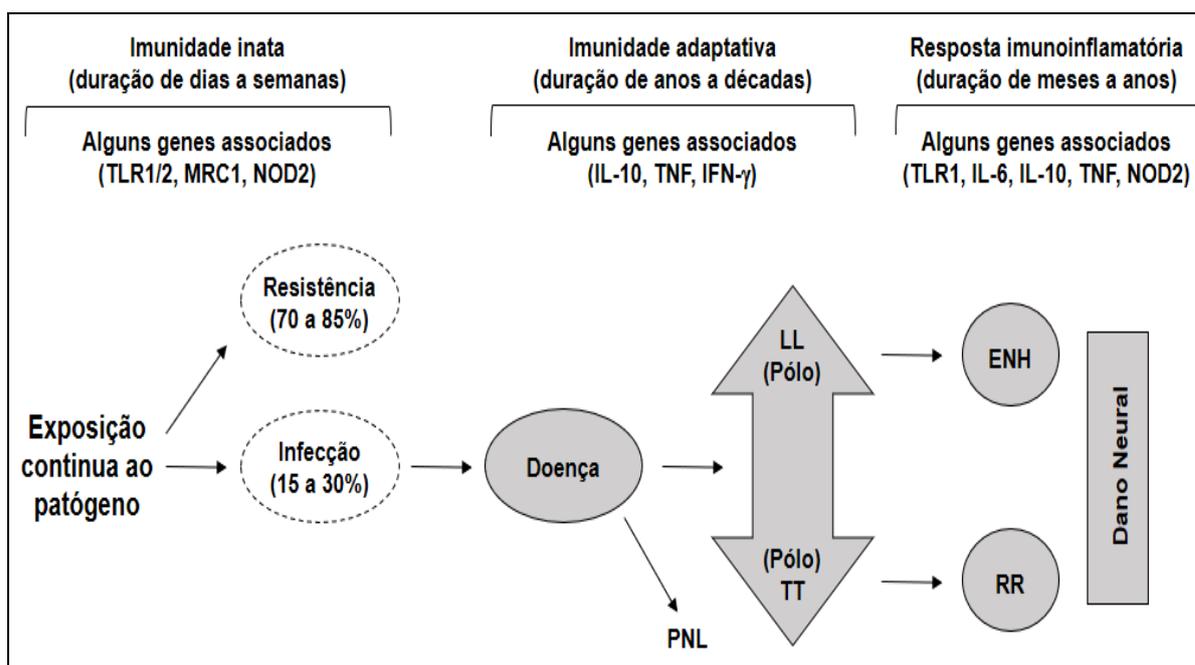


Figura 1.3: Influência genética no controle da hanseníase *per se*, na definição das diferentes formas clínicas da doença e na ocorrência/gravidade dos episódios reacionais. Fonte: Adaptação de Moraes *et al.*, 2006 e Cardoso *et al.*, 2011. Legenda: TLRs (Receptores do tipo-Toll), MRC1 (Receptor de manose C-tipo 1), NOD2 (Gene que codifica o receptor NOD2), ILs (Interleucinas), TNF (Fator de necrose tumoral), IFN- γ (Interferon-gama). LL (Polo lepromatoso), TT (Polo tuberculóide), ENH (Eritema Nodoso Hansênico), RR (Reação Reversa), PNL (Hanseníase neural pura).

Os mecanismos de resposta imunológica têm início com a interação entre o patógeno e os receptores na célula hospedeira. Esta interação inicial pode ocorrer via receptores associados com a adesão e entrada nos macrófagos/células de Schwann (MRC1 (receptor de manose C-tipo 1), laminina- α 2 e receptores do complemento) ou através dos receptores de reconhecimento e ativação da resposta imune (TLRs (Receptores do tipo-Toll) e receptor NOD2 (Gene que codifica o receptor NOD2)). Na hanseníase, demonstrou-se que TLR1 e TLR2 foram mais expressos em amostras de lesões provenientes de pacientes tuberculóides em relação aos pacientes lepromatosos, sugerindo que o dímero TLR1/TLR2 possa participar da contenção da infecção por *M. leprae* (Kruzick *et al.*, 2003). Além disso, também vêm sendo descritas rotas alternativas que participam da modulação da resposta microbicida. Nesse sentido, os microRNAs (miRNAs) vêm sendo caracterizados como reguladores-chave por toda a cascata de sinalização dos TLRs. Já foi demonstrado também que os miRNAs podem ser induzidos pela via dos TLRs, sendo candidatos como reguladores nas infecções micobacterianas (He *et al.*, 2014). O envolvimento do NOD2 na hanseníase, como abordado por Schenk *et al.* (2014),

parece estar relacionado a diferenciação de monócitos em células dendríticas através de um mecanismo dependente da IL-32, observado principalmente em lesões de pacientes tuberculóides para a doença.

Considerando ainda as vias de reconhecimento de patógenos, a via do IFN tipo I (IFN- α/β) vem sendo apontada como participante na resposta frente à micobactérias. Essa citocina é associada aos efeitos moduladores em infecções virais, mas estudos recentes vêm demonstrando a sua importância também em mecanismos de patogênese bacteriana (O'Connell *et al.*, 2004). Foi mostrado que a produção de IFN α/β resulta na inibição da via de diferenciação Th1 e na atividade do IFN- γ , regulando a ação microbicida da célula (de Paus *et al.*, 2013). Na hanseníase, foi demonstrado que IFN- γ é predominantemente expresso em lesões de pacientes tuberculóides, enquanto IFN- β é expresso principalmente em lesões de pacientes lepromatosos (Teles *et al.*, 2013). Desta forma, é sugerido que o *M. leprae* seja capaz de induzir a via IFN tipo I como um dos mecanismos necessários à sua sobrevivência, evadindo-se do sistema imunológico (de Toledo-Pinto *et al.*, 2016).

A célula dendrítica é uma das primeiras células a entrar em contato com o bacilo, sendo responsável pela indução da resposta celular frente a infecção por micobactérias (Demangel & Britton, 2000). A interação do patógeno com a célula dendrítica promove a ativação e regulação da resposta imune adaptativa, principalmente pela produção de IL-12, que estimula à ativação de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-1, IL-6 e TNF), contribuindo para a resolução da infecção. Dados da literatura mostram que o *M. leprae* é capaz de interferir na ação das células dendríticas, onde a infecção com o bacilo vivo levou a redução da expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), sugerindo que o bacilo seja capaz de suprimir a interação entre as células dendríticas e as células T (Hashimoto *et al.*, 2002). Foi mostrado também que o estímulo de células dendríticas com *M. leprae* vivo promove inibição da ativação e maturação, ao passo que estímulos com BCG e *M. tuberculosis* atuam como ativadores (Murray *et al.*, 2007). Esse comportamento da célula dendrítica ocorre possivelmente pela indução de IL-10 (Kumar *et al.*, 2013) e inibição de IL-12 (Demangel *et al.*, 2002).

Além disso, o *M. leprae* possui tropismo por macrófagos, o que torna esta célula um modelo interessante para a investigação das vias da interação patógeno-hospedeiro na hanseníase. Estudos apontam que a ativação de monócitos e macrófagos por micobactérias induz a fagocitose, seguida da ativação de vias efetoras que tentam resolver a infecção, tais como a fusão lisossomo/fagossomo

(fagolisossomo), com ação de enzimas lisossomais, a produção de óxido nítrico e de peptídeos antimicrobianos (Liu *et al.*, 2006). Estudos indicaram que, diante da infecção pelo patógeno, os macrófagos podem assumir uma programação predominantemente fagocítica em pacientes lepromatosos, pela indução de IL-10, ou uma programação altamente microbicida em pacientes tuberculóides, induzida pela citocina IL-15 (Montoya *et al.*, 2009). Recentemente, a IL-1 β também se mostrou capaz de induzir a diferenciação de macrófagos, aumentando sua capacidade fagocítica e possibilitando a apresentação de antígenos micobacterianos às células T (Schenk *et al.*, 2014).

Considerando que o *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório, sendo protegido da ação dos anticorpos, a resposta mediada por células no sistema imune adaptativo assume uma função central na resistência à doença. As células T reguladoras (Treg) regulam a resposta imunológica, possuindo um papel importante na resposta à antígenos próprios e infecções. O papel das células Treg no polo mais susceptível da doença (LL) vem sendo sugerido, comparadas às lesões TT/BT (Bobosha *et al.*, 2014). No entanto, a regulação imunológica da hanseníase mostra-se bastante complexa, onde o desfecho da infecção parece envolver o balanço entre um perfil celular microbicida (perfil Th1) e um perfil celular permissivo (perfil Th2) ao *M. leprae*, o qual ainda não está totalmente elucidado.

1.1.5. Resistência ou Susceptibilidade Genética à Hanseníase

A hanseníase foi a primeira doença multigênica a ser descrita na literatura, onde o componente genético do hospedeiro tem papel fundamental para o desfecho da doença. A incidência reduzida da hanseníase entre os indivíduos expostos ao *M. leprae* é um dos principais fatores que sugerem que a existência de variações genéticas do hospedeiro influencia na resistência à doença (apenas cerca de 0,1 a 1% dos indivíduos expostos adoecem). Estudos também demonstraram diferentes taxas de prevalência da doença em grupos étnicos distintos vivendo em uma mesma área endêmica (Moraes *et al.*, 2006; Alcais *et al.*, 2009). Além disso, a consanguinidade entre contatos e o paciente (caso índice), foi associada ao risco de adoecimento (Sales *et al.*, 2011). Nesse sentido, a busca por marcadores genéticos relacionados a esta susceptibilidade se faz necessária (Pereira, 2010).

Os principais estudos que permitem testar a contribuição dos genes na susceptibilidade a doenças infecciosas são os estudos de ligação e de associação

genética. Os marcadores genéticos frequentemente avaliados em estudos de associação são os polimorfismos de base única (SNPs), sequências repetitivas em tandem (VNTRs), microssatélites (STRs) e variação no número de cópias (CNV). Nesse sentido, os "tag SNPs" merecem destaque, uma vez que são mais informativos por representarem marcadores em blocos de desequilíbrio de ligação (LD), permitindo avaliar a associação dos demais SNPs do bloco, auxiliando no mapeamento de marcadores na região (Pacheco & Moraes, 2009). Mais recentemente, os estudos pangenômicos de associação (GWAS) têm permitido a identificação de genes supostamente não relacionados a doença (Marquet & Schurr, 2001). Contudo, embora estes estudos sejam poderosos, acabam gerando uma quantidade muito grande de dados, tornando complexa a análise e interpretação dos resultados (Prevedello & Mira, 2007; Pearson & Manolio, 2008). A associação genética do marcador com o desfecho da doença pode ainda ser avaliada através de estudos de replicação realizados em diferentes populações (Bezerra, 2015).

A relação entre a susceptibilidade genética à infecção pelo *M. leprae* e a resposta imune inata/adaptativa do hospedeiro é essencial para a compreensão da evolução da doença. Assim, a caracterização das principais vias envolvidas na manifestação da doença pode auxiliar no entendimento da imunopatogênese da hanseníase. Desta forma, alguns trabalhos vêm mostrando, em populações distintas, a importância de polimorfismos (SNPs) em genes associados à hanseníase, entre eles o *TNF*, *LTA*, *HLADRB1*, *IL10*, *VDR* e *PARK2/PACRG*, principalmente no que se refere ao controle da infecção e a manifestação das formas clínicas da doença (Cardoso *et al.*, 2011; Sauer *et al.*, 2015). Nesse sentido, estudos que avaliaram mutações nos genes *PKLR* e *OASL* tem merecido destaque.

Mutações no gene *PKLR* (piruvato-quinase de células vermelhas e do fígado), que resultam na deficiência da enzima piruvato-quinase (PK), provocam uma depleção de ATP nos eritrócitos, levando a anemia hemolítica (Jacobasch *et al.*, 1996; Zanella *et al.*, 2000). A deficiência da PK também tem sido fortemente associada com a resistência a malária. Esta relação foi evidenciada em estudos com camundongos, culturas *in vitro* e humanos (Min-Oo *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2007; Ayi *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2010). Além disso, estas mutações têm papel central no metabolismo de bactérias, plantas e vertebrados, uma vez que os seus produtos (piruvato e ATP) estão envolvidos em muitas vias metabólicas.

A análise de polimorfismos no gene *PKLR* surgiu a partir de trabalhos que estudaram a associação desse gene com a resistência e susceptibilidade a outras doenças infecciosas. Machado *et al.* (2010) realizou um rastreamento na região do *PKLR* e gerou uma lista de polimorfismos candidatos a serem estudados. Posteriormente, a associação do gene *PKLR* com proteção à tuberculose na população de Moçambique (Mabunda, 2013) e com a susceptibilidade à hanseníase na população brasileira (Lima-Bezerra, 2013) foi demonstrada por nosso grupo. Já foi visto na literatura que os polimorfismos nesse gene aparecem com frequências significativamente alteradas na população africana e na população europeia (Alves *et al.*, 2010). Sabe-se que o gene *PKLR* está sob pressão seletiva pelo patógeno da malária (*Plasmodium sp.*) na população africana, onde os marcadores que protegem contra malária foram selecionados. Estes marcadores de proteção, entretanto, foram também associados à susceptibilidade a patógenos intracelulares (Roy *et al.*, 2007). Dado que a população brasileira apresenta uma importante contribuição africana, é possível que a ocorrência destes marcadores de seleção na população africana esteja influenciando a associação com a hanseníase na população brasileira. Assim, para melhor investigar a associação deste gene com a doença, faz-se necessário replicar o estudo em outras populações brasileiras. Nesse sentido, nosso grupo está replicando o estudo caso-controle em populações de outras regiões brasileiras para avaliar a influência da ancestralidade na susceptibilidade/resistência à hanseníase.

Polimorfismos no gene *OASL* têm sido associados com infecções virais, parecendo favorecer a proliferação do vírus. Diferentes estudos demonstraram que o gene *OASL* é altamente induzido por diferentes tipos de infecções virais, como por vírus da hepatite C (HCV) (Ishibashi *et al.*, 2010), vírus da dengue (Warke *et al.*, 2003) e vírus Influenza A (Melchjorsen *et al.*, 2009). O gene *OASL* (2' 5' oligoadenilato sintetase-like) codifica a proteína oligoadenilato sintase. Esta proteína faz parte da família das oligoadenilato sintetases (OAS), uma família de proteínas conservadas evolutivamente induzidas por IFN tipo I. Su *et al.* (2008) identificaram polimorfismos (rs3213545, rs1169279 e rs2859398) no gene *OASL* associados com a resposta viral de pacientes em tratamento com IFN tipo I durante a infecção crônica por HCV. Existem evidências da regulação positiva da expressão gênica de *OASL* durante a infecção por *M. leprae*, onde altos níveis de expressão desse gene durante a infecção é capaz de regular negativamente a resposta protetora da célula hospedeira contra o patógeno, possibilitando sua replicação (Pinto, 2013). Trabalhos do nosso grupo vêm demonstrando que a via do IFN tipo I é a mais expressa na

infecção de células de Schwann pelo *M. leprae*, com destaque para a expressão do gene *OASL*. Nestes estudos, os genótipos GA e AA para esse SNP mostraram uma associação de resistência à hanseníase, onde indivíduos carreadores do alelo A (GA ou AA) produziram níveis menores de mRNA de *OASL* (Robottom-Ferreira, 2011; de Toledo-Pinto *et al.*, 2016).

Os resultados desses estudos podem levar ao melhor entendimento das bases moleculares que influenciam no desfecho da hanseníase e de outras doenças infecciosas (Prevedello & Mira, 2007).

1.1.6. Classificação, Sintomas e Diagnóstico Padrão da Doença

A doença é definida por formas clínicas distintas (classificação de Ridley & Jopling), apresentando um período de incubação variável (meses a anos), de acordo com a genética do indivíduo. Em um polo (forma lepromatosa) são evidenciadas muitas lesões ricas em bacilos e ausência de resposta imune celular. Neste caso, a resposta imune humoral (perfil Th2) é predominante, sendo ineficiente no controle do bacilo, que culmina em uma alta carga bacilar. Em outro polo (forma tuberculóide), ocorre uma resposta imune celular eficiente, poucas lesões e quase nenhum bacilo. Nesse polo há maior atividade da imunidade celular (perfil Th1), que induz a produção de citocinas (principalmente IL-2 e IFN- γ), que vão ativar as respostas microbidas. Com isso, o macrófago consegue conter a disseminação dos bacilos, resultando em uma baciloscopia baixa ou negativa (Fava *et al.*, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde (MS) classificam a hanseníase (classificação operacional) em duas formas: na forma paucibacilar (PB), que considera até cinco lesões de pele e / ou comprometimento de apenas um tronco nervoso; na forma multibacilar (MB), que considera mais de cinco lesões de pele e / ou mais de um tronco nervoso comprometido (Coura, 2013) (Figura 1.4).

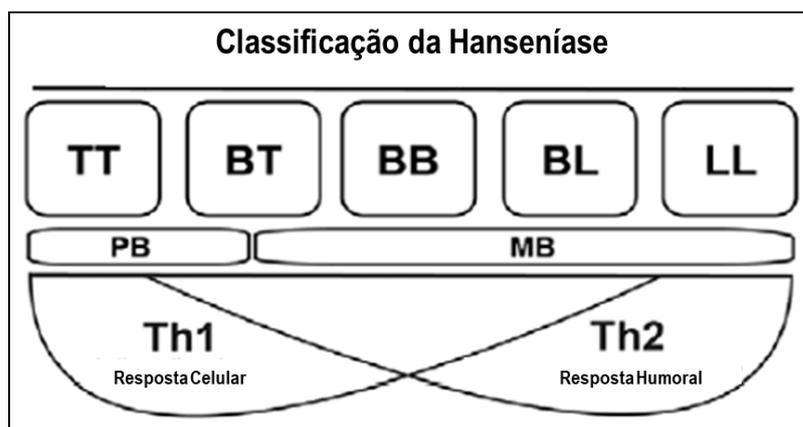


Figura 1.4: Classificação clínica da hanseníase (TT, BT, BB, BL, LL), proposta por Ridley & Joplin (1966), e classificação operacional da doença (PB e MB), proposta pela OMS (2001). Também é apresentado o perfil de citocinas de acordo com a polarização da doença (forma tuberculóide (perfil Th1); forma lepromatosa (perfil Th2)). Legenda: TT (tuberculóide-tuberculóide), BT (*borderline-tuberculóide*), BB (*borderline-borderline*), BL (*borderline-lepromatosa*), LL (lepromatosa-lepromatosa); PB (paucibacilar), MB (multibacilar); Th1 (T-helper 1), Th2 (T-helper 2). Fonte: Adaptação de Fava *et al.*, 2012.

As classificações mais usadas para a hanseníase são a de Madri (1953) e a de Ridley & Jopling (1966). A classificação de Madri leva em consideração a evolução natural da doença, sendo dividida em tuberculóide (forma restrita da doença), dimorfa (forma intermediária) e virchoviana (forma disseminada da doença), além de uma forma indeterminada (I). A classificação de Ridley & Jopling, por sua vez, considera a resistência do hospedeiro como critério para se classificar as formas da doença. Neste tipo de classificação, o exame histopatológico torna-se necessário para caracterização da doença, sendo classificada em forma tuberculóide (TT), *borderline* (subdivididas em *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatosa* (BL)) e lepromatosa (LL). Além disso, existe uma forma menos frequente e de difícil diagnóstico conhecida como hanseníase neural pura (PNL). Estabelecendo uma relação entre a classificação de Madri, a classificação de Ridley & Jopling e os critérios de classificação da OMS/MS, as formas tuberculóide (TT), *borderline-tuberculóide* (BT), hanseníase neural pura (PNL) e indeterminada (I), são consideradas paucibacilares (PB), sendo negativas para baciloscopia. Já as formas lepromatosa (LL), *borderline-lepromatosa* (BL) e *borderline-borderline* (BB), são consideradas multibacilares (MB), positivas para baciloscopia (Araújo, 2003; Martinez *et al.*, 2011; Coura, 2013).

Os episódios reacionais são processos inflamatórios exacerbados que podem acometer os pacientes durante qualquer estágio da doença (antes, durante ou após o término do tratamento) (Sauer *et al.*, 2015). As alterações imunológicas que levam

aos estados reacionais ainda não são completamente entendidas. No entanto, acredita-se que as formas polares (LL e TT) são mais estáveis, enquanto as formas intermediárias são mais propensas a desenvolver esses estágios (Nath, 2015). A reação tipo 1 (T1R) ou reação reversa (RR), é um quadro de inflamação aguda na pele e nos nervos, que ocorre principalmente em pacientes das formas *borderline*. Nesse episódio, há maior produção de citocinas Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF) e diminuição de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), evidenciando que a reação reversa parece estar associada a um aumento da imunidade celular direcionada a antígenos do *M. leprae* (Yamamura *et al.*, 1991). A reação tipo 2 (T2R) ou eritema nodoso hansênico (ENH), é um episódio crônico que ocorre com mais frequência em pacientes lepromatosos e *borderline*-lepromatosos. É caracterizada por lesões eritematosas e nódulos inflamados, acompanhados de sintomas sistêmicos (febre, prostração e dor). Muito provavelmente, os estágios reacionais possuem os mesmos mecanismos de controle molecular, uma vez que o perfil de citocinas liberado em ambos é similar (Moraes *et al.*, 1999; Scollard *et al.*, 2006a). As reações do tipo 1 e 2 ocorrem separadamente, mas podem progredir no mesmo paciente em momentos distintos (Kahawita *et al.*, 2008).

A recidiva é caracterizada como todos os casos de hanseníase, tratados regularmente com esquemas oficiais padronizados, que receberam alta por cura e que voltam a apresentar novos sinais e sintomas clínicos de doença infecciosa ativa (Brasil, 2016). Um parâmetro empregado para diferenciar recidiva de reação reversa é o tempo após o fim do tratamento. Sinais que aparecem até cinco anos após o término da poliquimioterapia são normalmente atribuídos à reação reversa, enquanto aqueles que aparecem após esse período são considerados recidiva. No entanto, já foram evidenciados casos de RR em pacientes com dez anos após o término do tratamento. O diagnóstico de recidiva é feito através do Índice Baciloscópico (IB) aumentado e da presença de bacilos viáveis, que pode ser confirmada mediante a inoculação em patas de camundongo. O diagnóstico de recidiva é mais difícil nos pacientes PB, pois seus sintomas se assemelham àqueles de RR. Alguns profissionais de saúde diferenciam recidiva de reação reversa baseados na velocidade do aparecimento dos sintomas, já que a recidiva se estabelece mais gradualmente. Porém, o diagnóstico se torna difícil porque os pacientes geralmente não sabem dizer se os sinais apareceram ou não de forma gradual. A diferenciação de recidiva e reação reversa tem importância terapêutica, uma vez que a recidiva é

tratada através da poliquimioterapia e a reação reversa com corticosteroides (Opromolla, 1994; Moura, 2014).

A hanseníase geralmente se manifesta pelos seguintes sintomas: sensação de formigamento, fisgadas ou dormência nas extremidades; manchas brancas ou avermelhadas, geralmente com perda de sensibilidade ao calor, frio, dor e toque; áreas da pele que apresentem alterações na sensibilidade e na secreção de suor; caroços e placas em qualquer região do corpo; diminuição da força muscular (Coura, 2013; Brasil, 2017).

O diagnóstico padrão da doença é realizado através de exames clínicos (dermatológico e neurológico), bacteriológicos (baciloscópico) e histopatológicos. Este diagnóstico se mostra muitas vezes impreciso e tardio, o que possibilita a evolução para a forma severa da doença. O diagnóstico clínico é realizado através da verificação de sinais periféricos como: manchas e lesões na pele, espessamento de nervos, perda de sensibilidade e força muscular. O exame clínico é acompanhado de uma avaliação do histórico familiar do indivíduo, visando verificar o contato com pacientes para a doença. O exame baciloscópico é realizado para identificar bacilos no esfregaço dérmico. Normalmente, são coletadas amostras dos lóbulos das orelhas, cotovelos e joelhos. Sempre que houver lesões suspeitas de hanseníase, recomenda-se coletar amostras da lesão para realização da baciloscopia (Brasil, 2017). Esse método permite a avaliação qualitativa e quantitativa dos bacilos após a coloração pelo método Ziehl-Neelsen (Cocito & Delville, 1985). Porém, algumas formas clínicas podem apresentar baciloscopia negativa e requerem a utilização de outros métodos para o diagnóstico. O exame histopatológico evidencia a morfologia do tecido a partir de biópsias de pele e nervos sensitivos de pacientes, permitindo a identificação de infiltrado mononuclear, epitélio granulomatoso e fibrose, características essenciais das lesões hansênicas (Antunes *et al.*, 2012). A histopatologia normalmente é realizada pelas colorações de hematoxilina-eosina e Fite-Faraco, que evidencia bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (Lastória & Abreu, 2012). Vários testes cutâneos de hipersensibilidade tardia ao *M. leprae* também foram testados como avaliadores da resposta imune celular à hanseníase. Entre eles, o melhor avaliado é o teste de Mitsuda, que usa o extrato bruto de *M. leprae* esterilizado por autoclave (Iepromina) (Brennan *et al.*, 1996).

1.1.7. Tratamento e Prevenção da Doença

Inicialmente, o tratamento da hanseníase era realizado com ervas medicinais e óleo de chaulmoogra, que não apresentavam uma eficácia relativa. Por volta da década de 1940, houve a descoberta da ação da sulfona sobre o bacilo de Hansen, uma droga revolucionária no tratamento da doença. Na década de 1960 surgiu a clofazimina e na década de 1970 a descoberta da rifampicina, medicamentos que trouxeram mudanças significativas na cura da doença. A OMS, em 1982, recomendou um novo esquema terapêutico para o tratamento da hanseníase chamado poliquimioterapia (PQT), composto pela rifampicina, dapsona e clofazimina. A associação dos três medicamentos levou a cura com maior rapidez, melhor adesão dos pacientes e diminuição da probabilidade do surgimento de resistência bacilar. Desta forma, o perfil epidemiológico da hanseníase se modificou, havendo uma redução drástica em sua prevalência (Brasil, 1989). No Brasil, desde 1991, é adotado o tratamento com a PQT, que contribuiu para a eliminação do bacilo e a redução na disseminação da doença (Monot *et al.*, 2009; Ministério da Saúde, 2009a).

Os regimes de tratamento utilizados são distintos para os pacientes paucibacilares e multibacilares. Para os casos paucibacilares, é utilizada a poliquimioterapia paucibacilar (PQT-PB) durante seis meses. No caso de pacientes multibacilares, é utilizada a poliquimioterapia multibacilar (PQT-MB) por 12 meses (Tabela 1.1). Para as crianças, os medicamentos são os mesmos, entretanto com dosagens reduzidas (Ministério da Saúde, 2009a).

Tabela 1.1: Esquema padrão de tratamento da hanseníase, de acordo com a classificação operacional da doença, proposta pela OMS (1982). Fonte: Ministério da Saúde, 2009a.

Classificação	Poliquimioterapia (Dose)	Tratamento
Paucibacilar	Rifampicina (600 mg mensal/supervisionada)	6 meses
	Dapsona (100 mg diária/auto administrada)	
Multibacilar	Rifampicina (600 mg mensal/supervisionada)	12 meses
	Dapsona (100 mg diária/auto administrada)	
	Clofazimina (300 mg mensal/supervisionada e 50 mg diária/auto administrada)	

Ao completar o tratamento com PQT, o paciente não deve mais ser considerado como um caso de hanseníase. Apesar da eficácia comprovada dos esquemas de PQT recomendados pela OMS, o paciente deve continuar sendo monitorado pelos profissionais da Unidade de Saúde, principalmente nos casos de reações, recidivas e dano neural (Ministério da Saúde, 2002). O seguimento pós-alta é fundamental nos casos reacionais, onde o monitoramento de nervos pode prevenir novas incapacidades. O tratamento dos episódios reacionais da hanseníase é realizado assim que o diagnóstico do tipo de reação seja determinado, sendo utilizada terapia anti-inflamatória que pode estar associada à PQT. Nos pacientes com reação tipo 1 (T1R), é utilizada a prednisona em doses diárias, enquanto para pacientes com reação tipo 2 (T2R) o tratamento é feito com Talidomida e/ou corticoides. Quando há comprometimento neural nas reações, são utilizados também esteroides. Já o tratamento da recidiva é realizado através da PQT (Ministério da Saúde, 2009a).

A vacinação com BCG (bacilo de Calmette-Guërin) protege as pessoas contra as formas mais graves da hanseníase. A vacinação BCG neonatal, utilizada para prevenir a tuberculose, tem apresentado potencial em reduzir a prevalência da hanseníase (Rodrigues & Lockwood, 2011). Uma segunda dose da vacina BCG em contatos de pacientes para a hanseníase parece conferir maior proteção, mesmo em contatos que já receberam BCG neonatal (Schuring *et al.*, 2009; Duppre *et al.*, 2012). Nesse sentido, um estudo testando uma vacina contra o desenvolvimento da forma lepromatosa da hanseníase se mostrou promissor, apresentando uma eficácia em 50-80% dos casos (Talwar *et al.*, 2005). Nos últimos anos, estão sendo testadas vacinas recombinantes mais modernas para o combate à hanseníase, mas ainda não foram liberadas para utilização junto à população (Reed *et al.*, 2013; Steinmann *et al.*, 2017). Além disso, vem sendo discutida pela OMS a utilização de uma dose única de Rifampicina como estratégia para prevenir a ocorrência de hanseníase em contatos intradomiciliares de pacientes recém-diagnosticados para a doença. Trabalhos vêm mostrando que a quimioprofilaxia com dose única de rifampicina reduz o risco de hanseníase em contatos de pacientes com a doença entre 50-60% após dois anos (Moet *et al.*, 2008; Reveiz *et al.*, 2009; Barth-Jaeggi *et al.*, 2016).

Mais recentemente, algumas medidas foram propostas por especialistas durante dois encontros internacionais sobre a Hanseníase realizados em 2013 e 2014 na Suíça, promovidos pela Fundação Novartis e pela OMS. Entre as propostas apresentadas nestes encontros, destacam-se: rastreamento de contatos, principalmente em grupos de risco, por meio de sistemas de vigilância efetivos para

acompanhar a evolução da doença; profilaxia pós-exposição (PEP), com o uso da dose única de rifampicina, de forma a não disseminar a doença; poliquimioterapia, para tratar os pacientes e evitar a transmissão da doença; teste para identificar a doença subclínica, que possa distinguir exposição e infecção pelo bacilo, de forma a possibilitar uma terapia precoce e apropriada (Smith & Aerts, 2014; Bahmanyar *et al.*, 2016; Steinmann *et al.*, 2017).

A atual estratégia global de combate à hanseníase se baseia em estratégias quinquenais anteriores (estratégia de esforço final para a eliminação da hanseníase (2000-2005), que se concentrou na poliquimioterapia e na detecção passiva de casos; estratégia global para aliviar a carga e manter as atividades de controle da doença (2006-2010), que consolidou os princípios de detecção e quimioterapia efetiva nos serviços integrados de combate à hanseníase; estratégia global aprimorada para redução adicional da carga da hanseníase (2011-2015), que aperfeiçoou ações conjuntas e aprimorou esforços globais para abordar os desafios enfrentados no controle da hanseníase, com uma ênfase na detecção precoce para reduzir incapacidades decorrentes da doença) e na estratégia global para hanseníase 2016-2020 (objetiva um “mundo livre de hanseníase”, sendo definida como a detecção precoce da hanseníase, além do tratamento imediato para evitar a incapacidade e reduzir a transmissão da infecção na população) (WHO, 2016a).

1.2. Prevalência da Hanseníase no Mundo e no Brasil

De acordo com Romero *et al.* (2012), a hanseníase é uma doença negligenciada que continua atingindo a população de países em desenvolvimento, demandando grandes esforços dos serviços de saúde.

A hanseníase, assim como a malária, a tuberculose e a dengue, faz parte da lista das doenças negligenciadas da OMS. Estas doenças estão normalmente associadas à situação de pobreza e aos problemas em saúde, contribuindo assim, com a desigualdade e a exclusão social (Carvalho, 2008). Segundo Camargo (2008), a presença destas doenças nos países tropicais ocorre devido à miséria dessas populações, à falta de saneamento básico e ao subdesenvolvimento. Esses países são desprovidos de infraestrutura e recursos para a saúde, favorecendo o aparecimento de doenças infecciosas e sua severidade, bem como o aumento da resistência aos antimicrobianos.

A hanseníase é considerada endêmica de países tropicais (prevalência maior que 10 casos / 100.000 habitantes), sendo que 80% dos casos novos concentram-se na Índia, Brasil e Indonésia, como pode ser observado no mapa abaixo (Figura 1.5).

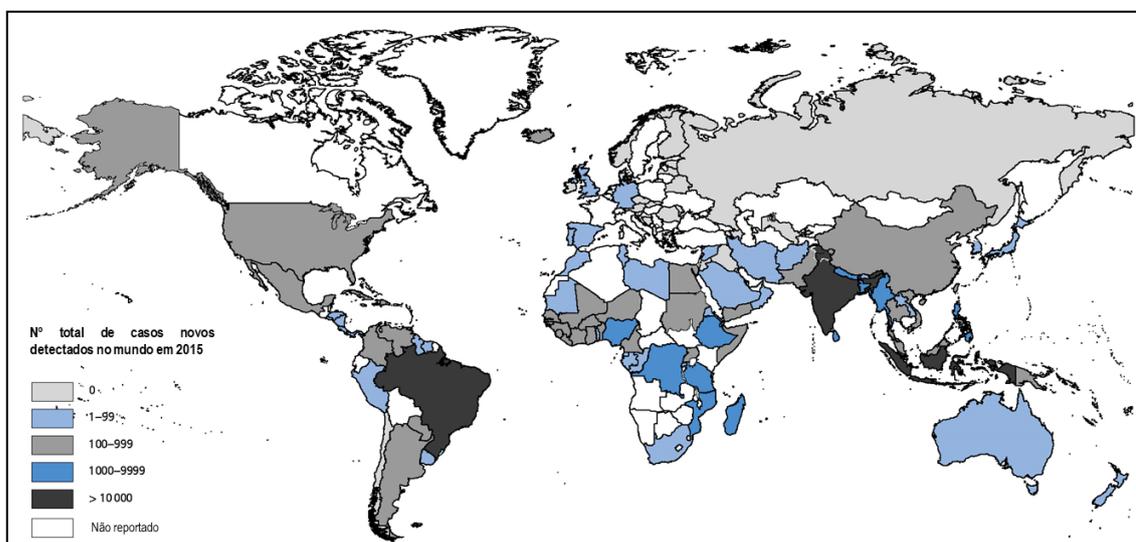


Figura 1.5: Mapa de distribuição de casos novos de hanseníase no mundo no ano de 2015. Fonte: Adaptação de WHO, 2016b.

Com a adoção de algumas estratégias, como a vacinação por BCG e a introdução de poliquimioterapia para a doença (1981), houve uma redução na prevalência global da hanseníase de 5,2 milhões, na década de 1980, para 200 mil, em 2014. No entanto, ainda são evidenciados de 220 a 250 mil casos novos de hanseníase todos os anos no mundo (Ura & Opromolla, 2000; Martinez *et al.*, 2011; Smith & Aerts, 2014).

Na 44ª Assembleia Mundial de Saúde (1991), foi proposto pela OMS, uma meta de eliminar a hanseníase como um problema de saúde pública até o ano 2000, diminuindo a prevalência para menos de 01 caso/10.000 habitantes. Essa meta foi atingida em nível mundial. Entretanto, alguns países, como o Brasil, não alcançaram a eliminação da doença até os dias atuais (WHO, 2002; 2016b).

O Brasil mantém, nas últimas décadas, a situação mais desfavorável na América e a posição de segundo lugar em número absoluto de casos do mundo, depois da Índia. No Brasil, a hanseníase é considerada um problema de Saúde Pública, cujo programa de eliminação está entre as ações prioritárias do Ministério de Saúde (Ura & Opromolla, 2000; Magalhães & Rojas, 2007; WHO, 2016a). Isso se torna ainda mais preocupante principalmente porque há muitos registros da doença em crianças e adolescentes menores de 15 anos (Ministério da Saúde, 2009b). Segundo o

Ministério da Saúde, em 2014 foram detectados quase 25 mil casos novos de hanseníase no país (taxa de detecção de 12,14/100.000 habitantes), dos quais 1.793 casos em menores de 15 anos. Desta forma, o Brasil foi o único país do mundo que não conseguiu eliminar a propagação da doença e que apresenta mais casos novos de hanseníase a cada ano (Dominguez, 2015).

A prevalência global da doença foi reduzida em mais de 68% em um período de 10 anos (4,52 casos/10.000 habitantes em 2003; 1,42 casos/10.000 habitantes em 2013). No entanto, em 2014 houve um aumento da prevalência da doença para 1,56 casos/10.000 habitantes, se distanciando do objetivo estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU) de eliminar a hanseníase até o final de 2015 (prevalência de 1,0 caso/10.000 habitantes).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016b), o número de novos casos de hanseníase no mundo em 2015 (211.973 casos/100.000 habitantes) se mostrou inferior em relação aos anos de 2013 (215.656 casos/100.000 habitantes) e 2014 (213.899 casos/100.000 habitantes), mas esta redução se mostrou ainda muito tímida.

A distribuição geográfica da doença no Brasil é estudada pela avaliação de regiões de maior incidência de hanseníase, onde os municípios de maior detecção no país são classificados em 10 áreas (*clusters*), como apresentado na Figura 1.6. Cerca de 44% dos casos novos identificados em 2013 foram nos estados de Mato Grosso, Pará, Maranhão, Tocantins, Goiás, Rondônia e Bahia (Abelha, 2014).

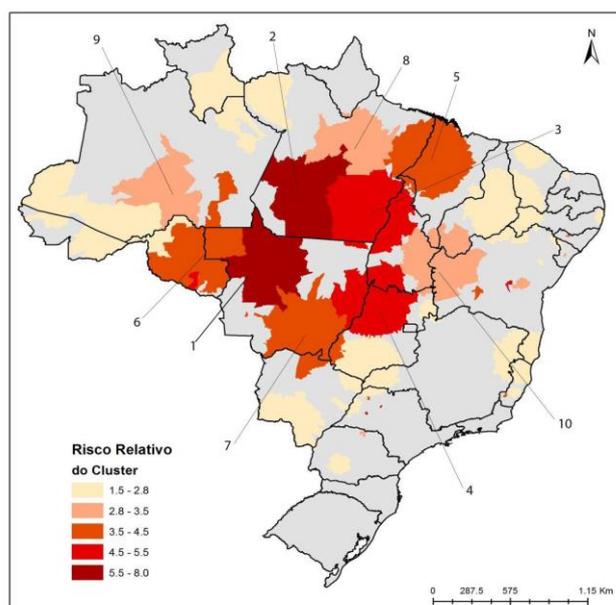


Figura 1.6: Áreas endêmicas (*clusters*) de hanseníase no Brasil (2011-2013). Fonte: Adaptação de WHO, 2013.

Apesar da taxa de incidência de hanseníase ser ligeiramente decrescente no país, a detecção nos estados das regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste ainda é alta quando comparada aos estados das regiões Sudeste e Sul (Figura 1.7).

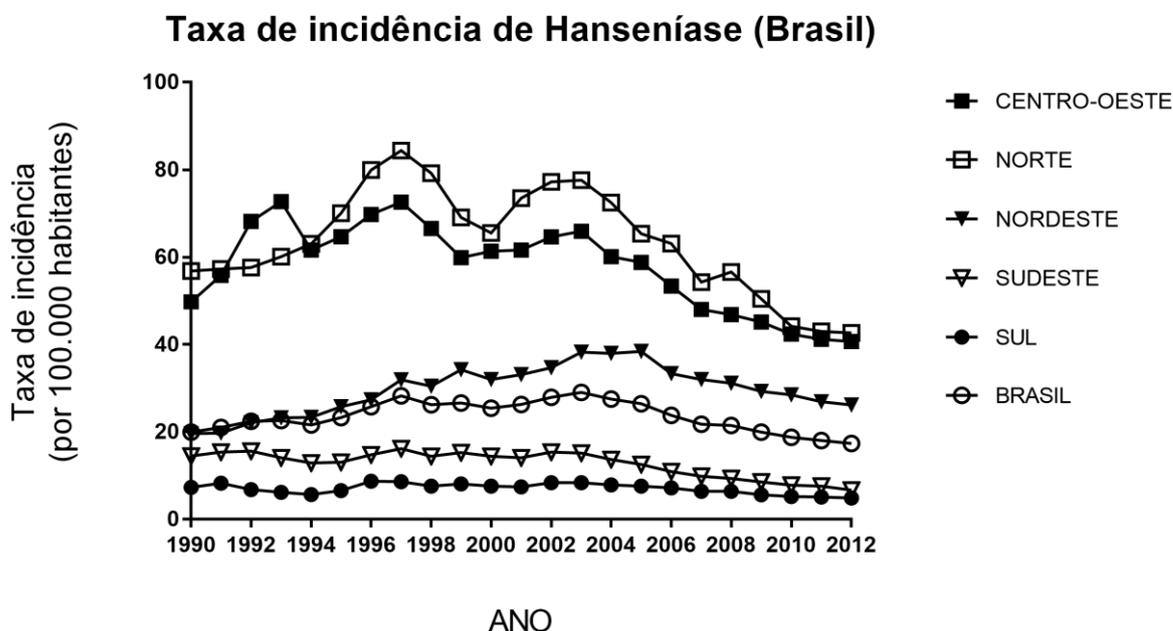


Figura 1.7: Taxa de incidência de hanseníase no Brasil, dividida por regiões (1990-2012). Fonte: SINAN NET, 2016. Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

1.3. A Hanseníase no Estado do Acre

O Acre localiza-se na região Norte do Brasil, sendo o 15º estado em extensão territorial, com uma superfície de 164.123,739 Km², correspondente a 4,26% da Região Norte e a 1,92% do território nacional. Tem os seus limites formados por fronteiras internacionais com o Peru (O) e a Bolívia (S) e por divisas estaduais com os estados do Amazonas (N) e de Rondônia (L). O estado do Acre possui 22 municípios, com a capital sediada em Rio Branco (Figura 1.8). Apresenta uma população de 816.687 habitantes, com uma densidade demográfica de 4,47 habitantes por Km². As suas cidades mais populosas são Rio Branco (377.057 habitantes) e Cruzeiro do Sul (82.075 habitantes), onde vive mais da metade da população (IBGE, 2017).

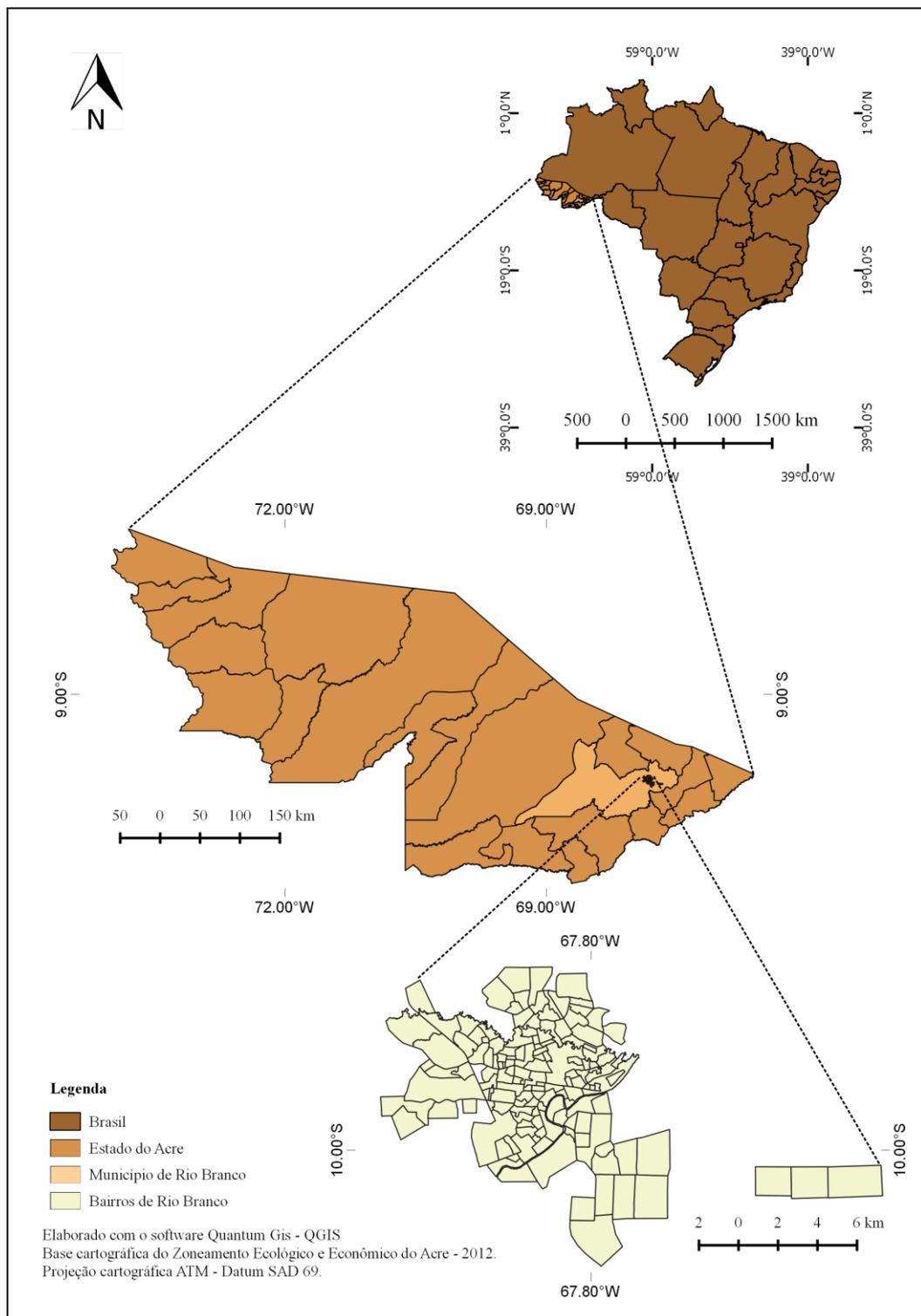


Figura 1.8: Mapa de localização do município de Rio Branco, no estado do Acre, Brasil. Fonte: Elaborado por Cleilton Sampaio de Farias (Docente IFAC) (2017).

O estado do Acre possui clima do tipo equatorial quente e úmido, caracterizado por altas temperaturas (máxima de 32°C), elevados índices de precipitação pluviométrica e alta umidade relativa do ar. O estado apresenta baixos indicadores socioeconômicos e a maioria dos municípios é dotada de infraestrutura e saneamento básico deficientes (87,7% de água tratada, 22,2% de rede de esgoto, 34% de fossa séptica e 67,1% de coleta de lixo). Apresenta população de baixa escolaridade (57,6% da população jovem não possui instrução ou possui o nível fundamental incompleto) e altas taxas de analfabetismo (PNUD, 2016).

A hanseníase se instalou no estado do Acre no início do século XX com as correntes migratórias do ciclo da borracha. Na década de 1990, áreas de elevada concentração de seringueiros atuando no extrativismo da borracha, como nos rios Juruá e Purus, apresentavam altos coeficientes de detecção (Silveira *et al.*, 2009). Nos dias atuais, a taxa de incidência de hanseníase no estado do Acre se mostra inferior à média dos estados da região Norte, mas ainda se apresenta superior à média nacional (Figura 1.9).

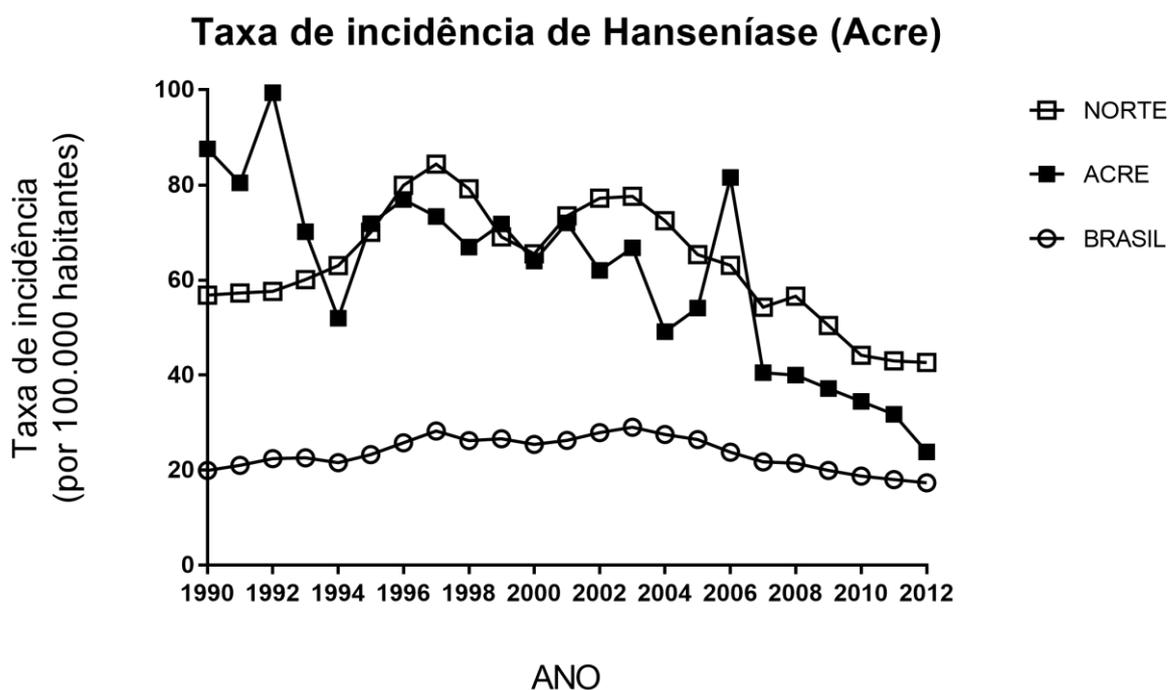


Figura 1.9: Taxa de incidência de hanseníase no Acre, em relação ao Brasil e a região Norte (1990-2012). Fonte: SINAN NET, 2016. Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

A distribuição espacial da doença, como observada na Figura 1.10, mostra que a maioria dos municípios do Acre apresenta alta endemicidade (muito alto ou hiperendêmico) para a hanseníase. No entanto, ainda que dos 23 municípios acreanos, 07 tenham sido considerados hiperendêmicos, apenas Xapuri e Acrelândia diagnosticaram mais de 10 casos novos em 2010. A capital Rio Branco apresentou uma taxa de incidência de 35,2 casos/100 mil habitantes em 2010, padrão muito alto de endemicidade. O estado do Acre apresentou em 2010 uma taxa de prevalência de 2,48 casos/10 mil habitantes, o que demanda ações para a eliminação da doença (Brasil, 2011).

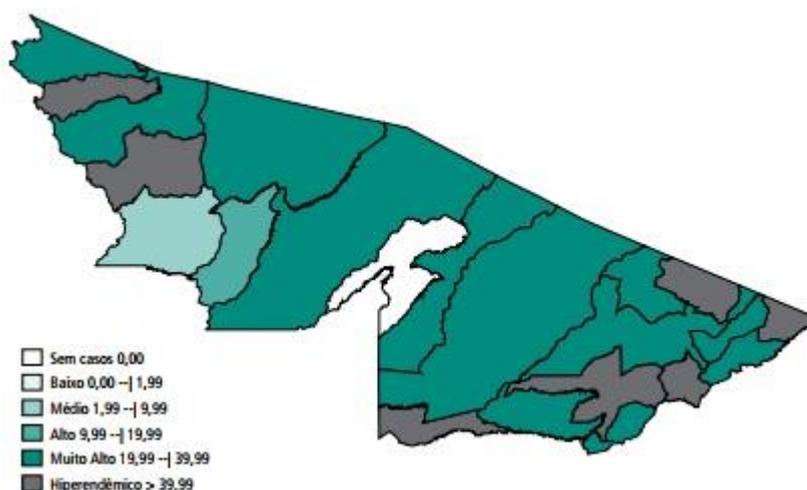


Figura 1.10: Taxa de incidência (por 100.000 habitantes) de hanseníase, por municípios do Acre, no ano de 2010. Fonte: Adaptação de SVS/MS (Brasil, 2011).

A análise dos coeficientes de detecção de hanseníase em menores de 15 anos no estado do Acre no ano de 2008, considerado um parâmetro fundamental de análise, demonstrou que vários municípios apresentam índices elevados de casos, entre eles o município de Rio Branco (“muito alto”) e de Cruzeiro do Sul (“hiperendêmico”) (Ministério da Saúde, 2009b). Dados de 2010 (Brasil, 2011), demonstram que o coeficiente geral de detecção (CGD) para os menores de 15 anos foi de 12,5 casos/100 mil habitantes, padrão de elevada magnitude.

Apesar de nos últimos anos ter sido observada a redução da prevalência da doença, ela não foi acompanhada de forma proporcional pela queda da taxa de detecção de casos novos. Isso demonstra que a prevalência, isoladamente, não é bom indicador para o controle da hanseníase e que a estratégia de eliminação não está sendo eficaz no bloqueio de transmissão da doença, o que colabora para a permanência da endemicidade no Brasil (Silveira *et al.*, 2009).

Nesse sentido, os registros de incidência e prevalência, bem como da avaliação de incapacidades, do percentual de cura e do exame de contatos mostram

fragilidades, o que pode representar um número subestimado de casos, sugerindo também a ocorrência de problemas na alimentação dos dados nos sistemas de informação. Assim, a resolução desses problemas faz-se necessária para que os indicadores reflitam com precisão os casos da doença e a realidade da assistência, isto porque apesar de a poliquimioterapia para a hanseníase ser altamente eficaz na cura da infecção, o tratamento dos danos neurais é muito difícil (Lockwood & Suneetha, 2005). Desta forma, como abordado por alguns autores (Moet *et al.* 2006; Araújo *et al.*, 2012; Hacker *et al.*, 2012; Smith & Aerts, 2014), a vigilância de contatos de pacientes com hanseníase, que representam uma população de alto risco para a manutenção da endemia, se faz crucial no sentido de contribuir para o diagnóstico precoce, tratamento e interrupção da cadeia de transmissão da doença.

1.4. Esforços Atuais na Pesquisa em Hanseníase

Os esforços atuais na pesquisa em hanseníase têm sido concentrados no desenvolvimento de ferramentas que possam auxiliar na identificação de potenciais casos novos.

Nesse sentido, de acordo com alguns trabalhos da literatura (Smith & Aerts, 2014; Bahmanyar *et al.*, 2016; Steinmann *et al.*, 2017), um cenário mais adequado em relação ao levantamento de casos novos e ao acompanhamento de pacientes/contatos, visando ao controle e a eliminação da doença, leva em consideração algumas estratégias: **rastreamento de contatos**, que pode ser realizado através da análise espacial dos municípios e bairros, fundamental para promover a identificação das regiões mais endêmicas, de forma que se possa fazer uma varredura nestes locais por meio da busca ativa de casos novos da doença; **uso de testes para identificação precoce da doença**, que pode utilizar estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos, que visem a triagem (testes rápidos) e o diagnóstico precoce (qPCR) de casos novos de hanseníase.

1.4.1. Análise Espacial da Hanseníase

A análise espacial em saúde apresenta várias aplicações, como o mapeamento de doenças (construção de mapas de indicadores epidemiológicos), estudos ecológicos (mensuramento da associação entre indicadores agregados) e detecção de aglomerados (identificação de áreas de maior incidência). Visa identificar um

padrão espacial, por meio de mapas de risco, relativos às unidades territoriais de análise, de forma a apontar as áreas de maior gravidade do problema e facilitar o planejamento de intervenções de Saúde Pública (Castro & Singer, 2007; Gauy *et al.*, 2007). Através da análise espacial é possível aprofundar a compreensão do processo, avaliar evidências de hipóteses a ele relacionadas e/ou prever valores em áreas onde as observações não estão disponíveis (Gatrell & Bailey, 1996; Santos & Barcelos, 2006; Alencar, 2011).

Nesse sentido, o Sistema de Informações Geográficas (SIG) vem sendo cada vez mais utilizado na área da saúde, possibilitando trabalhar com informações de diferentes origens e formatos. O crescente acesso aos computadores e aumento na disponibilidade de dados, são fatores que estão impulsionando a sua incorporação na Saúde Pública. Atualmente, existem programas com estrutura de SIG que têm distribuição gratuita e alguns possuem código aberto (*Open Source Software*), mas a aquisição de bases cartográficas ainda é um desafio em muitos lugares no Brasil (Santos & Souza, 2007). Diversos estudos vêm utilizando essa tecnologia na análise espacial de doenças negligenciadas, como malária (Hanafi-Bojd *et al.*, 2012; Qayum *et al.*, 2015), leishmaniose (Tsegaw *et al.*, 2013), esquistossomose (Chen *et al.*, 2015), tuberculose (Erazo *et al.*, 2014) e hanseníase (Amaral & Lana, 2008; Queiroz *et al.*, 2010; Barreto *et al.*, 2014). Esta ferramenta se mostra fundamental para a análise de doença negligenciadas, ainda mais para a hanseníase, onde a vigilância de contatos é essencial para a contenção da doença.

Entre as premissas associadas à distribuição espacial da hanseníase elencam-se: fatores socioeconômicos (Feenstra *et al.*, 2011; Cury *et al.*, 2012); relativos aos problemas nos serviços de saúde (Lanza, 2014); específicos do hospedeiro, como os determinantes imunológicos (Masaki *et al.*, 2014) e genéticos (Alter *et al.*, 2011). Alguns trabalhos da literatura abordando a análise espacial da hanseníase realizados em Bayeux/PB (Silva *et al.*, 2012), Duque de Caxias/RJ (Duarte-Cunha *et al.*, 2012), São José do Rio Preto/SP (Cury *et al.*, 2012), Vitória/ES (Sampaio *et al.*, 2013), Juazeiro/BA (Souza *et al.*, 2014) e Bahia (Souza & Rodrigues, 2015), vêm demonstrando que a análise espacial permite avaliar algumas variáveis, como a relação existente entre os fatores socioeconômicos e a incidência da doença.

Desta forma, a utilização da análise espacial para o levantamento de áreas endêmicas de doenças negligenciadas possibilita um direcionamento futuro para a ação dos serviços de saúde e deveria ser priorizada pelos órgãos competentes, principalmente em áreas onde este estudo ainda não foi realizado.

1.4.2. Diagnóstico Sorológico da Hanseníase

Apesar de alguns estudos demonstrarem que a implementação de testes sorológicos pode influenciar positivamente nos programas de controle da hanseníase (Duthie *et al.*, 2011; Lobato *et al.*, 2011; Cardoso *et al.*, 2013), essa ferramenta ainda não é utilizada rotineiramente pelos serviços de saúde (Fabri, 2015). Estudos apontam que os testes sorológicos permitem identificar indivíduos com alto risco de desenvolver a doença e indivíduos com infecção subclínica (Brasil, *et al.*, 2003; Buhner-Sekula *et al.*, 2003; Kampirapap, 2008; Araújo *et al.*, 2012).

Dentre eles, pode-se investigar a presença de antígenos específicos, como o PGL-1, encontrado em abundância na parede celular do *M. leprae*. Nesse sentido, inicialmente pesquisadores utilizaram ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, para a busca de anticorpos anti-PGL-1 em pacientes de hanseníase. Também foram utilizados Ensaios *Dipstick* para PGL-1, que apresentaram resultados similares ao ELISA (Buhner *et al.*, 1998). Estes testes apresentavam uma alta especificidade, mas baixa sensibilidade. Posteriormente, foi proposto um teste de fluxo lateral (*ML Flow Test*) para detecção do anticorpo IgM para PGL-1 do *M. leprae* (Buhner-Sekula *et al.*, 2003). Este teste rápido apresentou uma sensibilidade bem superior em relação as propostas avaliadas anteriormente e vem sendo utilizado em diversos trabalhos até hoje (Kampirapap, 2008; Duppre *et al.*, 2012; Fabri, 2015; Richardus *et al.*, 2017). Nos últimos anos, também têm sido utilizados testes rápidos baseados na detecção de LID-1 (proteína de fusão recombinante de ML0405 e ML2331), desenvolvido pelo Instituto de Pesquisa em Doenças Infeciosas (IDRI) (Stefani, 2008; de Souza *et al.*, 2014; Frade *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017). Recentemente, estudos vêm avaliando novas estratégias de detecção sorológica por meio de testes rápidos mais específicos e sensíveis para a hanseníase, como o PGL-1-IP-10 (*IFN- γ induced protein 10*) (Bobosha *et al.*, 2014) e o *Gold-LFA / UCP-LFA* (Hooij *et al.*, 2017).

Nesse sentido, a utilização de testes rápidos na vigilância epidemiológica pode ser útil desde a triagem inicial de doenças, por meio da identificação de casos assintomáticos, até a verificação da prevalência ou eliminação de doenças na população (Peeling *et al.*, 2006). Desta forma, no caso da hanseníase, poderia auxiliar na classificação operacional da doença (MB (soropositividade de 80 a 100%) ou PB (soropositividade em torno de 30%)) e no monitoramento do tratamento (os títulos de anticorpos caem de forma mais acentuada no início do tratamento e cerca de 25 a 50% anualmente) (Cho *et al.*, 2001; Buhner-Sekula *et al.*, 2007; Parkash,

2009). No entanto, é importante destacar que a redução nos níveis de anticorpos varia amplamente entre os pacientes, sendo que pode negativar rapidamente ou levar anos após o término do tratamento (Gelber *et al.*, 1989; Moura, 2014).

1.4.3. Diagnóstico Molecular da Hanseníase

Com o advento da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), várias metodologias foram descritas para a detecção do *M. leprae* em diversas amostras clínicas, onde diferentes sistemas de amplificação de ácidos nucleicos foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar o limite de detecção do patógeno (Nóbrega Martinez, 2009).

Muitos estudos foram realizados envolvendo diferentes sequências e genes alvos para a amplificação do DNA do *M. leprae* pela PCR, sendo a maioria deles a partir de amostras de biópsia de pele. Desta forma, sistemas simples e específicos foram utilizados para amplificar regiões gênicas que codificam para o antígeno de 36-kDa (Kampirapap *et al.*, 1998), 18-kDa (Scollard *et al.*, 1998) ou 65-kDa (Plikaytis *et al.*, 1990), bem como, para sequências repetitivas RLEP (Woods & Cole, 1989) do *M. leprae*. Com o surgimento da PCR em tempo real quantitativa (qPCR), foi possível uma maior sensibilidade e especificidade de detecção, possibilitando a utilização da ferramenta como suporte ao diagnóstico clínico da hanseníase.

A PCR vem contribuindo para a identificação de pacientes com formas de difícil detecção, como as formas neurais ou tuberculóides de lesão única, em que os bacilos dificilmente são encontrados (Jardim *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2006). Além disso, a especificidade e a sensibilidade de quatro diferentes ensaios de qPCR (RLEP, 16S rDNA, Ag 85B e *sodA*) para o diagnóstico diferencial da hanseníase foram testados em nosso laboratório, a partir da análise de material de raspado intradérmico auricular. Os resultados mostraram que o RLEP foi o mais sensível, enquanto o 16S rDNA, embora um pouco menos sensível, foi mais específico para a detecção da doença. Desta forma, o ensaio utilizando a sonda 16S rDNA consegue detectar em torno de 40% dos pacientes paucibacilares de difícil diagnóstico (baciloscopia negativa e poucas lesões) (Martinez *et al.*, 2011). Esta técnica permite a amplificação do genoma do bacilo em amostras de linfa, sangue, secreção nasal e biópsias, sendo importante em casos de difícil diagnóstico com histopatologia inconclusiva (Martinez *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2014).

Diante da impossibilidade de determinar a viabilidade do *M. leprae* a partir da detecção do DNA, pesquisadores começaram a voltar sua atenção para o RNA. A molécula de mRNA bacteriano tem, de um modo geral, uma meia-vida curta e é mais vulnerável à destruição do que as moléculas de RNA ribossômico (rRNA) ou DNA genômico. Desse modo, um sinal positivo de mRNA indica a presença de um organismo viável. Nesse contexto, a possibilidade de detecção de mRNA ou rRNA específico para antígenos secretados por *M. leprae* representaria um aumento da sensibilidade desse sistema, principalmente considerando o elevado número de cópias dessas moléculas na célula (Nóbrega Martinez, 2009).

Nesse sentido, a PCR em tempo real quantitativa (qPCR), devido a sua maior sensibilidade e especificidade em relação a outras técnicas, é uma ferramenta muito utilizada em diversos trabalhos atualmente (Azevedo *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2017; Braet *et al.*, 2018), sendo promissora na rotina do diagnóstico da hanseníase.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a utilização de estratégias baseadas em métodos epidemiológicos, sorológicos e moleculares que visem o diagnóstico precoce de casos novos de hanseníase.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a análise espacial da hanseníase no município de Rio Branco/AC, com o intuito de mapear os bairros quanto a taxa de detecção e a taxa de prevalência da doença.

- Avaliar o uso de testes rápidos de diagnóstico, baseados na sorologia para antígenos do *M. leprae* (NDO/LID-1 e PGL-1), para avaliar a soropositividade em pacientes e para a triagem da doença em contatos intradomiciliares.

- Avaliar o uso da técnica de qPCR, a partir da análise do gene-alvo 16S rDNA para o *M. leprae*, para a confirmação do diagnóstico de pacientes não-tratados e para o diagnóstico precoce da doença em contatos intradomiciliares.

- Estudar a influência de polimorfismos de base única (SNPs) associados à hanseníase, buscando compreender seu papel na susceptibilidade/resistência individual à doença.

3. METODOLOGIA

3.1. Autorização para Realização da Pesquisa

O presente projeto foi submetido na Plataforma Brasil, analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e aprovado (CEP-UFAC: Parecer nº 750.553; CEP-Fiocruz: Parecer nº 775.694; CEP-HC/Acre: Parecer nº 910.309), conforme pareceres constantes do Anexo II.

3.2. Desenho Experimental

A referida pesquisa foi realizada somente no Município de Rio Branco/Acre, devido a necessidade de um suporte técnico por parte de profissionais do Hospital das Clínicas do Estado do Acre (HC/Acre) para a coleta das amostras.

Após a aprovação do projeto pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs), o Centro de Referência de Hanseníase no Estado (Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas do Acre) foi contatado para levantamento de prontuários de pacientes e informações sobre seus contatos no período de realização da pesquisa, além do acompanhamento de casos novos.

A coleta das amostras foi realizada em pacientes e contatos (maiores que 15 anos) atendidos pelo Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas do Acre, após a concordância com a participação na referida pesquisa, mediante assinatura do TCLE (Apêndice I). Os indivíduos menores de 18 anos, participantes da pesquisa, tiveram o TCLE assinado por seu responsável. Por ser o Centro de Referência de Hanseníase no Estado, este setor recebe encaminhamento de pacientes do município de Rio Branco e de vários municípios do estado do Acre. Desta forma, todos estes pacientes e seus contatos foram incluídos na pesquisa. Como controles da pesquisa, foi utilizado um grupo de doadores saudáveis, residentes no município de Rio Branco, provenientes do banco de sangue do Hemoacre, mediante concordância através da assinatura do TCLE (Apêndice II).

O desenho experimental deste trabalho é apresentado na Figura 3.1. Para a análise molecular do DNA de *M. leprae* foi realizado um estudo transversal que compreendeu um grupo retrospectivo (pacientes cadastrados e contatos anteriores a 2016) e um grupo prospectivo (casos novos e contatos entre 2016-2017) de hanseníase. Para a análise da sorologia para o *M. leprae*, foram realizados os testes

rápidos NDO-LID (pacientes e contatos) e ML-Flow (PGL-1) (pacientes, contatos e controles). Na análise da genotipagem de polimorfismos foi realizado um estudo do tipo caso-controle (pacientes x doadores saudáveis). Além disso, foi realizada a avaliação epidemiológica espacial da hanseníase no município de Rio Branco/AC, onde foi utilizado um estudo descritivo populacional baseado no método quantitativo para a manipulação de dados secundários sobre a doença, realizado no período de 2006 a 2016.

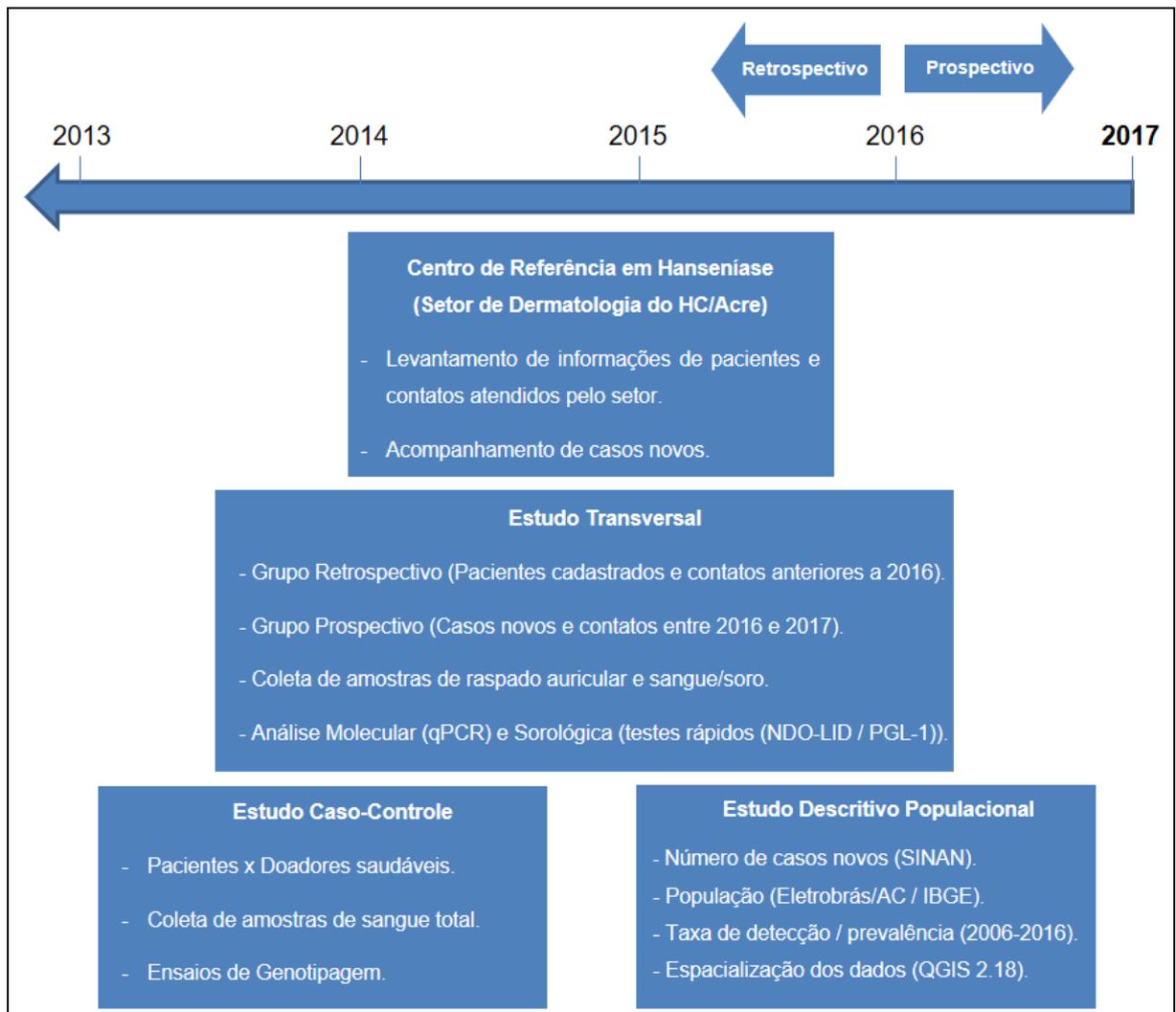


Figura 3.1: Desenho experimental do estudo.

A Figura 3.2 apresenta as análises experimentais realizadas no estudo (análise molecular (16S rDNA / genotipagem de SNPs) e análise sorológica (NDO-LID / PGL-1)), bem como seu local de execução.

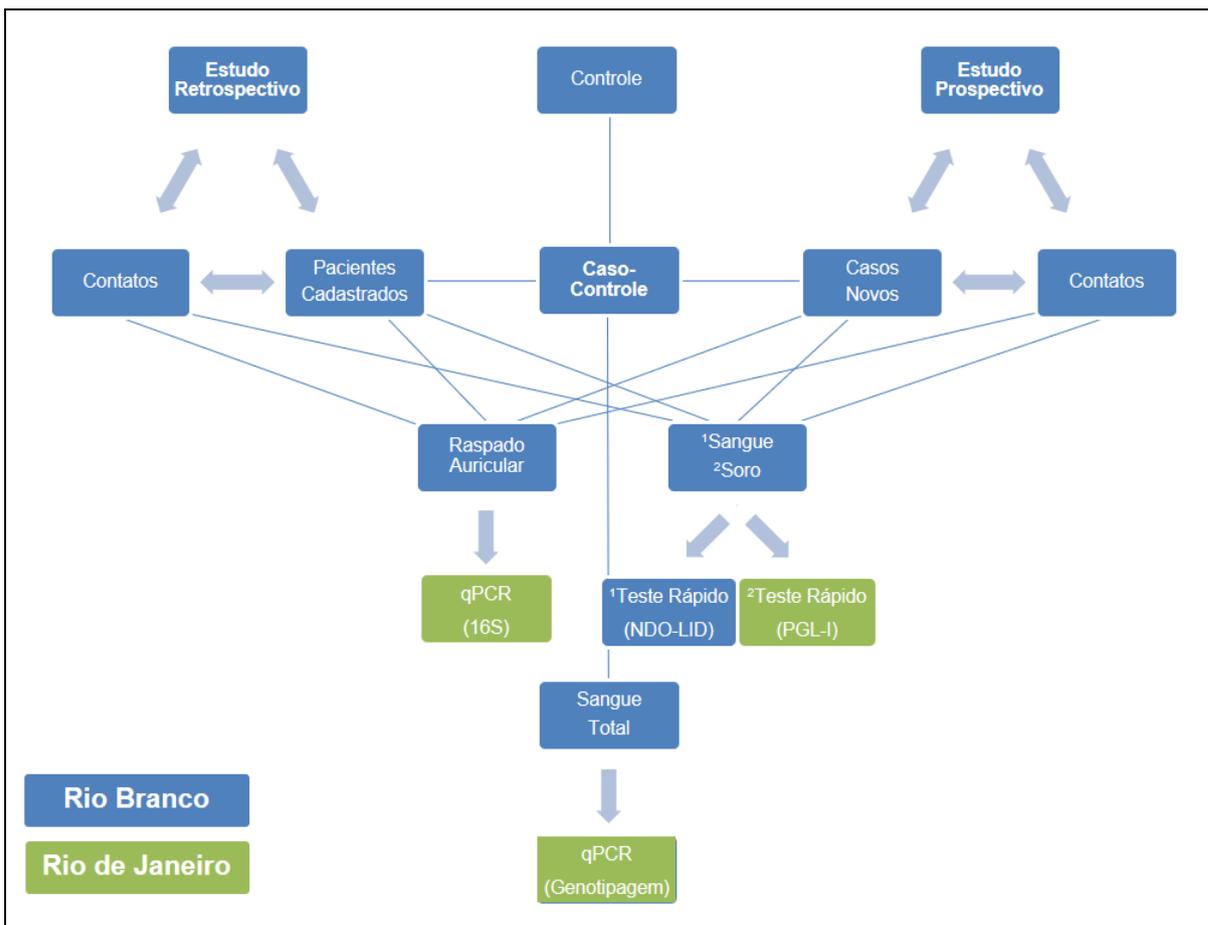


Figura 3.2: Análises experimentais realizadas no estudo.

3.3. Avaliação Epidemiológica e Espacial da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC

3.3.1. Avaliação Epidemiológica da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC

Para a avaliação epidemiológica da hanseníase no município de Rio Branco/AC foi utilizado o número de contatos registrados, contatos examinados e casos novos confirmados da doença ocorridos no período 2006-2016, bem como a classificação operacional (multibacilar ou paucibacilar) destes casos, obtidos junto à Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal, a partir de informações provenientes do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN NET). Os dados populacionais foram provenientes dos Censos 2000 e 2010, além de estimativas populacionais realizadas pelo IBGE no período intercensitário. A partir destes dados, foi possível calcular a taxa de detecção do município por ano (2006 a 2016), além da taxa de prevalência acumulada no período estudado.

A taxa de detecção foi representada pelo número de casos novos confirmados de hanseníase, por 10 mil habitantes, na população residente no município, no ano considerado ((casos novos anual/população total residente) x 10.000 habitantes). No Brasil, adota-se a seguinte classificação das taxas de detecção de casos por 10 mil habitantes (Brasil, 2005):

- Baixa (<0,2);
- Média (0,2 a 0,9);
- Alta (1,0 a 1,9);
- Muito alta (2,0 a 3,9);
- Hiperendêmica ($\geq 4,0$).

A prevalência, por sua vez, foi representada pelo número de casos confirmados de hanseníase, por 10 mil habitantes, existentes no município, no período considerado ((casos existentes no período/população total residente) x 10.000 habitantes). No Brasil, adota-se a seguinte classificação das taxas de prevalência de casos por 10 mil habitantes (Brasil, 2005):

- Baixa (<1);
- Média (1 a 4);
- Alta (5 a 9);
- Muito alta (10 a 19);
- Hiperendêmica (≥ 20).

A tabulação dos dados foi realizada com o *Software Microsoft Excel (Microsoft Office 365)*. Os gráficos foram elaborados com o *Software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.)*.

3.3.2. Análise Espacial da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC

Para a avaliação espacial da hanseníase no município de Rio Branco/AC foi utilizado o número de casos novos confirmados de hanseníase por bairro ocorridos no período 2006-2016, obtidos junto à Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal, a partir de informações provenientes do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN NET). Os dados populacionais por bairro foram

provenientes de estimativas realizadas a partir do número de unidades consumidoras registradas pela Eletrobrás/Acre no período, considerando a média de três moradores por domicílio, determinada pelo IBGE no Censo 2010. O município de Rio Branco/AC possui 143 bairros, sendo que destes 08 bairros não apresentavam as informações avaliadas, sendo desconsiderados neste estudo.

Devido ao baixo número de casos da doença por bairro/ano, foi utilizada a agregação trienal nos períodos 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016 para a avaliação do número de casos novos da doença e da taxa de detecção média. A taxa de prevalência acumulada foi avaliada no período 2006-2016. Os dados foram estratificados (divididos em classes) da seguinte forma:

- Casos novos (0, 1-5, 6-10, 11-15 ou 16-20).
- Taxa de detecção média (baixa ($<0,2$), média (0,2 a 0,9), alta (1,0 a 1,9), muito alta (2,0 a 3,9) ou hiperendêmica ($\geq 4,0$)).
- Taxa de prevalência acumulada (baixa (<1), média (1 a 4), alta (5 a 9), muito alta (10 a 19) ou hiperendêmica (≥ 20)).

Procedeu-se à exploração espacial da distribuição dos casos novos de hanseníase utilizando o modelo Bayesiano Empírico Local, possibilitando suavizar os efeitos da flutuação aleatória das taxas da doença resultantes do cálculo para áreas pequenas (Santos & Souza-Santos, 2007). Foram analisadas as correlações espaciais dos casos novos de hanseníase e da população de cada bairro, permitindo eliminar as flutuações aleatórias das taxas. No entanto, os bairros que não possuíam informações (número de casos novos e/ou população), foram considerados zero para fins de cálculo pelo método utilizado. Esse procedimento consistiu da estimativa de médias espaciais, tendo como critério de vizinhança a condição de proximidade entre os bairros. Para fins deste estudo, foi considerada a vizinhança de 4ª ordem (quatro bairros vizinhos mais próximos). Estas análises foram realizadas no *Software R* para Linux, versão 3.4.2 (R Development Core Team, 2017), utilizando os pacotes de funções “spdep” (Bivand & Piras, 2015), “rgdal” (Bivand *et al.*, 2017), “tidyverse” (Wickham, 2017).

A base cartográfica atualizada, em formato digital, foi disponibilizada pela Prefeitura Municipal de Rio Branco (Datum 32719 WGS 84 UTM zone 18S). Posteriormente, elaborou-se mapas temáticos coropléticos com a utilização de um *software* de espacialização de dados de código aberto, o *Quantum GIS 2.18.14* (*QGIS 2.18.14*).

3.4. Análise da Sorologia para LID-1 e/ou PGL-1 de *M. leprae*

3.4.1. Coleta e Processamento das Amostras

Neste estudo, para a análise da sorologia para o *M. leprae*, foram utilizados os testes rápidos NDO-LID e ML-Flow (PGL-1).

Os testes rápidos NDO-LID, obtidos junto à Empresa Orange Life, consistem de membranas de nitrocelulose impregnadas com ND-O-LID-1, um conjugado de ND-O (um dissacarídeo sintético mimético do PGL-1) e a proteína LID-1 (proteínas de fusão ML0304 e ML0331). Se baseiam na detecção de anticorpos (IgG e IgM) específicos para a hanseníase (PGL-1 e LID-1), onde são necessárias algumas gotas de sangue ou soro do grupo de estudo para realização do teste. Para realização dos testes rápidos NDO-LID, foram seguidas as instruções do fabricante, onde amostras de sangue total (cerca de 10 μ L) de pacientes e contatos foram coletadas por punção digital, com o auxílio de lancetas automáticas e capilares de vidro, e aplicadas no teste rápido juntamente com solução tampão (03 gotas).

Os testes rápidos ML-Flow (PGL-1), fabricados pelo Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), consistem de uma fita de nitrocelulose contendo o anticorpo anti-IgM humana marcado com ouro coloidal. Se baseiam na detecção de anticorpos (IgM) específicos para a hanseníase (PGL-1), onde a partir de amostras de soro, plasma ou sangue total é possível a realização do teste. Para realização dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1), foram seguidas as instruções do fabricante, onde foram coletadas amostras de sangue total (2,0 mL) de pacientes, contatos e controles, por punção venosa, em tubos de sangue *BD Vacutainer – Seco* (4,0 mL), as quais foram acondicionadas em freezer a -20°C até o momento do experimento. Posteriormente, as amostras de sangue foram descongeladas e centrifugadas a 735 x g, por 10 minutos, para separação do soro. O soro foi recolhido em microtubos de 1,5 mL e acondicionados

em freezer a -20°C até o momento do experimento. Para a realização do teste rápido, foram utilizados 5 μL de soro e 04 gotas (130 μL) de solução tamponante.

3.4.2. Análise das amostras

A leitura dos testes foi realizada visualmente, após vinte minutos, por dois pesquisadores de forma independente. Em caso de discordância entre os leitores, um terceiro pesquisador realizava a leitura do teste. Os testes foram considerados válidos quando houve coloração da linha controle (C). Os testes rápidos NDO-LID foram classificados, com base em seu manual e alguns trabalhos da literatura (Cardoso *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2014), por meio de um score (Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2), Positividade alta (+3)). Os testes rápidos ML-Flow (PGL-1) também foram classificados de acordo com seu manual e alguns trabalhos da literatura (Buhrer-Sekula *et al.*, 2003; Moura, 2014), por meio de um score (Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2), Positividade alta (+3), Positividade muito alta (+4)).

Os testes rápidos ML-Flow (PGL-1) dos pacientes multibacilares e paucibacilares, devido a presença do grupo controle no estudo, foram validados a partir do cálculo dos percentuais de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia, de acordo com a figura abaixo (Figura 3.3).

A tabulação dos dados foi realizada com o *Software Microsoft Excel (Microsoft Office 365)*. Os gráficos foram elaborados com o *Software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.)*.

		Doença		
		Presente	Ausente	
Teste	Positivo	Verdadeiro positivo a	Falso-positivo b	a + b
	Negativo	Falso-negativo c	Verdadeiro negativo d	c + d
		a + c	b + d	N(a+b+c+d)

Figura 3.3: Validação de testes rápidos (Sensibilidade: $a/(a+c)$; Especificidade: $d/(b+d)$; Valor preditivo positivo: $a/(a+b)$; Valor preditivo negativo: $d/(c+d)$; Acurácia: $(a+d)/N$). Fonte: Avaliação de Testes Diagnósticos (Disponível em: <https://posstrictosensu.iptsp.ufg.br/up/59/o/Modulo2-Avaliacaodetestesdiagnosticos.pdf>).

3.5. Análise Molecular do DNA de *M. leprae*

3.5.1. Coleta e Processamento das Amostras

Foram coletadas amostras de raspado intradérmico do lóbulo auricular (5 mm de extensão por 3 mm de profundidade) de pacientes e contatos, conforme recomendações do Ministério da Saúde (Brasil, 2010a). As amostras coletadas foram armazenadas em etanol absoluto e acondicionadas em freezer a -20°C até o momento do experimento.

A extração do DNA das amostras foi realizada através do *Kit DNeasy Blood and Tissue* (QIAGEN), a partir de uma adaptação das instruções do fabricante (Apêndice III). A avaliação da pureza e da concentração de DNA foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (*Thermo Scientific, USA*). Foi utilizado $1,0\ \mu\text{L}$ para realizar a avaliação da concentração de DNA das amostras. Considerou-se amostras com alto grau de pureza quando as razões de absorbância 260/280 apresentaram valores entre 1,8 e 2,0.

3.5.2. Análise das Amostras

O ensaio de qPCR foi padronizado com a utilização de *primers* específicos para amplificar sequências do gene 16S rDNA (*primer* AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG (posição 69–91 do gene 16S) e *primer* CAT CCT GCA CCG CAA AAA GCT T (posição 218–239 do gene 16S)) e utilizado para determinar o número relativo de bactérias, conforme estabelecido por nosso grupo (Martinez *et al.*, 2011).

A amplificação ocorreu em volume final de 25 μ L, contendo aproximadamente 50 ng de DNA genômico. O *Master Mix*, *primers* e sondas foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante (*Thermo Scientific, USA*) (12,5 μ L de *Taqman Universal PCR Master Mix (2X)*; 0,5 μ L de *Primer Forward 16 S*; 0,5 μ L de *Primer Reverse 16 S*; 0,5 μ L de Sonda 16 S). A reação foi programada para 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Tais análises foram realizadas no sistema de PCR em Tempo Real *StepOnePlus (Applied BioSystems, Carlsbad, CA, USA)* no Laboratório de Hanseníase (IOC/Fiocruz). O acúmulo de fluorescência foi analisado em *software* específico (*StepOne Software, Applied BioSystems*). Os valores de Ct e variação Rn obtidos foram analisados no pacote de programas estatísticos R (Ritz & Spiess, 2008; R Development Core Team, 2017). Além disso, foi construída uma curva-padrão, a partir da qual foi possível estimar o número de genomas do bacilo nas amostras de raspado intradérmico auricular analisadas.

A tabulação dos dados foi realizada com o *Software Microsoft Excel (Microsoft Office 365)*.

3.6. Genotipagem de Polimorfismos (SNPs)

3.6.1. Coleta e Processamento das Amostras

Para realização desta análise, devido ao tempo hábil para sua execução, o grupo de estudo foi selecionado através da técnica de amostragem por conveniência.

Desta forma, foram coletadas amostras de sangue (2,0 mL) de pacientes e doadores saudáveis, por punção venosa, em tubos de sangue *BD Vacutainer – EDTA K2* (4,0 mL) e acondicionadas em freezer a -20°C até o momento do experimento.

A extração do DNA das amostras foi realizada a partir de uma adaptação do Método *Salting Out* (Miller *et al.*, 1988) (Apêndice IV). Ao final do protocolo de extração, as amostras foram ressuspendidas em 50 µL de Tampão TE. A avaliação da pureza e da concentração de DNA foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (*Thermo Scientific, USA*). Foi utilizado 1,0 µL para realizar a avaliação da concentração de DNA das amostras. Considerou-se amostras com alto grau de pureza quando as razões de absorbância 260/280 apresentaram valores entre 1,8 e 2,0.

3.6.2. Análise das Amostras

A genotipagem dos SNPs ocorreu pelo sistema *TaqMan® SNP Genotyping Assay* (*Thermo Scientific, USA*) de discriminação alélica por PCR em Tempo Real, conforme descrito por nosso grupo (de Sales Marques *et al.*, 2013; Bezerra, 2015). Neste sistema, um par de *primers* amplifica a região onde se encontra o polimorfismo e a região polimórfica é detectada por sondas fluorescentes (VIC ou FAM). Os genótipos foram determinados em função da intensidade de cada fluorescência através da análise de um gráfico de discriminação alélica, conforme representado na Figura 3.4.

A amplificação ocorreu em volume final de 5,0 µL, contendo aproximadamente 40 ng de DNA genômico. O *Master Mix* e sondas foram utilizados seguindo as recomendações do fabricante (*Thermo Scientific, USA*). Os SNPs utilizados no estudo (*PKLR* (rs4620533, rs4971072, rs11264355) e *OASL* (rs3213545)), assim como a sua localização cromossômica, estão indicados na Tabela 3.1. A reação foi programada para 60°C por 30 segundos (Pré-PCR) e 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, finalizando a 60°C por 30 segundos (Pós-PCR). As corridas de PCR foram realizadas no sistema de PCR em Tempo Real *StepOnePlus* (*Applied BioSystems, Carlsbad, CA, USA*) no Laboratório de Hanseníase (IOC/Fiocruz) e a discriminação alélica foi visualizada em *software* específico (*StepOne Software, Applied BioSystems*).

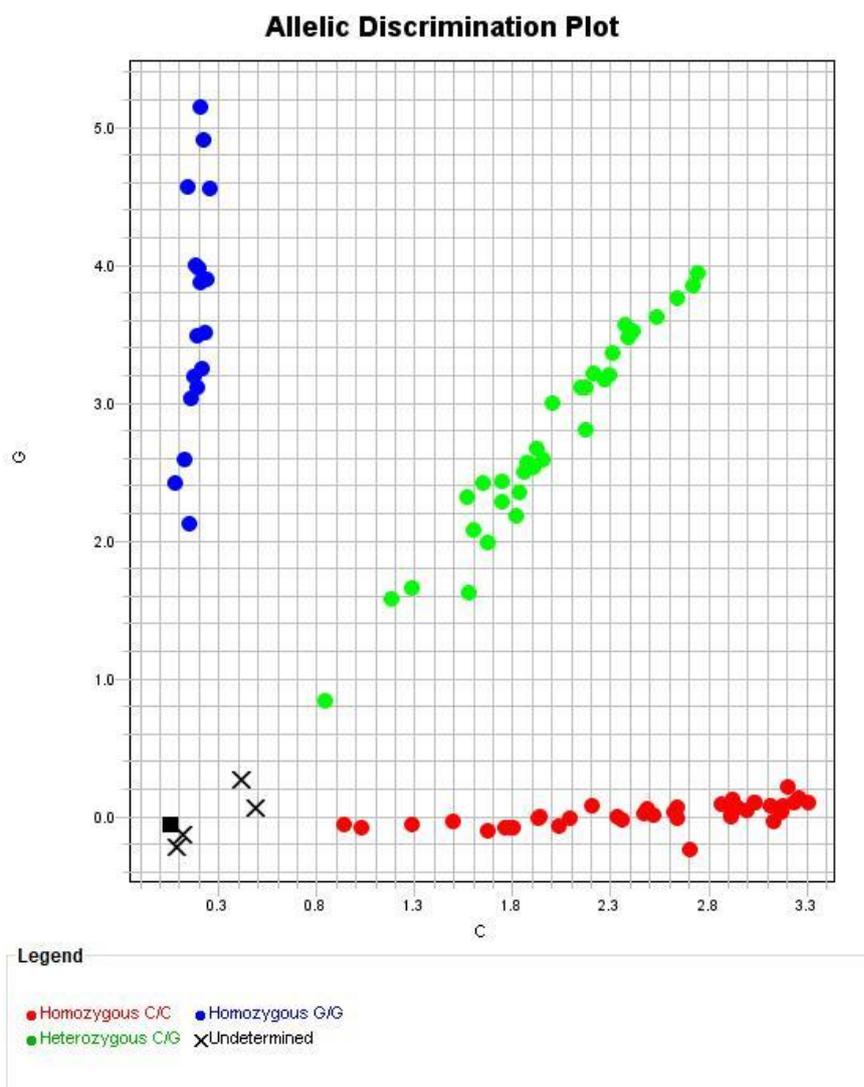


Figura 3.4: Representação do *plot* de discriminação alélica (*Software StepOne 2.1*). A caracterização dos genótipos é realizada em função da intensidade dos marcadores fluorescentes associados a cada alelo. Neste caso, o alelo G foi marcado com o fluoróforo FAM e o alelo C com o fluoróforo VIC. Legenda: Azul (amostras de homozigotos GG), Verde (amostras de heterozigotos CG) e Vermelho (amostras de homozigotos CC).

Tabela 3.1: Caracterização dos SNPs utilizados na genotipagem em PCR em Tempo Real.

SNP	Sequência nucleotídica flanqueadora e troca alélica	Localização
rs4620533	ACCTTGCTCCTGTTTCATGAGGAAAGA[C/G]AGCAGGCTAATAGAGCTACATTCT	Intron (155262613)
rs4971072	TGAGCAGGATCTTGTAAATGTGGTGG[A/G]TTTACCCAGGGGATGGACATGATCC	Intron (155273869)
rs11264355	CCCTCAACCCACCCATCCTGATA[C/G]TCTCATACTTTGATATCCAACAT	Intron (155257492)
rs3213545	TCCCCCTGGTCTGGATGGTGAAGAC[A/G]AGAGCATCGGGGACTCTCTGCTCCA	Intron (121033534)

As frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos em casos e controles foram testadas com o auxílio do teste X^2 (Qui-quadrado) e foram avaliadas segundo o Equilíbrio de Hardy-Weimberg (HWE). Em seguida, por se tratar de um estudo do tipo caso-controle pareado, as frequências alélicas, genóticas e de carreadores entre casos e controles foram calculadas segundo o modelo de regressão logística condicional, com ajuste para a co-variável sexo. A análise do estudo utilizou como medida de associação a *Odds ratio* (OR), com 95% de intervalo de confiança (IC) e o p valor menor que 0,05 ($p < 0,05$). A OR indica a razão entre a chance de exposição ao fator de risco/proteção em casos e controles. Na condição $OR=1$, a chance entre casos e controles é a mesma, portanto não há associação entre exposição e desfecho. Valores entre $0 < OR < 1$ indicam proteção, enquanto valores de $OR > 1$ indicam que a chance está aumentada em casos, caracterizando a exposição como fator de risco. Todas as análises foram realizadas no *Software R* para *Windows*, versão 3.1.1 (R Development Core Team, 2017), utilizando os pacotes de funções “genetics” e “coin”.

4. RESULTADOS

4.1. Epidemiologia da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC

Informações relevantes sobre a doença no período 2006-2016, levantadas junto à Vigilância Epidemiológica Municipal de Rio Branco/AC, foram apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Dados referentes à hanseníase levantados junto à Vigilância Epidemiológica Municipal de Rio Branco/AC. Fonte: SINAN NET, 2016.

Ano Diagnóstico	Contatos Registrados	Contatos Examinados	Casos Novos	MB	PB	População	T. Detecção	T. Prevalência
2006	743	40	195	92	103	314.127	6,21	
2007	471	394	129	63	66	290.639	4,44	
2008	514	456	123	68	55	301.398	4,08	
2009	388	201	104	65	39	305.954	3,40	
2010	470	305	126	71	55	336.038	3,75	
2011	384	295	116	69	47	342.299	3,39	29,76
2012	339	257	92	61	31	348.354	2,64	
2013	193	170	67	47	20	357.194	1,88	
2014	146	126	50	40	10	363.928	1,37	
2015	217	185	59	42	17	370.550	1,59	
2016	233	174	61	47	14	377.057	1,62	
Total	4098	2603	1122	665	457	-	-	

Inicialmente, constatou-se que houve 4098 contatos registrados, 2603 contatos examinados e 1122 casos novos de hanseníase no município de Rio Branco/AC no período de 2006 a 2016 (média de 102 casos/ano). Além disso, foi possível observar uma flutuação no número de contatos registrados e contatos examinados no período, com uma tendência de melhoria do exame de contatos (relação contatos registrados x contatos examinados) nos últimos anos, principalmente a partir do ano de 2013 (Tabela 4.1/Figura 4.1).

Dados sobre a Hanseníase (2006-2016)

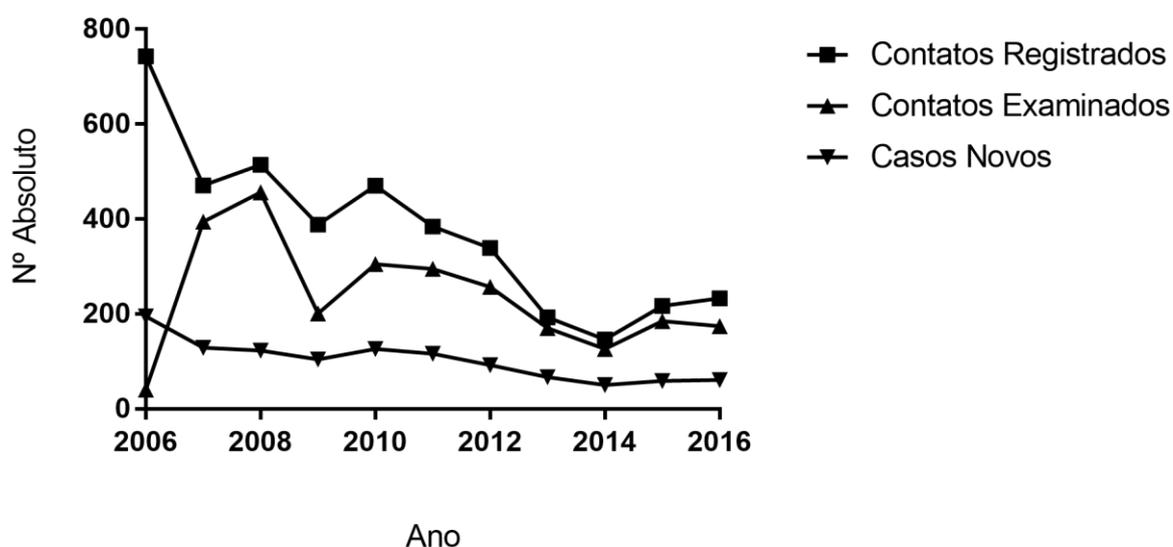


Figura 4.1: Número de contatos registrados, contatos examinados e casos novos da doença no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016. Fonte: SINAN NET, 2016. Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

Entre os 1122 casos novos de hanseníase no período de 2006 a 2016, 457 pacientes foram classificados como Paucibacilares e 665 pacientes classificados como Multibacilares. Estes dados foram apresentados na Tabela 4.1/Figura 4.2, onde foi possível observar uma redução no número de casos novos da doença no período estudado (de 195 casos novos em 2006 para 61 casos novos em 2016), com uma aparente estabilidade nos últimos anos (a partir de 2013).

Casos Novos de Hanseníase (2006-2016)

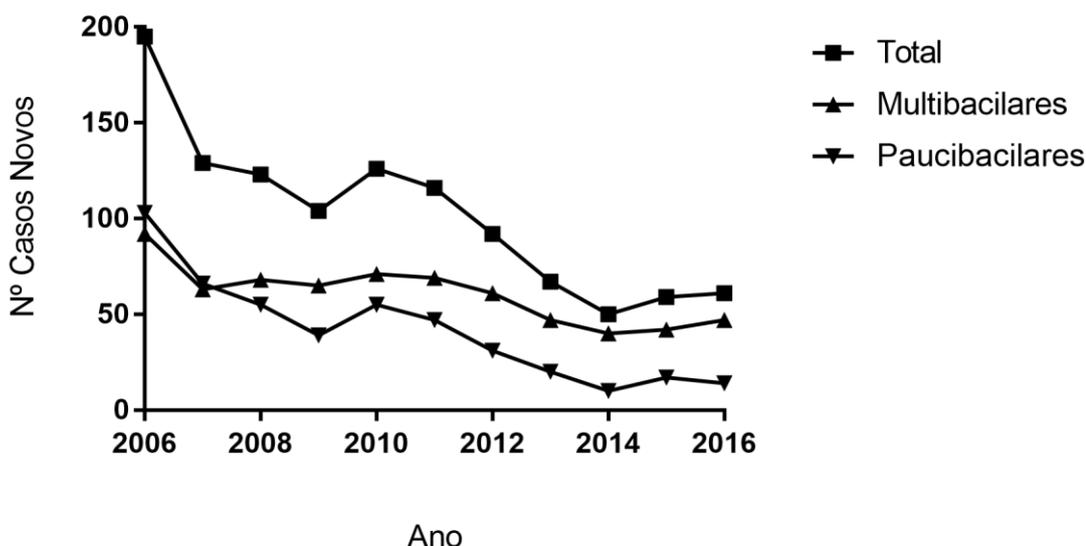


Figura 4.2: Casos novos da doença no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016, classificados em Paucibacilar ou Multibacilar. Fonte: SINAN NET, 2016. Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

Além disso, foi possível calcular a taxa de detecção por ano e a taxa de prevalência no período (Tabela 4.1). A taxa de detecção apresentou uma queda no período estudado (Figura 4.3), mas ainda se mostrava alta no ano de 2016 (1,62/10.000 habitantes). A taxa de prevalência acumulada (29,76/10.000 habitantes) no período 2006-2016 se apresentou ainda mais crítica, sendo classificada como hiperendêmica.

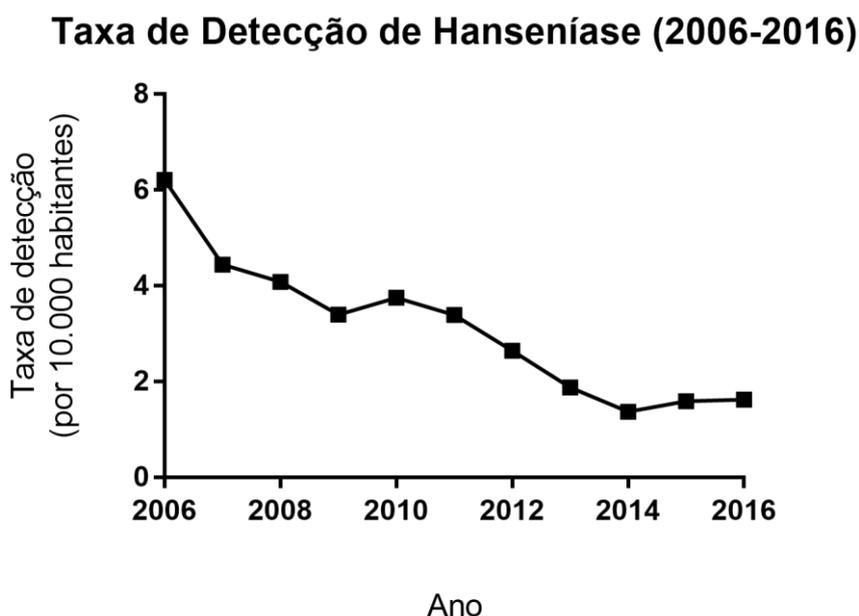


Figura 4.3: Taxa de detecção de hanseníase no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016. Fonte: SINAN NET, 2016. Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

4.2. Análise Espacial da Hanseníase no Município de Rio Branco/AC

Inicialmente os bairros do município de Rio Branco foram divididos em regionais, de acordo com o Decreto Municipal nº 674, de 27 de maio de 2014, para fins de identificação. No entanto, os bairros Albert Sampaio, Dom Moacir e Santa Cecília, formados a partir de pacientes curados que estiveram internados na Casa de Acolhida Souza Araújo, não estavam incluídos em nenhuma regional. Desta forma, foi criada uma nova regional com estes bairros, chamada Souza Araújo (Figura 4.4).

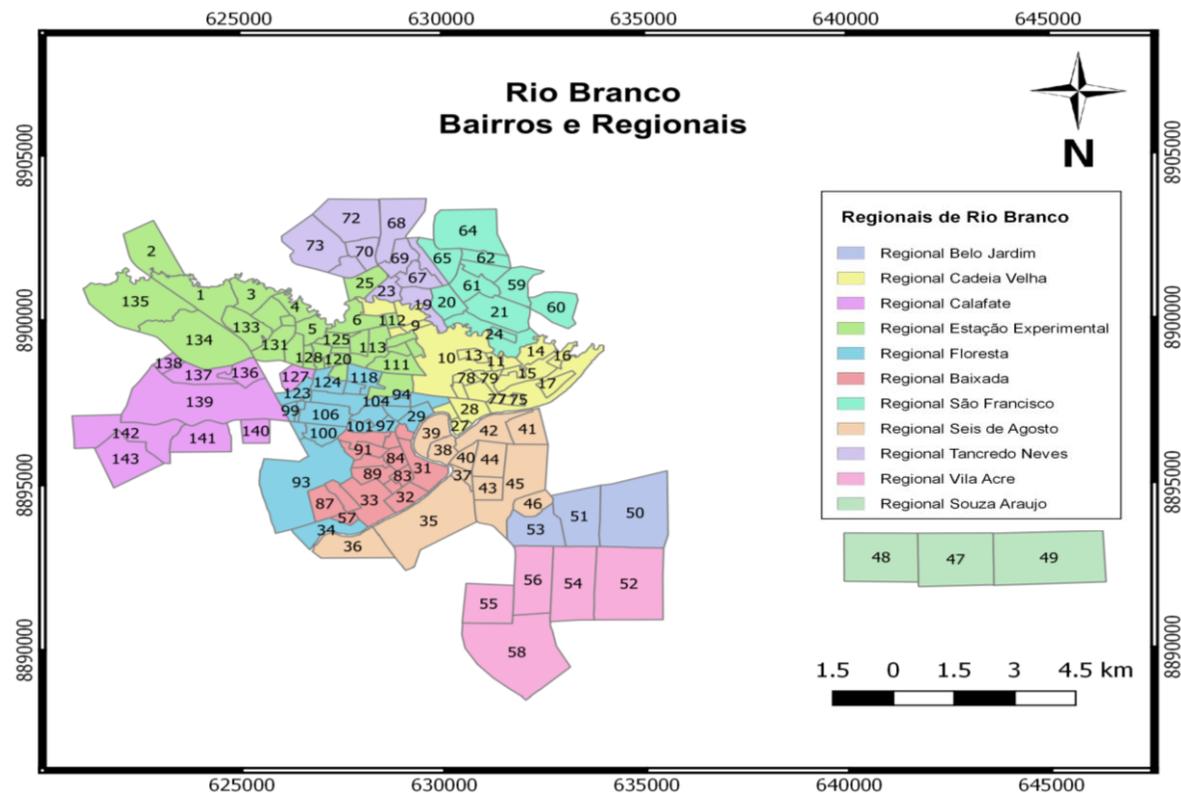


Figura 4.4: Divisão dos bairros do município de Rio Branco/AC por regionais. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Mapa: Elaborado com o *Software QGIS* (2.18.14).

Legenda dos bairros: 1- Distrito Industrial, 2- Loteamento Vila Maria, 3- Mocinha Magalhães, 4- Loteamento Joafra, 5- Paz, 6- Conquista, 7- Horto Florestal, 8- Vila Ivonete/PROCOM/SOLAR, 9- Loteamento São José, 10- Bosque, 11- Baixa da Colina, 12- Casa Nova, 13- Conjunto Guimard Santos, 14- Conjunto Jardim Tropical, 15- Morada do Sol, 16- Adalberto Aragão, 17- Cadeia Velha, 18- Baixa da Cadeia Velha, 19- Raimundo Melo, 20- Placas, 21- Vitória, 22- Conjunto Oscar Passos, 23- Vila Nova, 24- São Francisco, 25- Loteamento Novo Horizonte, 26- Papoco, 27- Base, 28- Centro, 29- Preventório, 30- Volta Seca, 31- Aeroporto Velho, 32- Ayrton Senna, 33- Sobral, 34- Invasão da Sanacre, 35- Taquari, 36- Loteamento Praia do Amapá, 37- Triângulo Novo, 38- Quinze, 39- Cidade Nova, 40- Triângulo Velho, 41- Santa Terezinha, 42- Seis de Agosto, 43- Comara, 44- Vila do DNER, 45- Areial, 46- Mauri Sérgio, 47- Vila Alberto Sampaio, 48- Vila Santa Cecília, 49- Dom Moacir, 50- Belo Jardim II, 51- Belo Jardim I, 52- Residencial Rosa Linda, 53- Santa Inês, 54- Loteamento Santo Afonso, 55- Vila da Amizade, 56- Loteamento Santa Helena, 57- Boa Vista, 58- Vila Acre, 59- Eldorado, 60- Loteamento Jardim São Francisco, 61- Chico Mendes, 62- Loteamento Jaguar, 63- Conjunto Ouricuri, 64- Loteamento Santa Luzia, 65- Parque dos Sabiás, 66- Conjunto Xavier Maia, 67- Wanderley Dantas, 68- Alto Alegre, 69- Conjunto Adalberto Sena, 70- Tancredo Neves, 71- Defesa Civil, 72- Montanhês, 73- Jorge Lavocat, 74- Conjunto São Francisco, 75- Baixa da Habitasa, 76- Habitasa, 77- Cerâmica, 78- José Augusto, 79- Aviário, 80- Ipase, 81- Capoeira, 82- V.W. Maciel, 83- Glória, 84- Pista, 85- Boa União, 86- Palheral, 87- Plácido de Castro, 88- Bahia Velha, 89- Bahia Nova, 90- João Paulo II, 91- João Eduardo II, 92- João Eduardo I, 93- Floresta Sul, 94- Jardim Nazle, 95- Dom Giocondo, 96- Abraão Alab, 97- Conjunto Castelo Branco, 98- Ivete Vargas, 99- Nova Esperança (fragmento), 100- Mauro Bittar - LBA - Vila Betel, 101- Novo Horizonte, 102- Conjunto Habitar Brasil, 103- Residencial José Furtado, 104- Mascarenhas de Moraes, 105- 7º BEC, 106- Nova Esperança, 107- Conjunto Bela Vista, 108- Jardim América, 109- Jardim Manoel Julião, 110- Boa Esperança, 111- Isaura Parente, 112- Santa Quitéria, 113- Nova Estação, 114- Conjunto Manoel Julião, 115- Residencial Iolanda, 116- Conjunto Esperança, 117- Doca Furtado, 118- Estação Experimental, 119- Conjunto Tangará, 120- Loteamento Isaura Parente, 121- Loteamento dos Engenheiros, 122- Conjunto Paulo C. de Oliveira, 123- Jardim Europa, 124- Flor de Maio, 125- Geraldo Fleming, 126- Parque das Palmeiras, 127- Jardim de Alah, 128- Residencial Petrópolis, 129- Conjunto Mariana, 130- Jardim Brasil, 131- Jardim Primavera, 132- Conjunto Rui Lino, 133- Conjunto Tucumã, 134- Campus da Universidade Federal do Acre, 135- Conjunto Universitário, 136- Pedro Roseno, 137- Chácara Ipê, 138- Conjunto Jardim Universitário, 139- Portal da Amazônia, 140- Village Tiradentes, 141- Waldemar Maciel, 142- Calafate, 143- Conjunto Laélia Alcântara.

A partir de informações sobre o número de casos novos de hanseníase e a população por bairros do município de Rio Branco/AC, no período 2006-2016, foi possível construir mapas com os casos novos da doença e as taxas de detecção média nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016, além das taxas de prevalência no período 2006-2016. As análises sobre a doença foram realizadas individualmente por bairros.

A análise espacial do número de casos novos de hanseníase demonstrou que a maioria dos bairros do município de Rio Branco/AC apresentou casos da doença no período avaliado, com predomínio de 1 a 5 casos da doença nos bairros (Figura 4.5). Além disso, foi possível observar que houve uma redução no número de casos novos de hanseníase e do número de bairros com casos novos da doença no triênio 2014-2016, em relação aos triênios 2006-2008 e 2010-2012. No entanto, alguns bairros, como Calafate (nº 142), Tancredo Neves (nº 70) e Vitória (nº 21), apresentaram um número de casos novos elevados no período analisado, mantendo-se alto (6 a 10 casos novos) no triênio 2014-2016. É importante destacar que estes bairros possuem saneamento básico e pavimentação precários, com predomínio de uma população de baixa renda.

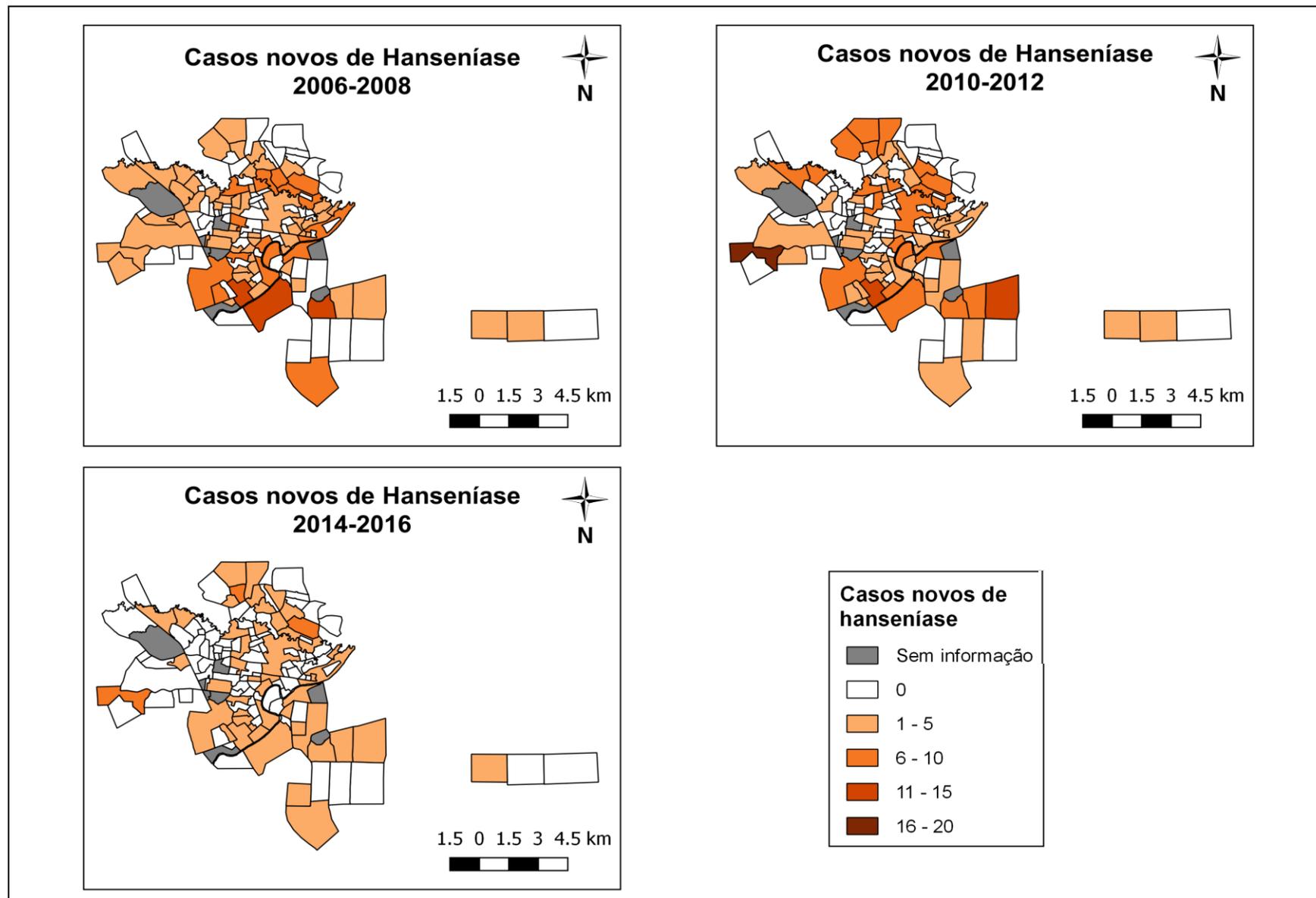


Figura 4.5: Casos novos de hanseníase por bairros no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Mapas: Elaborados com o Software QGIS (2.18.14).

A análise espacial da taxa de detecção média de hanseníase demonstrou que houve uma redução destes índices nos bairros do município de Rio Branco/AC ao longo do período avaliado, sendo mais evidente no triênio 2014-2016. No entanto, muitos bairros ainda foram classificados como hiperendêmicos para a doença, com destaque mais uma vez para os bairros do Calafate (nº 142), Tancredo Neves (nº 70) e Vitória (nº 21). Este quadro se apresentou tanto na taxa de detecção média bruta (Figura 4.6a) quanto na taxa de detecção média suavizada pelo Método Bayesiano Empírico Local (Figura 4.6b), que mostrou um perfil ainda mais preocupante em relação a doença.

A partir da Tabela 4.2, foi possível observar que a taxa de detecção média bruta no Triênio 2006-2008 foi muito elevada, onde mais da metade dos bairros (51,85%) se apresentavam como hiperendêmicos. No triênio 2010-2012 houve uma redução neste quadro, mas ainda quase a metade dos bairros apresentou uma endemicidade muito alta ou hiperendêmica (3,70 % e 43,71%, respectivamente). Somente no triênio 2014-2016 foi possível observar uma redução considerável da endemicidade da doença. No entanto, muitos bairros (27,41%) ainda se mostravam hiperendêmicos para a hanseníase. Quando analisada a taxa de detecção média suavizada pelo Método Empírico Bayesiano Local, foi possível observar que os valores se mostraram ainda mais expressivos, por levar em consideração a vizinhança para realizar o cálculo da taxa de detecção daquele bairro.

Tabela 4.2: Classificação da taxa de detecção média (por 10.000 habitantes) bruta e suavizada da doença por bairros no município de Rio Branco/AC. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016).

Classificação da Taxa de Detecção Média Bruta de Hanseníase (Bairros (%))				
Baixa	Média	Alta	Muito Alta	Hiperendêmica
Triênio 2006-2008				
61 (45,19)	0 (0)	0 (0)	4 (2,96)	70 (51,85)
Triênio 2010-2012				
71 (52,59)	0 (0)	0 (0)	5 (3,70)	59 (43,71)
Triênio 2014-2016				
88 (65,19)	0 (0)	5 (3,70)	5 (3,70)	37 (27,41)
Classificação da Taxa de Detecção Média Suavizada de Hanseníase (Bairros (%))				
Baixa	Média	Alta	Muito Alta	Hiperendêmica
Triênio 2006-2008				
8 (5,93)	0 (0)	2 (1,48)	4 (2,96)	121 (89,63)
Triênio 2010-2012				
13 (9,63)	3 (2,22)	7 (5,19)	28 (20,74)	84 (62,22)
Triênio 2014-2016				
30 (22,22)	15 (11,11)	18 (13,33)	29 (21,48)	43 (31,86)

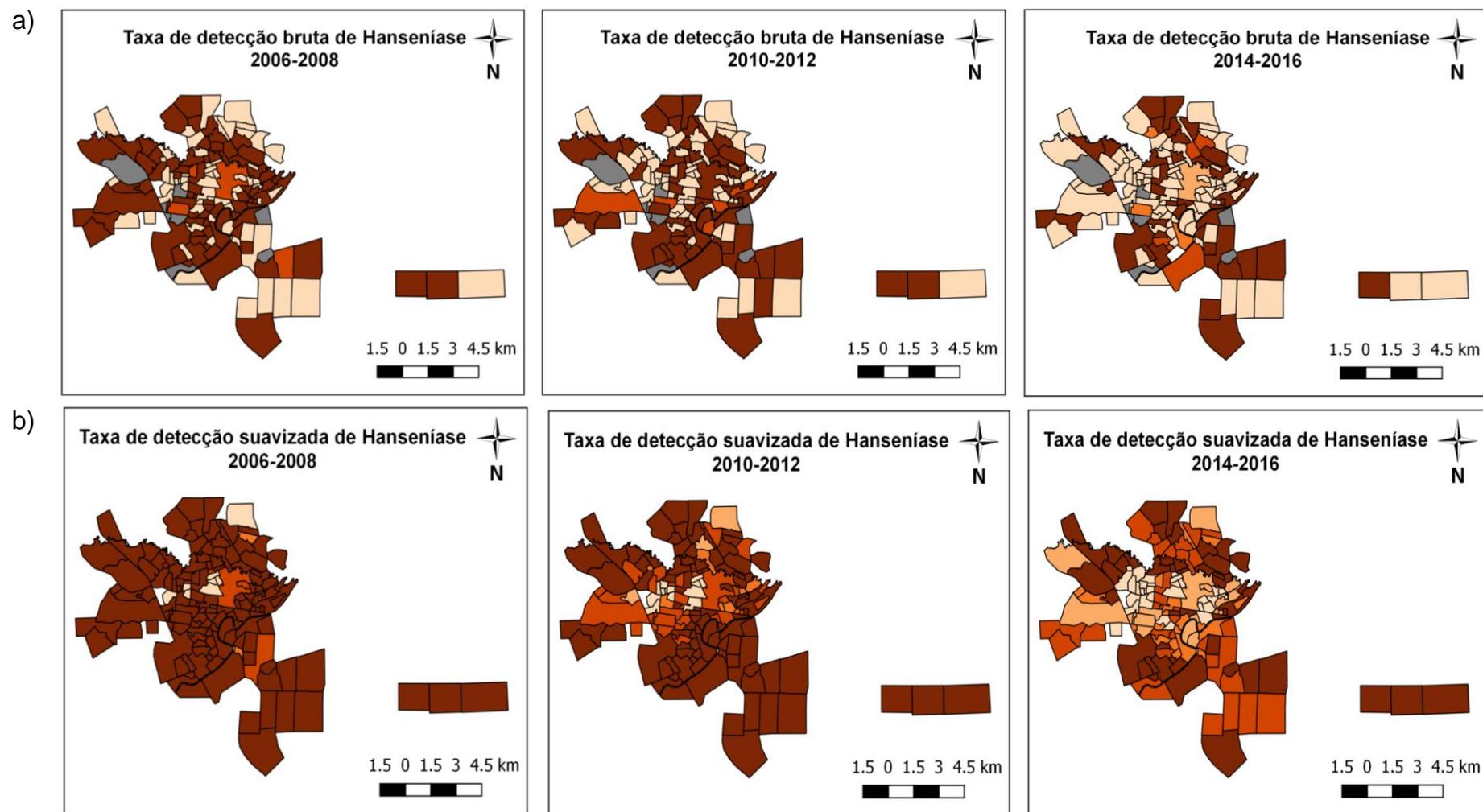


Figura 4.6: Taxa de detecção média de hanseníase (por 10.000 habitantes) por bairros no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016. a) Taxa de detecção bruta. b) Taxa de detecção suavizada pelo Método Bayesiano Empírico Local. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Mapas: Elaborados com o *Software QGIS* (2.18.14).



A análise da taxa de detecção média a partir de histogramas possibilitou ter uma visão mais clara deste quadro, onde nos triênios 2006-2008 e 2010-2012 alguns bairros apresentam taxa de detecção (por 10.000 habitantes) muito alta, com taxa de detecção média de até 152 casos/10.000 habitantes (Conjunto Rui Lino (nº 132)), quando comparadas ao triênio 2014-2016. Isso pode ser reflexo de uma redução no número de casos novos da doença ou de um aumento da população daquele bairro. Este quadro apresentou uma redução no triênio 2014-2016, mas vários bairros (Distrito Industrial (nº 01), Vila Ivonete/PROCOM/SOLAR (nº 08), Bahia Velha (nº 88), Santa Cecília (nº 48), João Paulo II (nº 90), Cadeia Velha (nº 17), Sobral (nº 33), Abraão Alab (nº 96), Tancredo Neves (nº 70), Conquista (nº 06), Mocinha Magalhães (nº 03), Baixa da Habitasa (nº 75)), ainda apresentaram hiperendemicidade com valores superiores a 10 casos/10.000 habitantes. Além disso, foi possível perceber um aumento na frequência de bairros que não apresentaram taxa de detecção da doença (igual a zero) no triênio 2014-2016, ocorrendo em cerca de 80% dos bairros (Figura 4.7a). Isso pode refletir uma ausência de casos novos de hanseníase no período avaliado ou indicar uma deficiência no diagnóstico clínico da doença pelos serviços de saúde nos últimos anos. Estes dados se apresentam ainda mais expressivos quando suavizados pelo Método Bayesiano Empírico Local (Figura 4.7b).

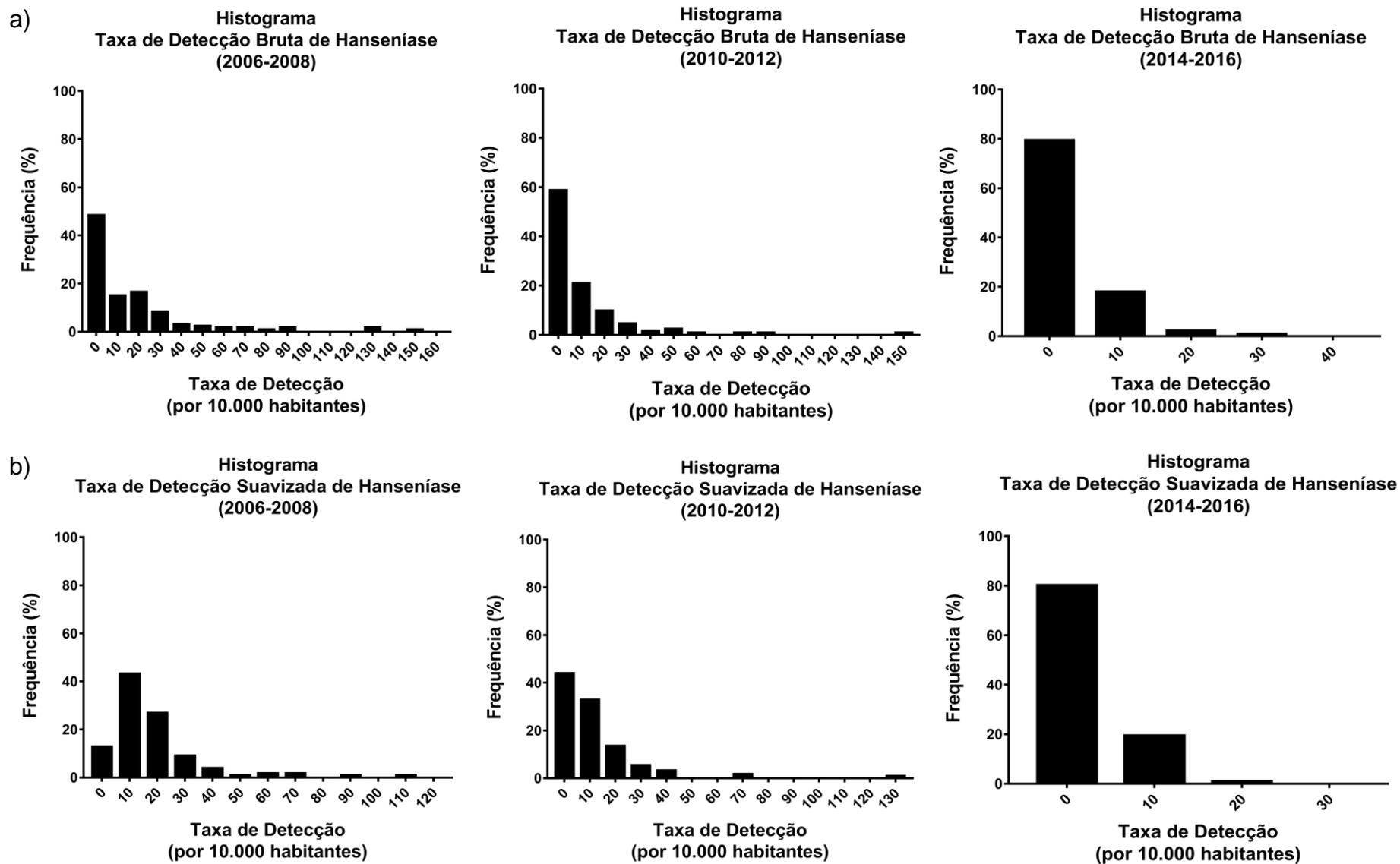


Figura 4.7: Histograma apresentando a frequência percentual da taxa de detecção média de hanseníase (por 10.000 habitantes) no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016. a) Frequência da taxa de detecção bruta. b) Frequência da taxa de detecção suavizada pelo Método Bayesiano Empírico Local. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

Quando calculadas as medidas sumárias (média, desvio padrão, erro padrão, IC < 95%, IC > 95%) (Tabela 4.3) e construídos os *boxplots* (Figura 4.8) para a taxa de detecção média da doença ao longo dos triênios analisados, foi possível observar uma redução tanto para a taxa de detecção bruta quanto para a taxa de detecção suavizada.

Tabela 4.3: Medidas sumárias para a taxa de detecção média (por 10.000 habitantes) bruta e suavizada da doença no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Legenda: IC (Intervalo de confiança).

Taxa de Detecção Bruta de Hanseníase				
Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC < 95%	IC > 95%
Triênio 2006-2008				
16,73	26,51	2,28	12,22	21,24
Triênio 2010-2012				
9,98	19,41	1,67	6,68	13,29
Triênio 2014-2016				
2,67	4,92	0,42	1,83	3,50
Taxa de Detecção Suavizada de Hanseníase				
Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC < 95%	IC > 95%
Triênio 2006-2008				
17,46	16,57	1,43	14,64	20,28
Triênio 2010-2012				
11,32	15,39	1,32	8,70	13,94
Triênio 2014-2016				
2,90	2,92	0,25	2,40	3,39

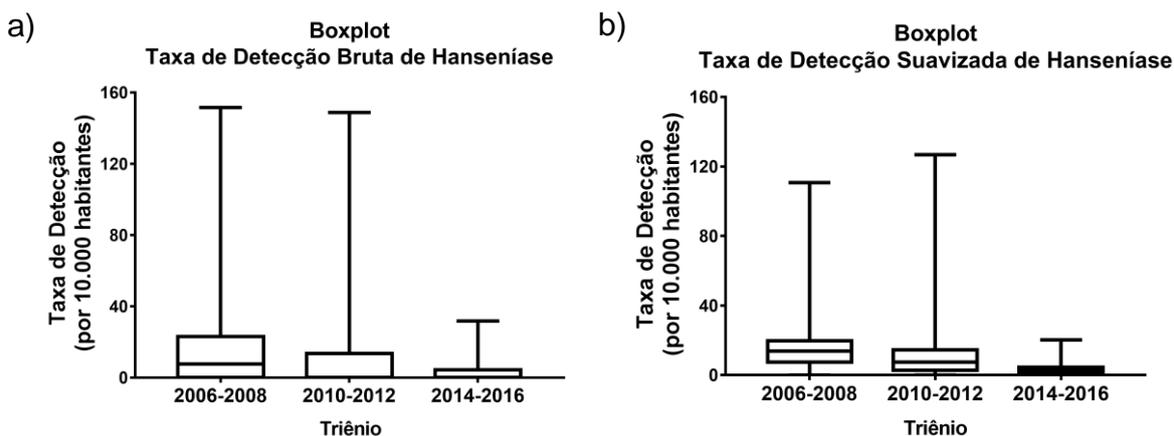


Figura 4.8: *Boxplots* da taxa de detecção média de hanseníase (por 10.000 habitantes) no município de Rio Branco/AC nos triênios 2006-2008, 2010-2012 e 2014-2016. a) Taxa de detecção bruta. b) Taxa de detecção suavizada pelo Método Bayesiano Empírico Local. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

A análise espacial da taxa de prevalência acumulada de hanseníase nos bairros do município de Rio Branco/AC no período 2006-2016 apresentou a maioria dos bairros como hiperendêmicos, endemicidade muito alta ou alta para a doença. Mais uma vez foi observado que os bairros do Calafate (nº 142), Tancredo Neves (nº 70) e Vitória (nº 21) apresentaram hiperendemicidade para a doença. Este quadro foi observado na prevalência bruta (Figura 4.9a) e intensificado na prevalência suavizada pelo Método Bayesiano Empírico Local (Figura 4.9b).

A partir da Tabela 4.4, foi possível observar que a taxa de prevalência acumulada bruta no período 2006-2016 foi classificada como alta (12,59%), muito alta (12,59%) ou hiperendêmica (37,05%). Quando analisada a taxa de prevalência acumulada suavizada pelo Método Empírico Bayesiano Local, foi possível observar mais uma vez um quadro crítico, com endemicidade alta (22,96%), muito alta (24,44%) ou hiperendêmica (39,26%).

Tabela 4.4: Classificação da taxa de prevalência acumulada (por 10.000 habitantes) bruta e suavizada da doença por bairros no município de Rio Branco/AC. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016).

Classificação da Taxa de Prevalência Bruta de Hanseníase (Bairros (%))				
Baixa	Média	Alta	Muito Alta	Hiperendêmica
46 (34,07)	5 (3,70)	17 (12,59)	17 (12,59)	50 (37,05)
Classificação da Taxa de Prevalência Suavizada de Hanseníase (Bairros (%))				
Baixa	Média	Alta	Muito Alta	Hiperendêmica
3 (2,22)	15 (11,11)	31 (22,96)	33 (24,44)	53 (39,26)

A análise da taxa de prevalência acumulada demonstrou uma prevalência elevada para a doença (alta, muito alta ou hiperendêmica) no período avaliado, com valores de taxa de prevalência de até 149 casos/10.000 habitantes (Figura 4.10a). A taxa de prevalência suavizada pelo Método Bayesiano Empírico Local apresentou uma menor frequência de zeros (bairros sem casos novos da doença) se comparada a taxa bruta de prevalência (Figura 4.10b). Isso ocorreu devido ao fato de o valor estimado ser baseado nos bairros vizinhos (vizinhança de 4º grau). Mesmo assim, muitos bairros permaneceram como hiperendêmicos para a doença.

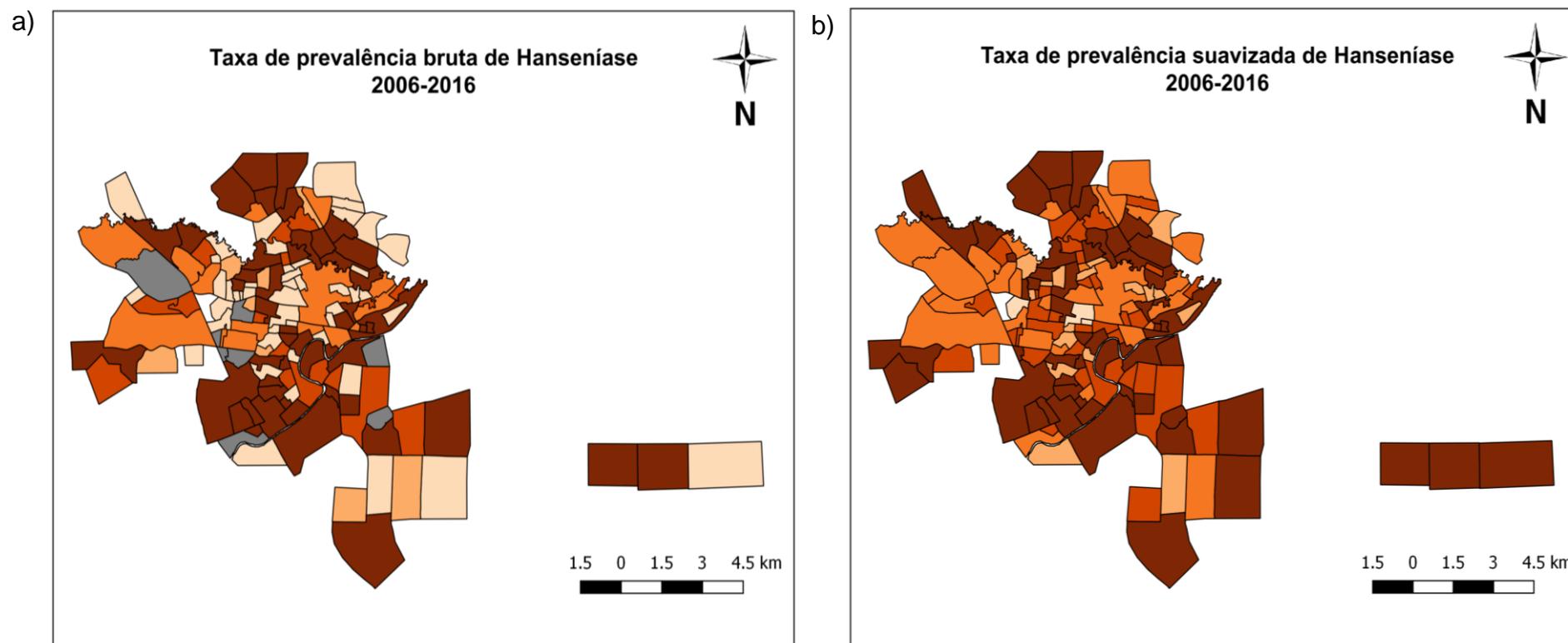


Figura 4.9: Taxa de prevalência de hanseníase acumulada (por 10.000 habitantes) por bairros no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016. a) Prevalência bruta. b) Prevalência suavizada pelo Método Bayesiano Empírico Local. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Mapas: Elaborados com o *Software QGIS* (2.18.14).



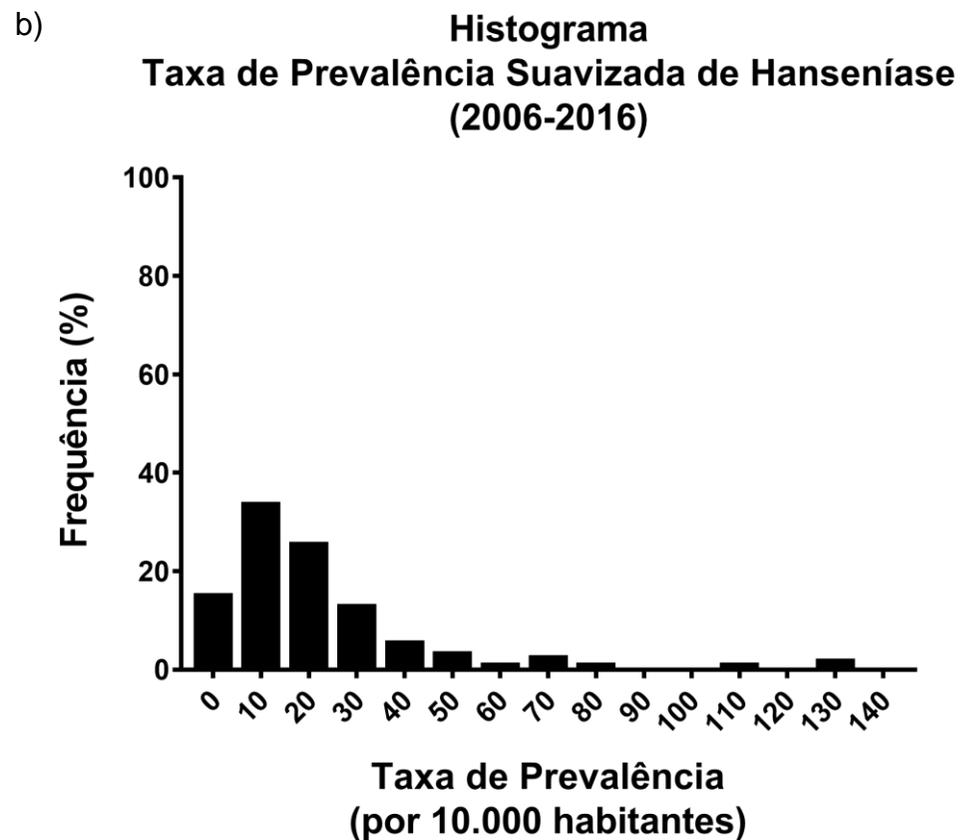
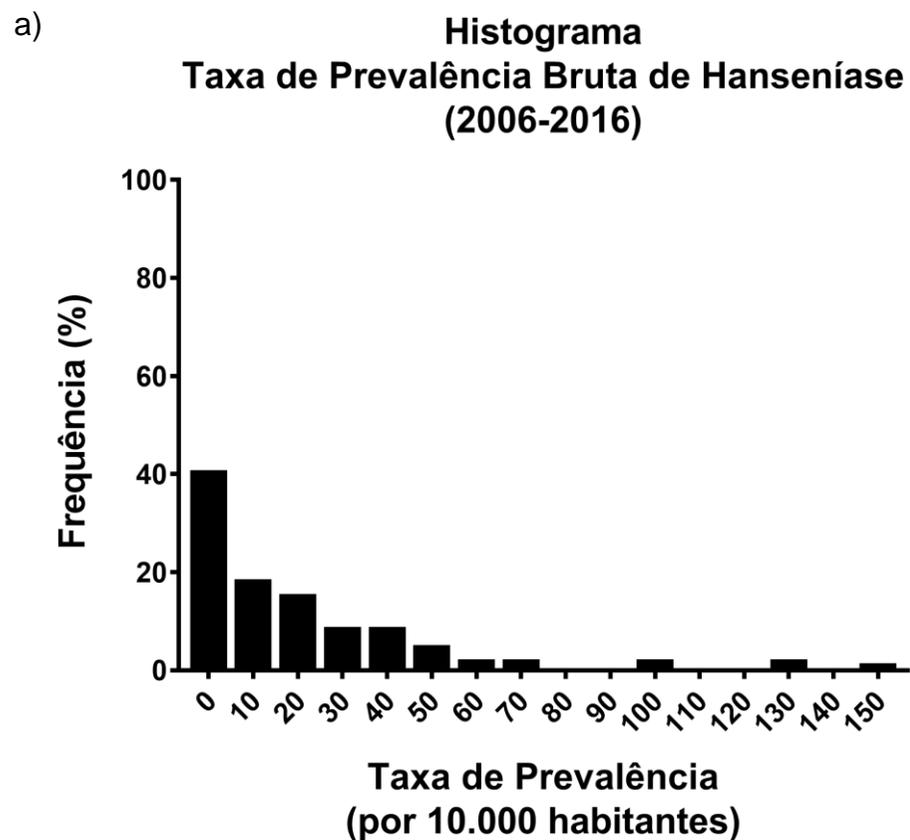


Figura 4.10: Histograma apresentando a frequência percentual da taxa de prevalência acumulada de hanseníase (por 10.000 habitantes) no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016. a) Frequência da taxa de detecção bruta. b) Frequência da taxa de detecção suavizada pelo Método Bayesiano Empírico Local. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

Foi possível observar que os valores de medidas sumárias (média, desvio padrão, erro padrão, IC < 95%, IC > 95%) para a taxa de prevalência acumulada da doença no período 2006-2016 não apresentam grandes diferenças em relação a taxa de detecção bruta e a taxa de detecção suavizada (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Medidas sumárias para a taxa de prevalência acumulada (por 10.000 habitantes) bruta e suavizada da doença no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Legenda: IC (Intervalo de confiança).

Taxa de Prevalência Bruta de Hanseníase (2006-2016)				
Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC < 95%	IC > 95%
19,11	26,74	2,3	14,56	23,67
Taxa de Prevalência Suavizada de Hanseníase (2006-2016)				
Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	IC < 95%	IC > 95%
20,98	22,07	1,90	17,22	24,74

Os *boxplots* da taxa de prevalência acumulada da doença no período 2006-2016 também não apresentaram grande diferença entre a taxa de detecção bruta e a taxa de detecção suavizada (Figura 4.11).

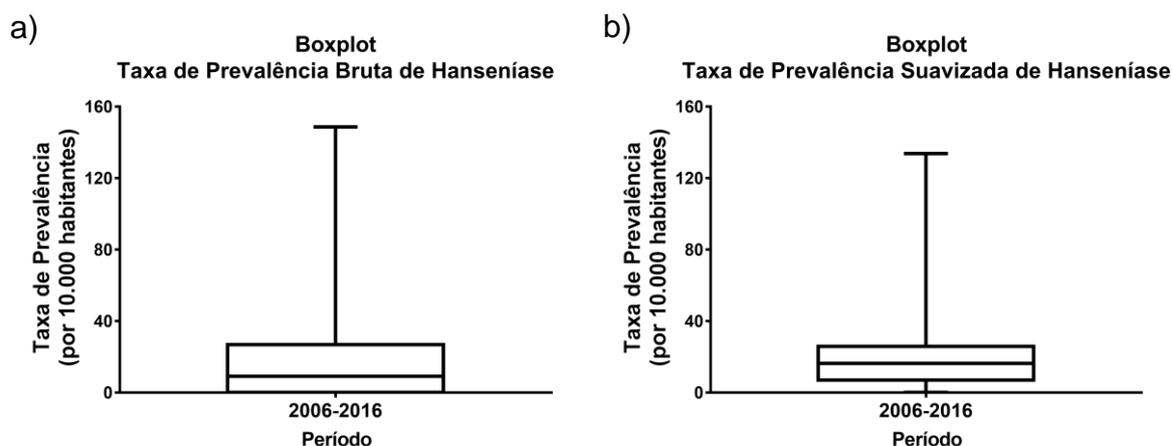


Figura 4.11: *Boxplots* da taxa de prevalência acumulada de hanseníase (por 10.000 habitantes) no município de Rio Branco/AC no período 2006-2016. a) Taxa de prevalência bruta. b) Taxa de prevalência suavizada pelo Método Bayesiano Empírico Local. Fonte de dados: Secretaria de Vigilância Epidemiológica Municipal (SINAN NET, 2016). Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

4.3. Diagnóstico Sorológico para a Hanseníase

Para a avaliação dos testes rápidos (NDO-LID e ML-Flow (PGL-1)), foram utilizadas amostras de 150 pacientes (110 multibacilares e 40 paucibacilares), 119 contatos intradomiciliares e 89 controles. Destes, 53,6% (59/110) foram positivos em pacientes multibacilares e 22,5% (9/40) em pacientes paucibacilares. Além disso, 37% (44/119) dos testes foram positivos em contatos e 30,3% (27/89) positivos em controles, conforme Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Classificação dos testes rápidos NDO-LID e ML-Flow (PGL-1) de pacientes (multibacilares e paucibacilares), contatos e controles para hanseníase.

Testes Rápidos				
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)	Controles (%)
Positivos	59 (53,6)	9 (22,5)	44 (37)	27 (30,3)
Negativos	51 (46,4)	31 (77,5)	75 (63)	62 (69,7)
Total	110 (100)	40 (100)	119 (100)	89 (100)

Além disso, os testes rápidos de pacientes e contatos foram analisados quanto ao tratamento da doença (pacientes tratados, em tratamento ou não-tratados).

Foi observado que os pacientes multibacilares não-tratados (100%) e em tratamento (61,8%), em sua maioria na fase inicial do tratamento (0 a 3 meses), apresentaram alta positividade para os testes rápidos. Por outro lado, a maioria dos pacientes multibacilares tratados (51,4%) e paucibacilares tratados (86,2%) foi negativa para os testes rápidos utilizados (Tabela 4.7). No entanto, cabe destacar a alta positividade (48,6%) dos testes rápidos de pacientes multibacilares tratados.

Tabela 4.7: Testes rápidos NDO-LID e ML-Flow (PGL-1) de pacientes (multibacilares e paucibacilares) tratados, em tratamento e não-tratados para a hanseníase.

Testes Rápidos						
	Pacientes (MB)			Pacientes (PB)		
	Tratados (%)	Em tratamento (%)	Não-tratados (%)	Tratados (%)	Em tratamento (%)	Não-tratados (%)
Positivos	36 (48,6)	21 (61,8)	2 (100)	4 (13,8)	5 (45,5)	0
Negativos	38 (51,4)	13 (38,2)	0 (0)	25 (86,2)	6 (54,5)	0
Total	74 (100)	34 (100)	2 (100)	29 (100)	11 (100)	0

Em relação aos testes rápidos avaliados em contatos, foi observado que a maioria dos contatos de pacientes multibacilares não-tratados (100%) e em tratamento (57,1%) foi positiva. Enquanto isso, a maior parte dos testes rápidos de contatos de pacientes multibacilares tratados (74,4%) foi negativa (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Testes rápidos NDO-LID e ML-Flow (PGL-1) de contatos positivos e negativos para a hanseníase.

Testes Rápidos						
	Pacientes (MB)			Pacientes (PB)		
	Tratados (%)	Em tratamento (%)	Não-tratados (%)	Tratados (%)	Em tratamento (%)	Não-tratados (%)
Contatos Positivos	21 (25,6)	16 (57,1)	7 (100)	0 (0)	0 (0)	0
Contatos Negativos	61 (74,4)	12 (42,9)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	0
Total	82 (100)	28 (100)	7 (100)	1 (100)	1 (100)	0

Devido ao fato de as amostras e os grupos de estudo serem diferentes em relação aos testes rápidos avaliados, foram apresentados a seguir os resultados individuais de cada teste.

Foram realizados testes rápidos NDO-LID em 114 pacientes (81 multibacilares e 33 paucibacilares) e 35 contatos intradomiciliares. Destes, 46,9% (38/81) foram positivos em pacientes multibacilares e 15,2% (5/33) em pacientes paucibacilares. Além disso, 28,6% (10/35) dos testes foram positivos em contatos (Tabela 4.9).

Tabela 4.9: Classificação dos testes rápidos NDO-LID de pacientes (multibacilares e paucibacilares) e contatos para a hanseníase.

Testes Rápidos (NDO/LID)			
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)
Positivos	38 (46,9)	5 (15,2)	10 (28,6)
Negativos	43 (53,1)	28 (84,8)	25 (71,4)
Total	81 (100)	33 (100)	35 (100)

Os testes positivos para pacientes multibacilares (46,9%) foram classificados de acordo com sua positividade: 4,9% alta (+3), 18,5% média (+2) e 23,5% baixa (+1). Em relação aos testes positivos para pacientes paucibacilares (15,2%) e aos testes positivos para os contatos (28,6%), todos apresentaram positividade baixa (+1) (Figura 4.12).

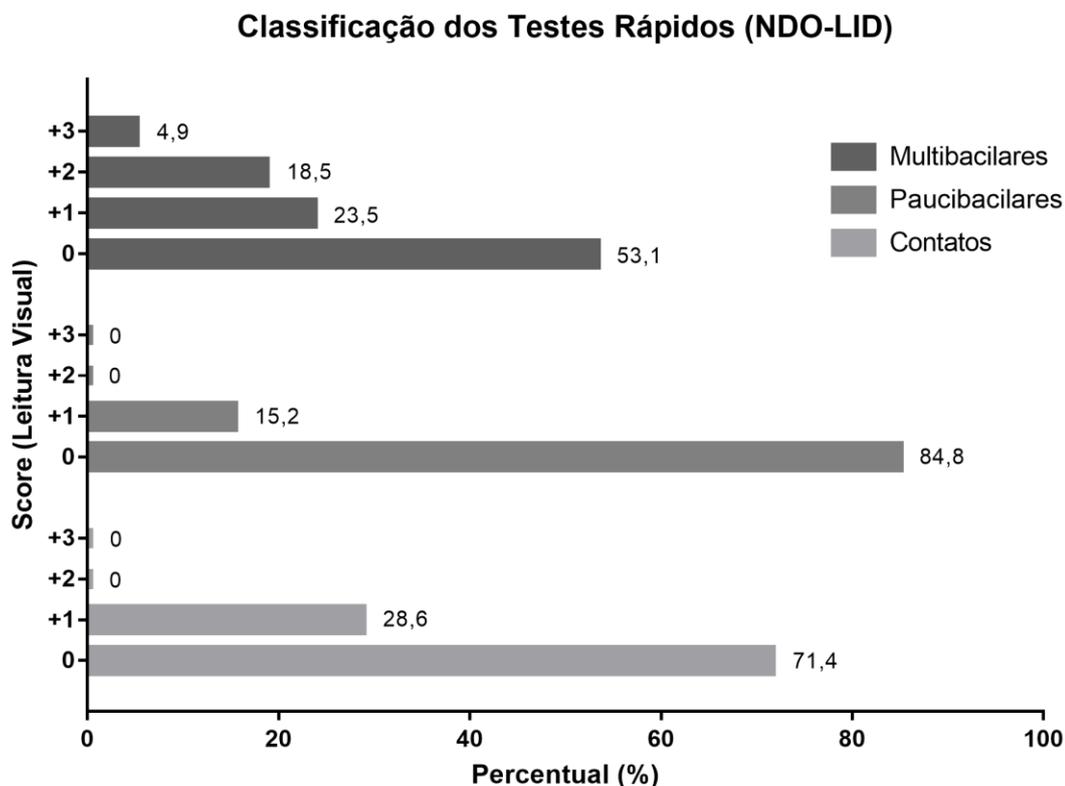


Figura 4.12: Classificação dos testes rápidos NDO-LID de pacientes (multibacilares e paucibacilares) e contatos para hanseníase. Score: Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2), Positividade alta (+3). Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

Posteriormente, foram realizados testes rápidos ML-Flow (PGL-1) em 36 pacientes (29 multibacilares e 7 paucibacilares), 84 contatos intradomiciliares e 89 controles. Destes, 72,4% (21/29) foram positivos em pacientes multibacilares e 57,1% (4/7) em pacientes paucibacilares. Além disso, 40,5% (34/84) dos testes foram positivos em contatos e 30,3% (27/89) positivos em controles, conforme Tabela 4.10.

Tabela 4.10: Classificação dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) de pacientes (multibacilares e paucibacilares), contatos e controles para hanseníase.

Testes Rápidos (ML-Flow (PGL-1))				
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)	Controles (%)
Positivos	21 (72,4)	4 (57,1)	34 (40,5)	27 (30,3)
Negativos	8 (27,6)	3 (42,9)	50 (59,5)	62 (69,7)
Total	29 (100)	7 (100)	84 (100)	89 (100)

Quando realizada a análise dos testes positivos para pacientes multibacilares (72,4%), eles foram classificados de acordo com sua positividade em: 20,7% muito alta (+4), 13,8% alta (+3), 17,2% média (+2) e 20,7% baixa (+1). Em relação aos 57,1% dos testes positivos para pacientes paucibacilares, eles foram classificados de acordo com sua positividade em: 14,3% alta (+3), 14,3% média (+2) e 28,5% baixa (+1). Já os 40,5% dos testes positivos para contatos, 4,8% apresentaram positividade alta (+3), 11,9% positividade média (+2) e 23,8% positividade baixa (+1). De 30,3% dos testes positivos para os controles, 3,3% apresentaram positividade média (+2) e 27% positividade baixa (+1) (Figura 4.13). Foi possível observar que os testes rápidos que apresentavam maior positividade eram de pacientes multibacilares e paucibacilares que não haviam iniciado o tratamento ou que estavam no início do tratamento (até três meses). Enquanto isso, os pacientes que já haviam concluído o tratamento, apresentaram positividade baixa ou eram negativos para o teste rápido. O mesmo quadro foi observado para os testes rápidos NDO-LID.

Classificação dos Testes Rápidos (ML-Flow (PGL-1))

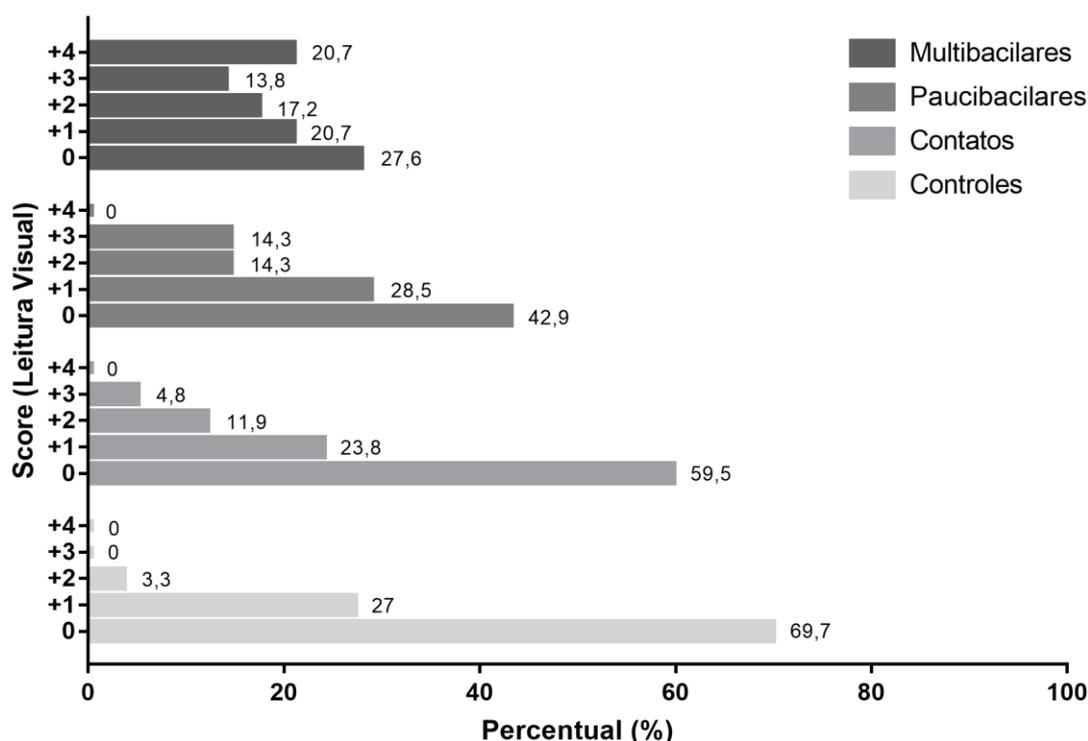


Figura 4.13: Classificação dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) de pacientes (multibacilares e paucibacilares), contatos e controles para hanseníase. Score: Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2), Positividade alta (+3), Positividade muito alta (+4). Gráficos: *GraphPad Prism 7.0*.

Para os testes rápidos ML-Flow (PGL-1), devido a presença do grupo controle no estudo, foi possível avaliar sua eficácia para o grupo de pacientes multibacilares (Tabela 4.11) e paucibacilares (Tabela 4.12).

Tabela 4.11: Avaliação dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) utilizados no estudo no grupo de pacientes multibacilares. Legenda: VPP (Valor Preditivo Positivo), VPN (Valor Preditivo Negativo).

SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	VPP	VPN	Acurácia
72,4%	69,7%	43,8%	88,6%	70,3%

Tabela 4.12: Avaliação dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) utilizados no estudo no grupo de pacientes paucibacilares. Legenda: VPP (Valor Preditivo Positivo), VPN (Valor Preditivo Negativo).

SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	VPP	VPN	Acurácia
57,1%	69,7%	12,9%	95,4%	68,8%

4.4. Diagnóstico Molecular da Hanseníase

A caracterização dos pacientes com hanseníase que participaram do estudo de diagnóstico molecular (qPCR) foi apresentada na Tabela 4.13, onde a maioria dos pacientes residia no município de Rio Branco, era do sexo masculino, possuía etnia mestiça e era classificada como multibacilar.

Tabela 4.13: Caracterização dos pacientes com hanseníase que participaram do estudo de diagnóstico molecular (qPCR). Legenda: SD (Desvio Padrão).

Caracterização dos pacientes com Hanseníase	
Casos (n=213)	
Idade (média (SD))	49 (17,2)
Localidade	
Rio Branco (n (%))	131 (61,5)
Municípios/AC (n (%))	76 (35,68)
Outros Estados (n (%))	6 (2,82)
Sexo	
Masculino (n (%))	140 (65,73%)
Feminino (n (%))	73 (34,27%)
Etnia	
Caucasianos (n (%))	40 (18,78%)
Mestiços (n (%))	164 (77%)
Negros (n (%))	05 (2,35%)
Indígenas (n (%))	04 (1,87%)
Classificação OMS	
Multibacilar (n,(%))	154 (72,30%)
Paucibacilar (n,(%))	59 (27,70%)
Baciloscopia	
Positiva (n (%))	81 (38,03%)
Negativa (n (%))	132 (61,97%)

Para a análise molecular do DNA de *M. leprae* foram processadas 213 amostras de pacientes (146 multibacilares e 67 paucibacilares) e 213 amostras de contatos intradomiciliares, conforme Tabela 4.14. A partir da análise das amostras através da PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para o gene *16 S*, 15,8% (23/146) se mostraram positivas em pacientes multibacilares e 1,5% (01/67) em pacientes paucibacilares. Além disso, 2,4% (05/213) das amostras de contatos intradomiciliares se mostraram positivas. As demais amostras analisadas se mostraram negativas para a qPCR, sendo 84,2% (123/146) em pacientes

multibacilares, 98,5% (66/67) em pacientes paucibacilares e 97,6% (208/213) em contatos intradomiciliares.

Tabela 4.14: Amostras de pacientes e contatos para hanseníase analisadas pela qPCR.

PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR)			
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)
Positivos	23 (15,8)	1 (1,5)	5 (2,4)
Negativos	123 (84,2)	66 (98,5)	208 (97,6)
Total	146 (100)	67 (100)	213 (100)

O grupo de estudo de hanseníase compreendeu um grupo retrospectivo (pacientes cadastrados e contatos anteriores a 2016) e um grupo prospectivo (casos novos e contatos entre 2016 e 2017) para a doença. A partir da Tabela 4.15, é possível observar que das 29 amostras positivas para a qPCR, 22 amostras eram do grupo prospectivo (75,9%) e 07 amostras do grupo retrospectivo (24,1%) para a doença.

Tabela 4.15: Amostras de pacientes e contatos para hanseníase, agrupadas em relação ao grupo de estudo retrospectivo (anterior a 2016) e prospectivo (2016-2017), analisadas pela qPCR.

PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR)						
	Grupo Retrospectivo			Grupo Prospectivo		
	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)	Multibacilares (%)	Paucibacilares (%)	Contatos (%)
Positivos	4 (3,8)	0 (0)	3 (2,1)	19 (47,5)	1 (9,1)	2 (2,9)
Negativos	102 (96,2)	56 (100)	141 (97,9)	21 (52,5)	10 (90,9)	67 (97,1)
Total	106 (100)	56 (100)	144 (100)	40 (100)	11 (100)	69 (100)

Na Figura 4.14, foi apresentada a relação existente entre a qPCR e a baciloscopia dos pacientes avaliados para a hanseníase. Das 22 amostras positivas para a qPCR do grupo de estudo prospectivo, é importante destacar que 86,4% (19/22) das amostras eram de pacientes multibacilares, sendo 89,5% (17/19) de pacientes positivos para a baciloscopia (06 pacientes não-tratados e 11 pacientes que iniciaram o tratamento até três meses quando da coleta das amostras) e 10,5% (2/19) de pacientes negativos para a baciloscopia (02 pacientes que iniciaram o tratamento até três meses quando da coleta das amostras). Além disso, foi observado que 4,5% (1/22) das amostras de pacientes paucibacilares (baciloscopia negativa) e 9,1% (2/22) das amostras de contatos intradomiciliares (contatos de

pacientes não-tratados) foram positivas para a qPCR no grupo de estudo prospectivo. Os pacientes do grupo prospectivo que foram negativos para a qPCR (21 multibacilares e 10 paucibacilares) estavam em tratamento há mais de seis meses quando da coleta das amostras.

a)

		Baciloscopia	
		+	-
qPCR	+	17	02
	-	07	14
		Multibacilar	

		Baciloscopia	
		+	-
qPCR	+	0	01
	-	0	10
		Paucibacilar	

b)

		Baciloscopia	
		+	-
qPCR	+	04	0
	-	47	55
		Multibacilar	

		Baciloscopia	
		+	-
qPCR	+	0	0
	-	0	56
		Paucibacilar	

Figura 4.14: Relação entre a qPCR e a baciloscopia dos pacientes avaliados para a hanseníase. a) Pacientes multibacilares e paucibacilares do grupo prospectivo (2016-2017). b) Pacientes multibacilares e paucibacilares do grupo retrospectivo (anteriores a 2016).

Em relação as 04 amostras positivas para a qPCR do grupo de estudo retrospectivo (positivas para a baciloscopia), 02 amostras eram de pacientes curados que tiveram a doença na década de 1970 e 02 amostras eram de pacientes curados que tiveram a doença em 2014. Os 03 contatos intradomiciliares positivos para a qPCR do grupo de estudo retrospectivo eram contatos de pacientes curados que tiveram a doença na década de 1970. Os pacientes do grupo retrospectivo que foram negativos para a qPCR (102 multibacilares e 56 paucibacilares), já haviam concluído o tratamento quando da coleta das amostras.

Estas relações ficaram mais claras quando observamos a positividade da qPCR em relação a fase de tratamento dos pacientes com a doença (Tabela 4.16).

Tabela 4.16: Amostras de pacientes (multibacilares e paucibacilares) analisadas pela qPCR em relação a fase de tratamento para a hanseníase.

PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR)						
Pacientes (MB)			Pacientes (PB)			
Tratamento (meses)						
	Fase inicial (0 ≤ 3)	Fase Final (6 ≤ 12)	Fase Posterior (> 12)	Fase inicial (0 ≤ 3)	Fase Final (6 ≤ 12)	Fase Posterior (> 12)
Positivos	19	0	4	1	0	0
Negativos	0	21	102	0	10	56
Total	19	21	106	1	10	56

Posteriormente, foram analisados os contatos positivos para a qPCR, onde foi possível observar que 40% (2/5) dos contatos eram de pacientes multibacilares não-tratados e 60% (3/5) eram contatos de pacientes multibacilares tratados (Tabela 4.17). Merece destaque o elevado número de contatos negativos de pacientes multibacilares não-tratados (95,7%).

Tabela 4.17: Amostras de contatos para a hanseníase analisadas pela qPCR em relação aos pacientes (multibacilares e paucibacilares) tratados e não-tratados.

PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR)				
Pacientes (MB)		Pacientes (PB)		
	Tratados (%)	Não-tratados (%)	Tratados (%)	Não-tratados (%)
Contatos Positivos	3 (2,6)	2 (4,3)	0 (0)	0 (0)
Contatos Negativos	111 (97,4)	45 (95,7)	51 (100)	1 (100)
Total	114 (100)	47 (100)	51 (100)	1 (100)

4.5. Análise Molecular de Polimorfismos para a Hanseníase (Genotipagem de SNPs)

Para a análise molecular de polimorfismos foram processadas 157 amostras de pacientes para a hanseníase e 611 amostras de doadores saudáveis. Os indivíduos desta pesquisa foram classificados segundo o sexo (masculino e feminino), a etnia (Caucasianos (brancos), Mestiços (pardos e amarelos), Negros (pretos) e Indígenas) e a classificação operacional da doença (multibacilar e paucibacilar). A caracterização da população de estudo está descrita na Tabela 4.18.

Tabela 4.18: Caracterização da população (Casos x Controles) utilizada no estudo da genotipagem de SNPs. Legenda: SD (Desvio Padrão).

População de Rio Branco/AC		
	Controles (n=611)	Casos (n=157)
Idade (média (SD))	31 (9)	49 (16,9)
Sexo		
Masculino (n (%))	389 (63,7%)	98 (62,4%)
Feminino (n (%))	222 (33,3%)	59 (37,6%)
Etnia		
Caucasianos (n (%))	92 (15,1%)	20 (12,7%)
Mestiços (n (%))	513 (83,9%)	128 (81,6%)
Negros (n (%))	06 (1,0%)	05 (3,2%)
Indígenas (n (%))	0 (0%)	04 (2,5%)
Classificação OMS		
Multibacilar (n (%))	-	120 (76,4%)
Paucibacilar (n (%))	-	37 (23,6%)

A partir da genotipagem de SNPs, como resultado da regressão logística e de sua correção para a co-variável sexo, apresentados nas tabelas a seguir, foi possível observar que não houve uma diferença significativa entre as frequências dos genótipos e alelos no grupo de casos e controles.

A análise do SNP rs4620533 (C>G), referente ao gene *PKLR*, mostrou que as frequências alélicas e genótípicas não sofreram desvio de Hardy-Weinberg (HWE) em casos ($\chi^2=0.30$, $p=0.58$) e controles ($\chi^2=0.05$, $p=0.80$). Conforme Tabela 4.19, este SNP não apresentou uma associação significativa entre casos e controles (genótipo CG (OR*=1,11, $p=0,60$), genótipo GG (OR*=1,16, $p=0,57$), alelo G (OR*=1,08, $p=0,65$), carreador G (OR*=1,12, $p=0,53$)).

Tabela 4.19: Frequências alélicas e genótípicas do SNP rs4620533 (gene *PKLR*) em casos e controles do município de Rio Branco/AC, relativas ao estudo de associação com a hanseníase. Legenda: IC (Intervalo de confiança), OR (Razão das chances).

SNP	Genótipo/Alelo	CASO N = 165	CONTROLE N = 488	OR (p valor)	IC 95%	OR* (p valor)	IC 95%*
<i>PKLR</i> rs4620533 C>G	CC	61 (0.37)	170 (0.35)	-			
	CG	75 (0.45)	233 (0.48)	1.11 (0.58)	[0.75-1.64]	1.11 (0.60)	[0.74-1.65]
	GG	29 (0.18)	85 (0.17)	1.05 (0.84)	[0.62-1.75]	1.16 (0.57)	[0.68-1.99]
	Alelo C	197 (0.60)	573 (0.59)	-			
	Alelo G	133 (0.40)	403 (0.41)	1.04 (0.82)	[0.72-1.49]	1.08 (0.65)	[0.75-1.57]
	Carreador G	104 (0.63)	318 (0.65)	1.09 (0.62)	[0.76-1.58]	1.12 (0.53)	[0.77-1.63]

*correção para a co-variável sexo.

A análise do SNP rs4971072 (A>G), referente ao gene *PKLR*, mostrou que as frequências alélicas e genóticas estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) em casos ($\chi^2=0.00017$, $p=0.98$) e controles ($\chi^2=0.26$, $p=0.60$). Este SNP não apresentou uma associação significativa entre casos e controles (genótipo AG (OR*=0,94, $p=0,81$), genótipo GG (OR*=1,10, $p=0,71$), alelo G (OR*=1,04, $p=0,81$), carreador G (OR*=0,99, $p=0,97$)), conforme Tabela 4.20.

Tabela 4.20: Frequências alélicas e genóticas do SNP rs4971072 (gene *PKLR*) em casos e controles do município de Rio Branco/AC, relativas ao estudo de associação com a hanseníase. Legenda: IC (Intervalo de confiança), OR (Razão das chances).

SNP	Genótipo/Alelo	CASO N = 165	CONTROLE N = 488	OR (p valor)	IC 95%	OR* (p valor)	IC 95%*
<i>PKLR</i> rs4971072 A>G	AA	40 (0.26)	133 (0.27)	-			
	AG	77 (0.51)	235 (0.49)	0.91 (0.70)	[0.59-1.42]	0.94 (0.81)	[0.60-1.47]
	GG	35 (0.23)	116 (0.24)	0.99 (0.99)	[0.59-1.67]	1.10 (0.71)	[0.64-1.88]
	Alelo A	157 (0.52)	501 (0.52)	-			
	Alelo G	147 (0.48)	467 (0.48)	0.99 (0.98)	[0.69-1.43]	1.04 (0.81)	[0.71-1.52]
	Carreador G	112 (0.74)	351 (0.73)	0.94 (0.77)	[0.62-1.42]	0.99 (0.97)	[0.65-1.51]

*correção para a co-variável sexo.

A análise do SNP rs11264355 (C>G), referente ao gene *PKLR*, mostrou que as frequências alélicas e genótípicas não sofreram desvio de Hardy-Weinberg (HWE) em casos ($\chi^2=6.10^{-6}$, $p=0.99$) e controles ($\chi^2=0.14$, $p=0.70$). Conforme Tabela 4.21, este SNP não apresentou uma associação significativa entre casos e controles (genótipo CG (OR*=1,01, $p=0,92$), genótipo GG (OR*=1,24, $p=0,44$), alelo G (OR*=1,09, $p=0,64$), carreador G (OR*=1,06, $p=0,72$)).

Tabela 4.21: Frequências alélicas e genótípicas do SNP rs11264355 (gene *PKLR*) em casos e controles do município de Rio Branco/AC, relativas ao estudo de associação com a hanseníase. Legenda: IC (Intervalo de confiança), OR (Razão das chances).

SNP	Genótipo/Alelo	CASO N = 165	CONTROLE N = 488	OR (p valor)	IC 95%	OR* (p valor)	IC 95%*
<i>PKLR</i> rs11264355 C>G	CC	62 (0.39)	198 (0.37)	-			
	CG	75 (0.47)	247 (0.47)	1.03 (0.87)	[0.70-1.51]	1.01 (0.92)	[0.68-1.50]
	GG	24 (0.15)	84 (0.16)	1.09 (0.73)	[0.64-1.87]	1.24 (0.44)	[0.70-2.20]
	Alelo C	199 (0.62)	643 (0.61)	-			
	Alelo G	123 (0.38)	415 (0.39)	1.04 (0.81)	[0.72-1.50]	1.09 (0.64)	[0.75-1.58]
	Carreador G	99 (0.63)	(0.65)	1.04 (0.80)	[0.72-1.50]	1.06 (0.72)	[0.73-1.55]

*correção para a co-variável sexo.

A análise do SNP rs3213545 (G>A), referente ao gene *OASL*, mostrou que as frequências alélicas e genóticas estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) em casos ($\chi^2=0.53$, $p=0.46$) e controles ($\chi^2=0.24$, $p=0.62$). Este SNP não apresentou uma associação significativa entre casos e controles (genótipo GA (OR*=0,90, $p=0,61$), genótipo AA (OR*=0,68, $p=0,26$), alelo A (OR*=0,85, $p=0,44$), carreador A (OR*=0,85, $p=0,42$)), conforme Tabela 4.22.

Tabela 4.22: Frequências alélicas e genóticas do SNP rs3213545 (gene *OASL*) em casos e controles do município de Rio Branco/AC, relativas ao estudo de associação com a hanseníase. Legenda: IC (Intervalo de confiança), OR (Razão das chances).

SNP	Genótipo/Alelo	CASO N = 165	CONTROLE N = 488	OR (p valor)	IC 95%	OR* (p valor)	IC 95%*
OASL rs3213545 G>A	GG	80 (0.52)	302 (0.56)	-			
	GA	58 (0.38)	203 (0.37)	0.92 (0.69)	[0.63-1.35]	0.90 (0.61)	[0.61-1.33]
	AA	15 (0.10)	39 (0.07)	0.68 (0.25)	[0.36-1.31]	0.68 (0.26)	[0.35-1.33]
	Alelo G	218 (0.71)	807 (0.74)	-			
	Alelo A	88 (0.29)	281 (0.26)	0.86 (0.46)	[0.57-1.28]	0.85 (0.44)	[0.56-1.28]
	Carreador A	73 (0.48)	242 (0.44)	0.87 (0.47)	[0.61-1.25]	0.85 (0.42)	[0.59-1.24]

*correção para a co-variável sexo.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram encontradas algumas dificuldades no seu início e na sua execução. No que se refere ao início, destaco a demora para aprovação do projeto junto ao CEP/UFAC, que levou quase um ano para ocorrer. Além disso, devido a impasses institucionais, houve atraso na compra de materiais/equipamentos para o início da execução do projeto, o que também levou cerca de um ano. Desta forma, só consegui iniciar as coletas para desenvolvimento do projeto quase dois anos depois do ingresso no doutorado.

Em relação a execução do projeto, houve dificuldades na localização do endereço (endereços inexistentes) e na realização de contato telefônico (telefones fora de área de cobertura ou inexistentes) com os pacientes de hanseníase cadastrados pelo serviço de saúde, o que dificultou o acompanhamento de pacientes e a vigilância de contatos. Isto se deve em parte pela falta de um monitoramento mais eficaz dos pacientes e da coleta de dados pela equipe de saúde. No entanto, parece ter grande influência do estigma relacionado à doença, como apontado por alguns autores (Harris, 2011; Staples, 2011). Nesse sentido, a falta de informações sobre os pacientes nos prontuários físicos e no SINAN dificultou/impossibilitou o estabelecimento de relações entre os resultados obtidos e a caracterização da doença. Problemas similares foram relatados por outros autores (Galvao *et al.*, 2008; Bovendorp *et al.*, 2014).

Desta forma, com o intuito de minimizar estes problemas, antes da coleta de amostras, os dados (nome, telefone e endereço) dos pacientes e contatos foram solicitados, possibilitando consultar as informações de interesse (baciloscopia, forma clínica, tratamento, entre outras) no sistema. No entanto, para que fosse possível localizar a ficha no SINAN, as informações prestadas pelos pacientes deveriam estar exatamente iguais aquelas registradas no sistema, o que não acontecia algumas vezes. Além disso, o SINAN só apresenta informações a partir de 1990, o que dificultou o levantamento de informações dos pacientes anteriores a este período. Nesse sentido, as informações anteriores a 1990 se encontravam em prontuários físicos no HC/Acre, onde não existia nenhum tipo de registro digital das mesmas. É importante destacar também que nem todas as informações de interesse estavam preenchidas nas Fichas de Notificação (SINAN), principalmente nas fichas mais antigas (em papel). Como apontado por Galvao *et al.* (2008), o uso de dados secundários a partir do SINAN muitas vezes se torna difícil, já que apresentam

várias inconsistências (erros na entrada de dados, duplicidade ou não preenchimento das informações). No entanto, estas inconsistências vêm sendo reduzidas devido às análises atuais utilizadas e pela melhoria na qualidade da entrada dos dados nos últimos anos. Por outro lado, a entrada dos dados é realizada a nível municipal e, mesmo com contínuos treinamentos e o uso de uma mesma versão do sistema de notificação, ainda há heterogeneidade na qualidade das informações.

Diante das dificuldades apontadas, surgiu a necessidade de se realizar a análise espacial da hanseníase no município de Rio Branco/AC por bairros, permitindo um levantamento das áreas mais endêmicas para a doença, possibilitando um direcionamento futuro para a ação dos serviços de saúde, como apontado por Bakker *et al.* (2009). Além disso, esta análise também se mostra importante porque segundo Silva *et al.* (2017), apesar da maioria das áreas endêmicas para a hanseníase ser localizada na região norte e centro-oeste, quase um terço dos estudos sobre a doença são realizados na região sudeste.

Atualmente, o acompanhamento de pacientes e a avaliação clínica da doença em contatos no município de Rio Branco é realizada por meio da ação conjunta do Hospital das Clínicas do Acre (antiga Fundação Hospitalar) e da Vigilância Epidemiológica Municipal. Inicialmente, os Agentes Comunitários de Saúde (ACS) realizam a notificação de casos novos da doença através de visitas domiciliares (busca ativa) ou da ida da população ao Posto de Saúde (demanda espontânea). Estes casos suspeitos são encaminhados para avaliação clínica junto ao HC/Acre para realização do exame clínico. Além disso, a Vigilância Epidemiológica Municipal realiza visitas para avaliar os contatos intradomiciliares dos pacientes diagnosticados clinicamente pelo Hospital das Clínicas, de forma a manter a vigilância de contatos.

No início das coletas, foram realizadas visitas domiciliares, onde foi constatado que muitas residências possuíam condições sanitárias (falta de rede de esgoto) e de higiene (lixo, sujeira, etc) precárias, onde muitas casas eram de madeira (típicas da população de baixa renda no estado). Estas residências se situavam em bairros que reúnem parte da população de menor poder aquisitivo do município de Rio Branco. Diante destas observações e considerando a cadeia de transmissão da doença, é possível associar, de um modo geral, a doença à população que apresenta condições socioeconômicas desfavoráveis, como apontado por Sampaio *et al.* (2013). Nos demais municípios do estado do Acre a situação não é diferente, apresentando-se muitas vezes ainda mais precária.

Foi observado durante a coleta das amostras que familiares e até cônjuges não sabiam que o paciente tinha a doença. Segundo Durães *et al.* (2005), doentes e familiares não estão atentos para qualquer contato que tenham tido com a doença, e muitas vezes, desconhecem a presença de algum doente em sua família. Este é um grande problema no que se refere ao controle da cadeia de transmissão da doença, a vigilância de contatos e o registro de casos novos. Em um estudo, Fernandes *et al.* (2014) destacaram vários fatores de risco relacionados à transmissão da hanseníase, entre eles a existência de casos atuais na família (que aumenta o risco de adoecer em 2,9 vezes), a presença da doença em contatos domiciliares e a localização de moradias em áreas endêmicas. Esse estudo evidenciou ainda uma relação da doença com aglomerados de pessoas no mesmo domicílio, hábitos de agregação familiar/social, características dos domicílios, condições desfavoráveis da população e baixo nível de escolaridade. Nesse sentido, a orientação sobre a hanseníase para a população em geral é de fundamental importância para a redução deste preconceito, bem como para a prevenção e tratamento da doença.

A partir dos dados obtidos junto a Vigilância Epidemiológica Municipal, foi possível observar que entre os 1122 casos novos de hanseníase registrados no período de 2006 a 2016, 457 pacientes foram classificados como Paucibacilares e 665 pacientes classificados como Multibacilares. O número elevado de pacientes multibacilares merece destaque. Isto pode sugerir que devido a inexistência de métodos eficazes de diagnóstico para a doença junto aos serviços de saúde, o número de pacientes paucibacilares pode estar subnotificado. Além disso, a falta de um diagnóstico clínico preciso por parte dos profissionais de saúde fora dos centros de referência para a doença leva erroneamente ao tratamento de pacientes paucibacilares como multibacilares, o que eleva o número deste grupo operacional. Nesse sentido, tendo em vista que a evolução da doença é lenta (meses a anos), uma pergunta que deve ser feita é se o número de casos novos da doença registrados por ano não está subestimado, como discutido na literatura (Lapa *et al.*, 2006), levando em consideração a ausência de uma metodologia de diagnóstico precoce da doença e a estratégia adotada para a vigilância de contatos.

Apesar da taxa de detecção (1,62/10.000 habitantes) para a hanseníase no ano de 2016 no município de Rio Branco/AC se mostrar alta e a taxa de prevalência acumulada (29,76/10.000 habitantes) da doença no período 2006-2016 se apresentar como hiperendêmica, o estado do Acre não está mais no grupo dos 10 principais clusters de hanseníase do país, de acordo com a última classificação da

OMS (WHO, 2013). Seria importante rever estes dados, tendo em vista que outros municípios do estado do Acre apresentam uma endemicidade da doença maior que o município de Rio Branco.

Além disso, era esperado um número mais elevado de casos novos da doença e da taxa de detecção média nos triênios avaliados em relação a Regional Souza Araújo (bairros Albert Sampaio (nº 47), Dom Moacir (nº 49) e Santa Cecília (nº 48)), tendo em vista o elevado número de pacientes curados para a doença que formam a população destes bairros, provenientes da Casa de Acolhida Souza Araújo. Isto se justificaria pela possibilidade da ocorrência de recidivas e reinfecção na população curada, resultando em uma maior ocorrência de casos novos. No entanto, isto não foi observado, o que pode refletir uma subnotificação de casos novos para a doença nestes bairros.

Este estudo confirmou a endemicidade da hanseníase no município de Rio Branco/AC, apresentando taxa de prevalência acumulada alta, muito alta ou hiperendêmica na maioria dos bairros no período avaliado (2006-2016). A taxa de detecção média também se apresentou alta, muito alta ou hiperendêmica na maioria dos bairros nos triênios 2006-2008 e 2010-2012, havendo uma redução no triênio 2014-2016. No entanto, muitos bairros ainda eram classificados como hiperendêmicos (27,41%, taxa bruta; 31,86%, taxa suavizada) no último triênio avaliado, o que pode representar um risco para a população destes bairros. Segundo o ILEP (2011), os coeficientes de detecção podem ser analisados sob dois pontos de vista: o primeiro, reflete a transmissão ativa da hanseníase, que gera casos novos na área; o segundo, a possível existência de prevalência oculta, que identifica mais casos através de estratégias e planejamentos para o controle da doença. Nesse sentido, a tendência decrescente na taxa de detecção média no município não deve levar à diminuição dos esforços pelas autoridades locais e profissionais de saúde, pois os dados sugerem a persistência da endemia, como apontado na literatura (Andrade & Ignotti, 2008; Ministério da Saúde, 2013).

A suavização dos dados brutos pelo método Bayesiano Empírico Local possibilitou a construção de mapas com coeficientes corrigidos, ponderando a detecção do bairro pela média da sua vizinhança. Os resultados desta suavização se apresentaram ainda mais críticos (“piores”) em relação aos dados brutos, uma vez que alguns bairros não possuíam informações (número de casos novos e/ou população). Desta forma, alguns bairros apresentaram uma taxa de detecção média baixa em relação aos bairros vizinhos e, com a suavização pelo método Bayesiano

Empírico Local, geraram taxas de detecção média mais altas (Barreto *et al.*, 2014; Barreto *et al.*, 2015).

Como demonstrado em outras regiões do Brasil (Amaral & Lana, 2008; Moreira *et al.*, 2008; Hino *et al.*, 2011), a distribuição da hanseníase nos bairros do município de Rio Branco/AC foi caracterizada de forma bastante heterogênea, não respeitando os limites das regionais ou qualquer outro fator geográfico/ambiental. No entanto, as taxas de detecção e de prevalência se apresentaram mais elevadas nos bairros com menor infraestrutura e com uma população residente de menor poder aquisitivo, sugerindo uma forte influência de baixas condições socioeconômicas com a doença, como apontado por alguns autores da literatura (Madeira, 2006; Bakker *et al.*, 2006; Imbiriba *et al.*, 2009).

Para a realização da análise espacial é fundamental que os dados relacionados a doença e a população sejam compatíveis. No entanto, o que foi observado neste estudo é que as informações sobre a doença (contatos registrados, examinados e casos novos) obtidas no sistema (SINAN NET) são registradas por bairro. Outras informações, como renda e escolaridade, são registradas por setor censitário pelo IBGE durante a realização do Censo e estimadas no período intercensitário. Já a divisão do esgoto sanitário pela DEPASA ocorre por troncos de redes de esgoto, não seguindo limites de bairros ou setores censitários. Além disso, as informações sobre a população por bairro foram atualizadas pela Prefeitura no ano de 2005, tendo que ser estimada por unidades consumidoras junto a Eletrobrás/AC. Estas informações desconexas e desatualizadas dificultam a associação de fatores sociais e ambientais com determinadas doenças. Além disso, não foi possível obter informações sobre todos os bairros do município, o que prejudicou a realização da análise espacial. Diante do que foi exposto acima, não possível estabelecer neste trabalho uma relação de diferentes fatores com a doença, uma vez que requer uma análise mais aprofundada dos dados.

Além disso, o Software QGIS utilizado neste estudo possibilita que informações de geolocalização realizadas com aparelhos de GPS possam ser plotadas em mapas no programa. Esta estratégia possibilita uma ação de mapeamento das residências de pacientes, contatos e casos suspeitos para a doença pela ação dos ACS e/ou da Vigilância Epidemiológica Municipal, de forma que facilite a localização das residências e as ações de contenção da hanseníase. Esta estratégia pode contribuir também para a construção de mapas de risco para outras doenças. Para

isso, é necessário que políticas públicas voltadas para a saúde sejam melhoradas e priorizadas.

Nesse sentido, o estudo da análise espacial da hanseníase forneceu informações que não seriam visualizadas apenas com dados tabulares. Essa identificação fornece dados claros e precisos sobre as áreas em que a doença está efetivamente instalada, apresentando maior risco para a transmissão, evidenciando os bairros que merecem maior atenção. Assim sendo, o estudo realizado pode servir como aporte para o planejamento de políticas públicas de saúde para a doença junto ao município de Rio Branco e ao estado do Acre, destacando as áreas com maior vulnerabilidade à hanseníase. Assim, seria possível realizar uma busca ativa para a doença nos bairros mais endêmicos, por meio da reunião de uma equipe multidisciplinar para realizar a avaliação clínica dermatológica, bem como a coleta de amostras da população. A utilização desta estratégia é de fundamental importância e deveria ser priorizada pelos órgãos competentes, ainda mais no estado do Acre, onde este mapeamento ainda não havia sido realizado. Além disso, também deve ser realizado um trabalho de educação em saúde junto à população por meio de palestras e orientações, de forma que se possa evitar a disseminação da doença.

A utilização dos testes rápidos NDO-LID e ML-Flow (PGL-1) neste estudo objetivou avaliar a soropositividade de pacientes e contatos intradomiciliares, bem como a prevalência da doença na população do município de Rio Branco/AC. Uma vez comprovada sua eficácia, os testes rápidos podem ser usados para a triagem inicial da doença em contatos intradomiciliares e na busca ativa de casos novos.

Em relação aos resultados, cabe destacar a alta positividade (48,6%) dos testes rápidos de pacientes multibacilares tratados. Isto ocorreu muito provavelmente devido a titulação dos anticorpos para o patógeno, que ficam circulantes nos pacientes tratados durante um tempo (meses a anos) mesmo após o tratamento. No entanto, não podemos descartar também a possibilidade de reinfeção, recidiva ou resistência medicamentosa em relação a doença. No que se refere a positividade dos testes rápidos dos contatos de pacientes multibacilares, é interessante destacar que isto ocorreu em contatos de pacientes não-tratados (100%) ou que estavam em tratamento (57,1%). Isto leva a sugerir que boa parte destes contatos podem ter entrado em contato com o patógeno antes do início do tratamento dos pacientes ou que, de acordo com a fase de tratamento da doença ou com o paciente, a carga bacilar pode permanecer alta, sendo passível de transmissão. Esta suspeita reforça

a necessidade de triagem e diagnóstico precoce, de forma a interromper a cadeia de transmissão da doença.

Outro resultado interessante se refere a positividade para o teste rápido NDO-LID de alguns pacientes que tiveram a doença nas décadas de 1960 e 1970, os quais residem até hoje na Casa de Acolhida Souza Araújo. Isto nos faz atentar mais uma vez para a questão ambiental em relação a manutenção/transmissão da doença, onde alguns destes pacientes, muito provavelmente aqueles em que a genética favorece o desenvolvimento da doença e/ou que possuem a saúde mais debilitada, podem se reinfectar em contato com o patógeno ambiental. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

Em relação aos testes rápidos NDO-LID, foi observada uma positividade mais baixa que a encontrada em outros trabalhos da literatura (Cardoso *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2014; Frade *et al.*, 2017). Muito provavelmente, isto se deve ao fato de terem sido realizados a partir de amostras de sangue total, que interfere na sensibilidade do teste devido ao grupamento heme da hemoglobina, a fatores de coagulação e outros interferentes do sangue, prejudicando assim a visualização e a interpretação dos testes. Este processo se torna ainda mais crítico devido ao fato de o teste rápido ter sido aplicado em campo, cuja visualização e interpretação após 20 minutos muitas vezes se torna impraticável. Isto ocorre porque os grupamentos presentes no sangue, em contato com o ar, sofrem oxidação, tornando a leitura do teste inviável. Dos testes realizados, alguns se apresentaram claramente positivos para a doença. Outros apresentaram bandas mais claras ou ainda uma linha bem fina na linha de teste T (que indica positividade), o que dificulta a classificação do teste. Além disso, no manual do teste NDO-LID (OL Hanseníase) não existe nenhuma referência sobre as variações de intensidade da linha T (que indica positividade). Alguns trabalhos utilizam scores para classificar estas variações de intensidade em 1+/1,5+/2+ ou +/++/+++ . Neste trabalho, foi adotada a classificação de score Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2) e Positividade alta (+3), de forma a manter um padrão em relação ao teste rápido ML-Flow (PGL-1) também avaliado. Foi possível observar que o grupo de pacientes multibacilares apresentou um predomínio de positividade média (+2) (18,5%) e baixa (+1) (23,5%). Já o grupo de pacientes paucibacilares (15,2%) e o grupo de contatos intradomiciliares (28,6%), apresentaram um predomínio de positividade baixa (+1). Além disso, devido a venda da empresa Orange Life para uma empresa Chinesa, que acabou triplicando o valor

de mercado do produto, tornou inviável a compra de mais testes rápidos NDO-LID para a conclusão deste estudo.

A utilização dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) revelou um resultado mais satisfatório em relação aos testes rápidos NDO-LID, talvez por terem sido realizados a partir de amostras de soro. Os testes realizados foram classificados de acordo com o score em: Negativo (0), Positividade baixa (+1), Positividade média (+2), Positividade alta (+3) e Positividade muito alta (+4). Foi possível observar que o grupo de pacientes multibacilares não apresentou um predomínio de positividade nos testes realizados: muito alta (+4) (20,7%), alta (+3) (13,8%), média (+2) (17,2%) e baixa (+1) (20,7%). Já o grupo paucibacilar apresentou um predomínio de positividade baixa (+1) (28,5%). O grupo de contatos intradomiciliares (23,8%) e o grupo controle (27%) também apresentou um predomínio de positividade baixa (+1). É importante destacar o alto percentual de falso-positivos em contatos intradomiciliares (40,5%) e no grupo controle (30,3%), conforme observado em outros trabalhos da literatura (Penna *et al.*, 2016; Frade *et al.*, 2017). Estes dados poderiam descartar sua utilização para a triagem da doença e dificultar o uso exclusivo dos testes rápidos para diagnóstico da hanseníase. No entanto, novos estudos com a utilização de testes rápidos devem ser realizados para sua validação.

Além disso, devido a presença do grupo controle no estudo, foi possível avaliar a eficácia dos testes rápidos ML-Flow (PGL-1) de pacientes multibacilares e paucibacilares. Estes resultados se mostraram condizentes com a literatura (Buhrer-Sekula *et al.*, 2003; Moura, 2014) e com um estudo desenvolvido em Manaus em parceria com nosso laboratório (dados não publicados). Trabalhos mostram que a sensibilidade de alguns tipos de teste rápido (NDO-LID, NDO, LID ou PGL-1) em pacientes multibacilares variam de 80% a 95%, enquanto em pacientes paucibacilares variam de 15% a 64% (Cardoso *et al.*, 2013; Duthie *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2014; Amorim *et al.*, 2016). Estes dados são corroborados por Moura *et al.* (2008), que relatou que a detecção de anticorpos em pacientes paucibacilares, quando detectável, é menor em relação aos pacientes multibacilares.

A utilização de testes rápidos neste trabalho revelou alguns fatores limitantes, como o uso de amostras de sangue para realização do teste. Isto acaba prejudicando uma das principais finalidades dos testes rápidos, que é a sua utilização no campo (point-of-care). Desta forma, ficou evidente neste estudo, assim como em alguns trabalhos da literatura, que apesar de terem sido utilizados testes rápidos diferentes, a utilização do soro como amostra para a realização de testes

rápidos se apresentou melhor em relação a utilização do sangue. Outro fator limitante observado é que a leitura visual dos testes rápidos é relativa, uma vez que depende da interpretação do leitor. Desta forma, seria interessante que a leitura dos testes rápidos fosse realizada de forma automatizada com o uso de um aplicativo gratuito para *Smartphones*, não existentes no mercado atualmente. Existem leitores deste tipo no mercado, como o *Smart Reader* (NDO-LID SR, Orange Life, Rio de Janeiro, Brasil), mas tem que ser adquiridos junto a Empresas, o que não é a realidade de muitos projetos. Além disso, para possibilitar a comparação de testes rápidos em diferentes trabalhos, seria interessante adotar um padrão de classificação para um determinado tipo de teste rápido.

Nesse sentido, apesar da eficácia apresentada pelos testes rápidos em trabalhos da literatura, o resultado do teste rápido deve ser confirmado pela utilização de outras metodologias, como por exemplo a análise molecular (qPCR), que se mostra mais específica e sensível que a técnica sorológica. Esperava-se que a partir destas análises fosse possível validar o uso dos testes rápidos e estabelecer uma relação entre o número de genomas do *M. leprae* e a positividade do teste. No entanto, devido ao baixo número de amostras de pacientes não-tratados para a hanseníase, não foi possível avaliar esta relação mais profundamente. A partir dos resultados iniciais obtidos (dados não mostrados), parece não haver uma relação direta entre o número de genomas e a positividade do teste. Foram observados pacientes positivos para a qPCR com o número de genomas elevado que se mostraram negativos para os testes rápidos (NDO-LID/PGL-1). Houve também casos onde os testes rápidos foram positivos e a qPCR negativa. Desta forma, a soropositividade parece estar mais relacionada à resposta imune do hospedeiro, determinada pelo seu perfil genético, que varia de acordo com a área endêmica de estudo (Penna *et al.*, 2016).

Os resultados dos testes rápidos obtidos neste e em outros trabalhos da literatura, vêm comprovar a eficácia desta metodologia mesmo apresentando algumas limitações, que uma vez aperfeiçoada (busca de novos alvos que tornem os testes rápidos mais específicos e sensíveis; uso de aplicativos gratuitos para leitura dos testes rápidos; padronização do score de classificação, etc), poderá ser usada em maior escala para triagem inicial da doença em contatos intradomiciliares e na busca ativa de casos novos de hanseníase.

O diagnóstico molecular para a hanseníase ainda é utilizado como forma complementar de diagnóstico em relação a avaliação clínica padrão da doença. No

futuro, com seu aperfeiçoamento, esta técnica molecular pode vir a ser, juntamente com os testes rápidos sorológicos, ferramentas utilizadas na triagem e no diagnóstico precoce da hanseníase.

Os resultados obtidos através do método de diagnóstico molecular (qPCR) neste estudo apresentaram um alto índice de eficiência (100%) em pacientes multibacilares não-tratados ou no início do tratamento (até três meses de tratamento). É importante destacar que estes pacientes apresentavam índices baciloscópicos altos (IB = +3, +4 ou +5). Em pacientes multibacilares em tratamento há mais de seis meses ou que já haviam encerrado o tratamento (doze meses), a técnica utilizada não conseguiu detectar a presença do DNA do patógeno. Já em pacientes paucibacilares prospectivos, a eficiência do diagnóstico molecular foi baixa (9,1%). Segundo alguns autores (Martinez *et al.*, 2006; Scollard *et al.*, 2006b; Rudeeaneksin *et al.*, 2008), a positividade para as formas clínicas multibacilares (MB) chega a 100%, enquanto para as formas paucibacilares (PB) fica entre 34-80%. Foi possível perceber, quase na totalidade dos casos, uma relação direta entre a positividade da qPCR e da baciloscopia. É relevante destacar também que neste estudo poucos contatos foram positivos para a qPCR. Merece destaque o elevado número de contatos negativos de pacientes não-tratados (95,7%). Estes resultados sugerem para além da dificuldade natural de detecção do patógeno em amostras de raspado intradérmico auricular de pacientes paucibacilares e contatos intradomiciliares, possíveis problemas na coleta das amostras.

Em relação às amostras positivas para a qPCR do grupo de estudo retrospectivo (pacientes curados que tiveram a doença na década de 1970 ou em 2014), provavelmente se tratam de casos de reinfecção para a doença, uma vez que não foram considerados clinicamente como recidivas. Além disso, é importante destacar que alguns dos contatos intradomiciliares de pacientes retrospectivos (principalmente aqueles que tiveram a doença nas décadas de 1970 e 1980) desenvolveram a doença, fizeram o tratamento e ficaram curados. Estes contatos intradomiciliares foram classificados neste estudo como pacientes. A partir desta constatação, cada vez mais se faz necessário a orientação e o acompanhamento dos contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase.

Alguns trabalhos da literatura vêm mostrando a utilização do diagnóstico molecular no monitoramento da eficiência da poliquimioterapia (Kampirapap *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2001), onde confirmou que a morte do *M. leprae* ocorre rapidamente após um mês (cerca de 50%) e depois vai decaindo gradativamente,

podendo persistir um sinal fraco muito tempo após o tratamento (Singh *et al.*, 1999; Katoch *et al.*, 2002; Nóbrega Martínez, 2009). Nesse sentido, a PCR em tempo real quantitativa (qPCR), devido a sua maior sensibilidade e especificidade em relação a outras técnicas, poderia ser utilizada não somente como uma ferramenta de suporte ao diagnóstico clínico da hanseníase, mas também como uma estratégia de diagnóstico precoce e de acompanhamento do tratamento da doença junto ao SUS.

Algumas limitações foram encontradas na realização deste estudo, como o período de coleta de amostras (2016-2017), o baixo número de casos novos da doença por ano no município de Rio Branco (50 a 60 casos novos/ano), as amostras serem coletadas pelo corpo técnico do HC/Acre somente na minha presença (01 coleta semanal, o que resultou na não-coleta da amostra de muitos pacientes não-tratados, principalmente porque muitos pacientes só retornavam a unidade de referência após o início do tratamento para avaliação). No entanto, a utilização de pacientes em tratamento e já tratados para a doença nos possibilitou observar uma relação interessante entre a fase do tratamento e a positividade para a doença em relação aos testes rápidos e a qPCR, além de levantar mais uma vez a discussão sobre reinfecção, recidiva e resistência medicamentosa. A amostra de linfa obtida através do raspado intradérmico auricular apresenta normalmente uma quantidade muito pequena do bacilo, o que dificulta sua detecção. Além disso, é importante destacar que a técnica de coleta do raspado auricular não é simples e se apresenta dolorosa para muitas pessoas. Devido à perda de prioridade e interesse acerca da doença no âmbito acadêmico (cursos de Enfermagem e Medicina), isto pode reduzir o alerta e a habilidade dos profissionais para sua detecção e técnica de coleta (raspado auricular) na rotina dos serviços de saúde (Freitas, 2015).

Alguns trabalhos vêm mostrando que é possível realizar o diagnóstico do *M. leprae* em amostras de sangue de pacientes para a hanseníase, porém ainda sem muita eficiência (Almeida *et al.*, 2004; Goulart *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2014). Neste estudo, algumas amostras de pacientes multibacilares que foram positivas para a qPCR em amostras de raspado auricular (apresentaram um número de genomas do bacilo bastante elevado – Cts mais baixos), também foram positivas em amostras de sangue (número de genomas do bacilo menor – Cts mais altos) (dados não mostrados). Nesse sentido, seria de grande valia o desenvolvimento de uma técnica mais eficaz para extração de DNA de *M. leprae* a partir de amostras de sangue de pacientes, uma vez que a coleta de sangue é mais simples (rotineira) e possibilita a obtenção de uma maior quantidade de amostra em relação ao raspado auricular.

Além disso, os dados quantitativos obtidos (número de genomas do bacilo) podem vir a ser utilizados como estratégia para o acompanhamento de contatos intradomiciliares.

É pertinente destacar que das amostras coletadas para a realização deste estudo, obtidas no Hospital das Clínicas do Acre (HC/Acre), que representa o Centro de Referência de Hanseníase no Estado do Acre, 131 amostras foram provenientes de pacientes residentes em Rio Branco (61,5%), 76 amostras de pacientes residentes em outros municípios do Acre (35,68%) e 06 amostras de pacientes residentes em outros estados (2,82%). Os dados relacionados à notificação de casos fora do município de residência mostram um fluxo de pacientes de municípios menores em direção a municípios considerados referências para o atendimento da hanseníase. A opção pela busca do serviço de diagnóstico em outra cidade pode traduzir uma melhor qualidade no serviço de saúde deste município ou algumas vezes a ausência deste serviço no município de residência (Aquino *et al.*, 2003; Alencar *et al.*, 2008). Desta forma, o atendimento inicial de casos realizado em outro município pode influenciar diretamente os indicadores de contatos examinados, causando um prejuízo para a identificação de casos novos a partir do exame de contatos. É importante destacar também que a proximidade do município de Rio Branco com vários municípios vizinhos favorece um fluxo migratório constante desta população, o que dificulta a atuação dos serviços de saúde. O acompanhamento de contatos deve ser realizado desde o momento do diagnóstico, no decorrer do tratamento da doença e se necessário após a alta por cura. O Ministério da Saúde do Brasil, através do Programa Nacional de Controle da Hanseníase, enfatizou a redução da detecção da doença, integrando serviços de controle da hanseníase no sistema municipal de saúde, minimizando o estigma através de campanhas de saúde pública (Brasil, 2010b). No entanto, as taxas de detecção da doença ainda permanecem altas em todo o país.

Recentemente, no Simpósio Estratégias para Detectar e Interromper a Transmissão Global da Hanseníase, ocorrido na Fiocruz/RJ nos dias 30 e 31 de maio de 2017, promovido pela Fundação Oswaldo Cruz em parceria com a Fundação Novartis, que reuniu alguns dos maiores especialistas nacionais e internacionais em hanseníase, foram discutidas estratégias inovadoras nas áreas de diagnóstico e prevenção, que podem contribuir para o sucesso no enfrentamento da doença. Neste evento foi anunciado que dentro de dois anos pode estar disponível no SUS o teste molecular para diagnóstico precoce da hanseníase, devido aos

estudos realizados por nosso grupo, liderados pelo Dr. Milton Ozório Moraes (IOC/Fiocruz).

Considerando a progressiva redução de custos ocorrida na última década referentes a análise molecular de amostras por PCR em Tempo Real (qPCR), onde atualmente o custo total por amostra (kit de extração (R\$ 16,00) + qPCR (R\$ 8,40)) é de cerca de R\$ 24,00, aliada à sua sensibilidade e especificidade, é extremamente plausível sua utilização em larga escala junto ao SUS para o diagnóstico de doenças. Desta forma, esta metodologia poderia ser utilizada para o diagnóstico precoce da hanseníase, que levaria em médio prazo à redução do número de casos novos de hanseníase, reduzindo os elevados custos com o tratamento da doença.

Assim, os resultados da análise molecular (qPCR) deste estudo, como de outros trabalhos do nosso grupo e de pesquisadores na área, vêm confirmando a eficácia deste método molecular no diagnóstico precoce de hanseníase, o que pode resultar na utilização desta metodologia como diagnóstico ouro para a doença junto ao SUS, contribuindo para a interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase. No entanto, independentemente da existência de métodos sorológicos e moleculares, ainda não ocorre a aplicação dessas metodologias na rotina da atenção básica, tornando difícil o diagnóstico e a classificação clínica da doença. Apesar da existência de todas estas tecnologias, para que ocorra o controle da hanseníase no Brasil e no mundo são necessárias parcerias, grande mobilização social e vontade política dos gestores. Nessa perspectiva, o Programa Saúde da Família existente no país associado ao papel dos Agentes Comunitários de Saúde (ACS) deveria ser intensificado em relação a vigilância de contatos, de forma a identificar precocemente casos novos da doença e auxiliar no tratamento de pacientes, contribuindo assim para a interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase.

O estudo do tipo caso-controle tem sido muito utilizado para verificar a associação de diversas regiões do genoma com a hanseníase (Cardoso *et al.*, 2011; de Sales Marques *et al.*, 2013; Marques, 2014; Bezerra, 2015). Nesse sentido, Bezerra (2015) demonstrou, em sua dissertação de Mestrado realizada em nosso laboratório, que os SNPs rs11264355, rs4620533 e rs4971072 (gene *PKLR*) estão associados ao risco de desenvolvimento da hanseníase na população do Rio de Janeiro, sugerindo que a associação do gene *PKLR* ocorreu devido à maior porcentagem de ancestralidade africana em casos comparados aos controles avaliados neste estudo. Em uma pesquisa realizada em Rondonópolis (Mato Grosso do Sul), ainda não publicada, não houve a reprodução dos achados no Rio de

Janeiro. A análise da ancestralidade nessa população indicou que não há diferenças entre a ancestralidade europeia, africana e ameríndia entre os grupos de casos e controles, o que pode justificar a ausência da associação do gene *PKLR* neste grupo populacional. Além disso, provavelmente outros genes também estejam atuando nestes desfechos fenotípicos. Foi observado que a diminuição da expressão de *OASL* durante a infecção por *M. leprae* parece possuir um efeito microbicida. Isto sugere a participação do gene *OASL* no favorecimento da infecção e a ocorrência do SNP rs3213545 parece influenciar na susceptibilidade à infecção pelo patógeno (Robottom-Ferreira, 2011; Pinto, 2013; de Toledo-Pinto *et al.*, 2016).

No presente trabalho, polimorfismos nos genes *PKLR* (rs4620533, rs4971072, rs11264355) e *OASL* (rs3213545) foram avaliados como marcadores de susceptibilidade para a hanseníase na população do município de Rio Branco/AC como estratégia de replicação de achados anteriores para esses genes.

A partir destas análises, foi possível observar que não houve uma diferença significativa entre as frequências dos genótipos e alelos no grupo de casos e controles avaliados para os SNPs rs4620533, rs4971072 e rs11264355 (gene *PKLR*), mesmo após a correção pela co-variável sexo. Não foi possível realizar a correção para a co-variável etnia, devido à falta de informações precisas sobre o grupo de estudo. Sabe-se que a presença dos marcadores de suscetibilidade no gene *PKLR* associados à hanseníase na população do Rio de Janeiro está relacionada à presença da ancestralidade Africana. Nesse sentido, considerando que a população do Acre apresenta influência das regiões nordeste e sul do Brasil, sugerimos que a frequência de ancestralidade africana nesta população não é tão forte como a observada no Rio de Janeiro. Desta forma, espera-se que não haja diferenças de ancestralidade entre os grupos de casos e controles de Rio Branco, o que poderia justificar os resultados de associação obtidos.

A partir da análise de polimorfismos no gene *OASL* (rs3213545), mesmo após a correção pela co-variável sexo, não foi possível observar diferença significativa entre as frequências dos genótipos e alelos no grupo de casos e controles. Estudos recentes do nosso grupo (manuscrito em preparação) realizados na população do Rio de Janeiro sugerem que, assim como foi mostrado para o gene *PKLR*, o gene *OASL* também é alvo de pressão seletiva e parece ser influenciado pela ancestralidade. Foi observado que a frequência do genótipo GG (majoritário para o gene *OASL* (rs3213545)), estava aumentada no grupo de casos, conferindo a essa população susceptibilidade à doença. Ainda, de acordo com o Projeto 1000

Genomas (*1000 Genomes Project*), a frequência deste genótipo aparece aumentada nas populações africanas quando comparadas às populações europeias. Portanto, assim como para o gene *PKLR*, a suscetibilidade à hanseníase para o gene *OASL* encontrada na população do Rio de Janeiro também parece ser justificada pela diferença de ancestralidade entre casos e controles.

Entretanto, para melhor entender estes resultados de associação, estimativas de ancestralidade para esses genes serão realizadas futuramente na população do município de Rio Branco/AC, com o intuito de comparar as porcentagens de ancestralidade entre os casos e controles do Acre com populações de outras regiões do Brasil utilizadas nos estudos de replicação para a doença.

Desta forma, os resultados de associação e os dados de ancestralidade em cada grupo populacional do estudo caso-controle para a hanseníase podem contribuir para a compreensão da susceptibilidade/resistência genética à doença na população brasileira. Em conjunto, os resultados deste trabalho permitiram a replicação dos estudos de associação prévios do laboratório na população do município de Rio Branco/AC, além de caracterizar um estudo inédito de associação genética com a hanseníase em indivíduos da região.

Nesse sentido, a partir das estratégias avaliadas neste trabalho, foi possível realizar de forma direta ou indireta: o mapeamento da hanseníase (análise epidemiológica/espacial), destacando as áreas de maior vulnerabilidade; a triagem da doença (testes rápidos), para a avaliação de contatos intradomiciliares e na busca ativa de casos novos; o diagnóstico precoce e o acompanhamento do tratamento da doença (qPCR); a compreensão da imunopatogênese da hanseníase (genotipagem de SNPs). No entanto, estudos adicionais são necessários para a validação e otimização destas metodologias.

Por fim, são apresentadas algumas propostas de ações como medidas que podem contribuir para a interrupção da cadeia de transmissão da doença.

- **IDENTIFICAÇÃO:** Mapeamento dos bairros mais endêmicos para a hanseníase através da Análise Espacial. Esta ação facilita a intervenção dos serviços de saúde nestes bairros, por meio da promoção de palestras junto a população, visando a educação em saúde. Isto pode contribuir para a conscientização e desmistificação do preconceito junto à população.

- **TRIAGEM:** Realização da busca ativa de casos novos da doença nos bairros mais endêmicos para a hanseníase, por meio da utilização de testes rápidos. Além disso, os serviços de saúde poderiam utilizar esta estratégia para avaliação de contatos intradomiciliares de pacientes multibacilares.
- **DIAGNÓSTICO:** Confirmação do diagnóstico clínico da hanseníase em pacientes não-tratados, através da análise molecular (qPCR). Esta proposta também poderia ser utilizada para o diagnóstico precoce da doença em contatos intradomiciliares (positivos para o teste rápido).
- **TRATAMENTO:** Manutenção do uso da poliquimioterapia em pacientes (com a busca de fármacos mais eficazes e com menor efeito colateral em relação aos utilizados atualmente), a utilização da dose única de Rifampicina para contatos intradomiciliares de pacientes multibacilares (visando a interrupção da cadeia de transmissão da doença) e a avaliação do tratamento por qPCR.



Figura 5.1: Propostas de ações para a identificação, triagem, diagnóstico e tratamento da hanseníase.

6. CONCLUSÃO

- A análise epidemiológica revelou que a taxa de detecção para a hanseníase no ano de 2016 no município de Rio Branco/AC se mostrou alta e a taxa de prevalência acumulada da doença no período 2006-2016 se apresentou como hiperendêmica.
- A análise espacial realizada neste estudo confirmou a endemicidade da hanseníase no município de Rio Branco/AC, apresentando taxa de prevalência acumulada alta, muito alta ou hiperendêmica na maioria dos bairros no período avaliado (2006-2016). A taxa de detecção média se apresentou alta, muito alta ou hiperendêmica na maioria dos bairros nos triênios 2006-2008 e 2010-2012, havendo uma redução no triênio 2014-2016. No entanto, muitos bairros ainda eram classificados como hiperendêmicos no último triênio avaliado. Estas taxas foram mais elevadas nos bairros com menor infraestrutura e população residente de menor poder aquisitivo.
- Os resultados dos testes rápidos (NDO-LID e PGL-1) obtidos neste trabalho comprovam a eficácia desta metodologia mesmo com algumas limitações, que uma vez aperfeiçoada, poderá ser usada em maior escala para triagem inicial da doença em contatos intradomiciliares e na busca ativa de casos novos de hanseníase.
- A análise molecular (qPCR) deste estudo, assim como de outros trabalhos do nosso grupo, confirmou a eficácia deste método molecular no diagnóstico precoce de hanseníase, demonstrando que a utilização desta metodologia como estratégia de diagnóstico precoce e de acompanhamento do tratamento da doença junto ao SUS pode ser bem-sucedida.
- A partir da genotipagem de SNPs para os genes *PKLR* (rs4620533, rs4971072, rs11264355) e *OASL* (rs3213545) realizada neste trabalho, foi possível observar que não houve uma diferença significativa entre as frequências dos genótipos e alelos no grupo de casos e controles, provavelmente devido a uma influência da ancestralidade na ocorrência destes polimorfismos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abelha L. Trabalhar e viver no Brasil. *Cadernos Saúde Coletiva*. 2014; 22(4): 319-320.

Alcais A, Abel L, Casanova JL. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *The Journal of clinical investigation*. 2009 Sep 1; 119(9): 2506-14.

Alencar C, Barbosa J, Ramos Jr A, Alencar M, Pontes R, Castro C, et al. Hanseníase no município de Fortaleza, CE, Brasil: aspectos epidemiológicos e operacionais em menores de 15 anos (1995-2006). *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2008; 61(spe): 694-700.

Alencar, CH. Padrões epidemiológicos da hanseníase em área de alto risco de transmissão nos Estados do Maranhão, Pará, Tocantins e Piauí, 2001-2009. Fortaleza. Tese [Doutorado em Associação Ampla em Saúde Coletiva] – Universidade Federal do Ceará; 2011.

Almeida EC, Martinez AN, Maniero VC, Sales AM, Duppre NC, Sarno EN, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004 Aug; 99(5): 509-11.

Alter A, Grant A, Abel L, Alcais A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mammalian genome*. 2011 Feb 1; 22(1-2): 19-31.

Alves J, Machado P, Silva J, Gonçalves N, Ribeiro L, Faustino P, et al. Analysis of malaria associated genetic traits in Cabo Verde, a melting pot of European and sub Saharan settlers. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2010 Jan 15; 44(1): 62-8.

Amaral E, Lana F. Análise espacial da Hanseníase na microrregião de Almenara, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2008; 61(spe): 701-707.

Amorim FM, Nobre ML, Ferreira LC, Nascimento LS, Miranda AM, Monteiro GR, et al. Identifying leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-NDO. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016 Sep 22; 10(9): e0004934.

Andrade V, Ignotti E. Secular trends of new leprosy cases diagnosed in Brazil during 1987-2006. *Indian journal of leprosy*. 2008; 80(1): 31-8.

Antunes SL, Chimelli L, Jardim MR, Vital RT, Nery JA, Corte-Real S, et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012 Mar; 107(2): 246-53.

Aquino D, Caldas A, Silva A, Costa J. Perfil dos pacientes com hanseníase em área hiperendêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003; 36(1): 57-64.

Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 May; 36(3): 373-82.

Araújo S, Lobato J, Reis ÉD, Souza DO, Gonçalves MA, Costa AV, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012 Dec; 107: 55-9.

Avaliação de Testes Diagnósticos. [Internet]. 2018 [cited 5 February 2018]; Available from: <https://posstrictosensu.iptsp.ufg.br/up/59/o/Modulo2-Avaliacaodetestesdiagnosticos.pdf>

Avanzi C, del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science*. 2016 Nov 11; 354(6313): 744-7.

Avanzi C. Genomics: a Swiss army knife to fight leprosy. EPFL; 2018.

Ayi K, Min-Oo G, Serghides L, Crockett M, Kirby-Allen M, Quirt I, et al. Pyruvate kinase deficiency and malaria. *New England Journal of Medicine*. 2008 Apr 24; 358(17): 1805-10.

Azevedo MD, Ramuno NM, Fachin LR, Tassa M, Rosa PS, Belone AD, et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2017 Jan 1; 21(1): 71-8.

Bahmanyar ER, Smith WC, Brennan P, Cummings R, Duthie M, Richardus JH, et al. Leprosy diagnostic test development as a prerequisite towards elimination: requirements from the user's perspective. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016 Feb 11; 10(2): e0004331.

Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Van Mosseveld P, Faber WR, Klatser PR. Fatores de risco para o desenvolvimento de hanseníase-um estudo de coorte de base populacional na Indonésia. *Lepr Rev*. 2006; 77: 170.

Bakker MI, Scheelbeek PF, Van Beers SM. The use of GIS in leprosy control. *Lepr Rev.* 2009 Sep 1; 80(3): 327-1.

Barreto JG, Bisanzio D, de Souza Guimarães L, Spencer JS, Vazquez-Prokopec GM, Kitron U, et al. Spatial analysis spotlighting early childhood leprosy transmission in a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon region. *PLoS neglected tropical diseases.* 2014 Feb 6; 8(2): e2665.

Barreto JG, Bisanzio D, Frade MA, Moraes TM, Gobbo AR, de Souza Guimarães L, et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC infectious diseases.* 2015 Dec; 15(1): 527.

Barth-Jaeggi T, Steinmann P, Mieras L, van Brakel W, Richardus JH, Tiwari A, et al. Leprosy Post-Exposure Prophylaxis (LPEP) programme: study protocol for evaluating the feasibility and impact on case detection rates of contact tracing and single dose rifampicin. *BMJ open.* 2016 Nov 1; 6(11): e013633.

Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loiseau C, Girma S, Busso P, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature communications.* 2018 Jan 24; 9(1): 352.

Bezerra, OC. Análise de polimorfismos no gene PKLR e associação com a hanseníase. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2015.

Bivand R, Piras G. Comparing implementations of estimation methods for spatial econometrics. American Statistical Association. 2015.

Bivand R, Keitt T, Rowlingson B. rgdal: Bindings for the geospatial data abstraction library. R package version 1.2.16. 2017.

Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg-van JJ, et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. *PLoS neglected tropical diseases.* 2014 Apr 10; 8(4): e2773.

Bovendorp AC, Oliveira MB, Saleme OS, Lyon S, Bastos MD. Qualidade de registros de hanseníase em centro de referência no estado de Minas Gerais, no período de 2006 a 2010. *Rev Méd Minas Gerais.* 2014; 24(Supl 6): S61-5.

Braet S, Vandelannoote K, Meehan CJ, Fontes AB, Hasker E, Rosa PS, et al. The repetitive element RLEP is a highly specific target for the detection of *Mycobacterium leprae*. *Journal of clinical microbiology.* 2018 Jan 5: JCM-01924.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº. 165/Bsb, de 14 de maio de 1976. Resolve sobre a Política de Controle da hanseníase. Diário Oficial da República Federativa do Brasil nº. 111. Brasília, Nov. 1976.

Brasil. Ministério da Saúde. Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço. Brasília: Ministério da Saúde, 1989.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Hanseníase. In: Guia de vigilância epidemiológica. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. Diário Oficial da União. 2010b.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Acre. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia prático sobre a hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

Brasil MT, Oliveira LR, Rímoli NS, Cavallari F, Gonçalves OS, Lessa ZL, et al. Sorologia Anti PGL-1 e risco de ocorrência de hanseníase em área de alta endemicidade do Estado de São Paulo: quatro anos de seguimento. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2003; 6: 262-71.

Brennan PJ, Cho SN, Klatser PR. Bangkok Workshop on Leprosy Research: Immunodiagnosics, including skin tests. International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases. 1996 Dec 1; 64 (4): S58.

Browne SG. The history of leprosy. Leprosy. 1985; 1: 1-4.

Bührer SS, Smits HL, Gussenhoven GC, Van Ingen CW, Klatser PR. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1998 Feb 1; 58(2): 133-6.

Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. Journal of clinical Microbiology. 2003 May 1; 41(5): 1991-5.

Bührer-Sékula S, Visschedijk J. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. Lepr Rev. 2007; 78: 70-9.

Camargo EP. Doenças tropicais. Estudos avançados. 2008; 22(64): 95-110.

Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. Future Microbiology. 2011 May; 6(5): 533-49.

Cardoso LP, Dias RF, Freitas AA, Hungria EM, Oliveira RM, Collovati M, et al. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. BMC infectious diseases. 2013 Dec; 13(1): 497.

Carvalho JD. Epidemias em escala mundial e no Brasil. Estudos avançados. 2008 Dec; 22(64): 7-17.

Castro MC, Singer BH. Meio ambiente e saúde: metodologia para análise espacial da ocorrência de malária em projetos de assentamento. Revista Brasileira de Estudos de População. 2007 Aug 14; 24(2): 247-62.

Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. Nature Reviews Genetics. 2012 Mar; 13(3): 175.

Chen YY, Huang XB, Xiao Y, Jiang Y, Shan XW, Zhang J, et al. Spatial analysis of schistosomiasis in Hubei Province, China: a GIS-based analysis of schistosomiasis from 2009 to 2013. PloS one. 2015 Apr 7; 10 (4): e0118362.

Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT, Balagon MV, Abalos RM, et al. Detection of Phenolic Glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in Sera from Leprosy Patients before and after Start of Multidrug Therapy. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2001 Jan 1; 8(1): 138-42.

Cocito C, Delville J. Biological, chemical, immunological and staining properties of bacteria isolated from tissues of leprosy patients. *European journal of epidemiology*. 1985 Sep 1; 1 (3): 202-31.

Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998 Jun; 393 (6685): 537.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001 Feb; 409 (6823): 1007.

Coura, JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

Cury MR, Paschoal VD, Nardi SM, Chierotti AP, Rodrigues Júnior AL, Chiaravalloti-Neto F. Spatial analysis of leprosy incidence and associated socioeconomic factors. *Revista de Saúde Pública*. 2012 Feb; 46 (1): 110-8.

de Paus RA, van Wengen A, Schmidt I, Visser M, Verdegaal EM, van Dissel JT, et al. Inhibition of the type I immune responses of human monocytes by IFN- α and IFN- β . *Cytokine*. 2013 Feb 1; 61 (2): 645-55.

de Sales Marques C, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LT, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *The Journal of infectious diseases*. 2013 Apr 1; 208 (1): 120-9.

da Silva Neumann A, de Almeida Dias F, da Silva Ferreira J, Fontes AN, Rosa PS, Macedo RE, et al. Experimental infection of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* indicates potential for leprosy transmission. *PloS one*. 2016 May 20; 11 (5): e0156037.

de Souza MM, Netto EM, Nakatani M, Duthie MS. Utility of recombinant proteins LID-1 and PADL in screening for *Mycobacterium leprae* infection and leprosy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014 Jun 7; 108 (8): 495-501.

de Toledo-Pinto TG, Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Rodrigues LS, Batista-Silva LR, Silva BJ, et al. STING-dependent 2'-5' oligoadenylate synthetase-like production is required for intracellular *Mycobacterium leprae* survival. *The Journal of infectious diseases*. 2016 May 14; 214 (2): 311-20.

Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunology & Cell Biology*. 2000 Aug 1; 78 (4): 318-24.

Demangel C, Bertolino P, Britton WJ. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *European journal of immunology*. 2002 Apr 1; 32 (4): 994-1002.

Dominguez B. Hanseníase: problema persistente. *Radis: Comunicação em Saúde*. 2015 Mar; 150: 24-6.

Duarte-Cunha M, Souza-Santos R, Matos HJ, Oliveira ML. Aspectos epidemiológicos da hanseníase: uma abordagem espacial. *Cadernos de Saúde Pública*. 2012 Jun; 28 (6): 1143-55.

Düppre NC, Camacho LA, Sales AM, Illarramendi X, Nery JA, Sampaio EP, et al. Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012 Jun 19; 6 (6): e1711.

Durães SM, Guedes LS, Cunha MD, Cavaliere FA, Oliveira ML. Estudo de 20 focos familiares de hanseníase no município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro. *An Bras Dermatol*. 2005; 80(supl. 3): S295-300.

Duthie MS, Hay MN, Rada EM, Convit J, Ito L, Oyafuso LK, et al. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2011 Oct 1; 30 (10): 1257-65.

Duthie MS, Balagon MF, Maghanoy A, Orcullo FM, Cang M, Dias RF, et al. Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. *Journal of clinical microbiology*. 2014 Feb 1; 52 (2): 613-9.

Erazo C, Pereira SM, Costa MD, Evangelista-Filho D, Braga JU, Barreto ML. Tuberculosis and living conditions in Salvador, Brazil: a spatial analysis. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2014 Jul; 36 (1): 24-30.

Fabri, AC. Análise comparativa da reatividade anti-LID-1, NDO-LID, NDO-HSA e PGL-1 em hanseníase. Belo Horizonte. Tese [Doutorado em Enfermagem] – Universidade Federal de Minas Gerais; 2015.

Fava V, Orlova M, Cobat A, Alcaïs A, Mira M, Schurr E. Genetics of leprosy reactions: an overview. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012 Dec; 107: 132-42.

Feenstra SG, Nahar Q, Pahan D, Oskam L, Richardus JH. Recent food shortage is associated with leprosy disease in Bangladesh: a case-control study. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011 May 10; 5 (5): e1029.

Fernandes KB, Alves DM, Mangueira JO. Fatores de risco para a transmissão da hanseníase. Rev Digit Buenos Aires. 2014;195:12. Disponível em: <http://www.efdeportes.com>.

Ferreira, J., Neumann, A., Uzedo, C., Rangel, C., Pessolani, M., et al. Analysis of persistence of *Mycobacterium leprae* in *Amblyomma cajennense* e *Rhodnius Prolixus* after infection by artificial feeding. In: 18th International Leprosy Congress Hidden challenges Brussels, 16-19 September. 2013. Disponível em: http://www.leprosyila.org/arquivos/leprosy_congress.pdf.

Frade MA, de Paula NA, Gomes CM, Vernal S, Bernardes Filho F, Lugão HB, et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. PLoS neglected tropical diseases. 2017 Feb 23; 11 (2): e0005375.

Freitas, LR. Tendências temporais, distribuição espacial e fatores associados à ocorrência de hanseníase no Brasil, 2001 a 2012. Brasília. Tese [Doutorado em Medicina Tropical] – Universidade de Brasília; 2015.

Galvao PR, Ferreira AT, Maciel MD, de Almeida RP, Hinders D, Schreuder PA, et al. An evaluation of the Sinan health information system as used by the Hansen's disease control programme, Pernambuco State, Brazil. Leprosy review. 2008 Jun 1; 79 (2): 171-83.

Gatrell AC, Bailey TC. Interactive spatial data analysis in medical geography. Social Science & Medicine. 1996 Mar 1; 42 (6): 843-55.

Gauy JS, Hino P, Santos CB. Spatial distribution of leprosy cases in Ribeirão Preto, Brazil, 2004. Revista latino-americana de enfermagem. 2007 Jun; 15 (3): 460-5.

Gelber RH, Li F, Cho SN, Byrd S, Rajagopalan K, Brennan PJ. Serum antibodies to defined carbohydrate antigens during the course of treated leprosy. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association. 1989 Dec; 57 (4): 744-51.

Goulart IM, Goulart LR. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. Archives of dermatological research. 2008 Jul 1; 300 (6): 269-90.

Hacker MD, Duppre NC, Nery JA, Sales AM, Sarno EN. Characteristics of leprosy diagnosed through the surveillance of contacts: a comparison with index cases in Rio de Janeiro, 1987-2010. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2012 Dec; 107: 49-54.

Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. American journal of clinical pathology. 2008 Dec 1; 130 (6): 856-64.

Hanafi-Bojd AA, Vatandoost H, Oshaghi MA, Charrahy Z, Haghdoost AA, Zamani G, et al. Spatial analysis and mapping of malaria risk in an endemic area, south of Iran: a GIS based decision making for planning of control. *Acta tropica*. 2012 Apr 1; 122 (1): 132-7.

Harris K. Pride and prejudice: identity and stigma in leprosy work. *Leprosy review*. 2011; 82 (2): 135-46.

Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, et al. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infection and immunity*. 2002 Sep 1; 70 (9): 5167-76.

He X, Jing Z, Cheng G. MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *BioMed research international*. 2014.

Hino P, Villa TC, Cunha TN, Santos CB. Distribuição espacial de doenças endêmicas no município de Ribeirão Preto (SP). *Ciência & Saúde Coletiva*. 2011; 16: 1289-94.

Hooij A, Fat EM, Eeden SJ, Wilson L, da Silva MB, Salgado CG, et al. Field-friendly serological tests for determination of *M. leprae*-specific antibodies. *Scientific reports*. 2017 Aug 21; 7 (1): 8868.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estados: Acre. 2017 [acesso em 24 jul 2017]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=ac>.

ILEP. The interpretation of epidemiological indicators in leprosy. Technical Bulletin. 2011 [acesso em 01 dec 2011]. Disponível em: http://www.ilep.org.uk/fileadmin/uploads/Documents/Technical_Bulletins/tb11eng.pdf.

Imbiriba EN, Silva Neto AL, Souza WV, Pedrosa V, Cunha MD, Garnelo L. Desigualdade social, crescimento urbano e hanseníase em Manaus: abordagem espacial. *Revista de Saúde Pública*. 2009 Jul 17; 43: 656-65.

Ishibashi M, Wakita T, Esumi M. 2', 5'-Oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral replication in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010 Feb 12; 392 (3): 397-402.

Jacobasch G, Rapoport SM. Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. *Molecular aspects of medicine*. 1996 Apr 1; 17 (2): 143-70.

Jardim MR, Antunes SL, Simons BR, Wildenbeest JG, Nery JA, Illarramendi XI, et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Leprosy review*. 2005 Sep 1; 76 (3): 232-40.

- Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DN. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2008 Feb; 83 (1): 75-82.
- Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriyawipart S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*. 1998 Mar 1; 66 (1): 16.
- Kampirapap K. Assessment of subclinical leprosy infection through the measurement of PGL-1 antibody levels in residents of a former leprosy colony in Thailand. *Leprosy review*. 2008 Sep 1; 79 (3): 315.
- Katoch VM. Advances in the diagnosis and treatment of leprosy. *Expert reviews in molecular medicine*. 2002 Jul; 4 (15): 1-4.
- Kerr-Pontes LR, Barreto ML, Evangelista CM, Rodrigues LC, Heukelbach J, Feldmeier H. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case-control study. *International journal of epidemiology*. 2006 Apr 27; 35 (4): 994-1000.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature medicine*. 2003 May; 9 (5): 525.
- Kumar S, Naqvi RA, Bhat AA, Rani R, Ali R, Agnihotri A, et al. IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. *Immunobiology*. 2013 Dec 1; 218 (12): 1488-96.
- Lanza, FM. Avaliação da atenção primária no controle da hanseníase: validação de instrumentos e análise do desempenho de municípios endêmicos do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte. Tese [Doutorado em Enfermagem] – Universidade Federal de Minas Gerais; 2014.
- Lapa TM, Albuquerque MD, Carvalho MS, Silveira Júnior JC. Análise da demanda de casos de hanseníase aos serviços de saúde através do uso de técnicas de análise espacial. *Cadernos de Saúde Pública*. 2006; 22: 2575-83.
- Lastória JC, Abreu MA. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. *Diagn Tratamento*. 2012 Oct; 17 (4): 173-9.
- Lavana M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infection, Genetics and Evolution*. 2008 Sep 1; 8 (5): 627-31.

Lima-Bezerra OC. Estudo caso-controle de polimorfismos no gene PKLR e associação com a hanseníase. Rio de Janeiro. Monografia [UNIRIO] – Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*. 2006 Mar 24; 311 (5768): 1770-3.

Lobato J, Costa MP, de Melo Reis É, Goncalves MA, Spencer JS, Brennan PJ, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Leprosy review*. 2011 Dec 1; 82 (4): 389.

Lockwood DN, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bulletin of the World Health Organization*. 2005 Mar; 83 (3): 230-5.

Loughry WJ, Truman RW, McDonough CM, Tilak MK, Garnier S, Delsuc F. Is leprosy spreading among nine-banded armadillos in the southeastern United States? *Journal of wildlife diseases*. 2009 Jan; 45 (1): 144-52.

Mabunda NEJ. Estudo de polimorfismos de TNF, IL-10, LTA4H, PKLR e associação com a tuberculose na população Moçambicana. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Machado P, Pereira R, Rocha AM, Manco L, Fernandes N, Miranda J, et al. Malaria: looking for selection signatures in the human PKLR gene region. *British journal of haematology*. 2010 Jun 1; 149 (5): 775-84.

Madeira ES. OS Espaços de Transmissão da Hanseníase: Domicílio, Trabalho e Relações de Vizinhança. Vitória. Dissertação [Mestrado em Atenção à Saúde Coletiva] – Universidade Federal do Espírito Santo; 2006.

Magalhães MD, Rojas LI. Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2007 Jun; 16 (2): 75-84.

Marques CS. Associação de genes da resposta imune na hanseníase e episódios reacionais. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2014.

Marques LÉ, Frota CC, Quetz JD, Bindá AH, Mota RM, Andrade Pontes MA, et al. Evaluation of 16S rRNA qPCR for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal secretion and skin biopsy samples from multibacillary and paucibacillary leprosy cases. *Pathogens and global health*. 2017 Dec 12(just-accepted):1-22.

Marquet S, Schurr E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. *Drug metabolism and disposition*. 2001 Apr 1; 29 (4): 479-83.

Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. 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*. 2006 Sep 1; 44 (9): 3154-9.

Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011 Oct 11; 5 (10): e1354.

Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014 Apr 10; 8 (4): e2655.

Marzliak ML, Silva RC, Nogueira W, Guisard CL, Ferreira ME, Metello HN, et al. Breve histórico sobre os rumos do controle da Hanseníase no Brasil e no Estado de São Paulo. *Hansenologia Internationalis (Online)*. 2008; 33 (2): 39-43.

Masaki T, McGlinchey A, Cholewa-Waclaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambukkana A. Innate Immune Response Precedes *Mycobacterium leprae*-Induced Reprogramming of Adult Schwann Cells. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*. 2014 Feb 1; 16 (1): 9-17.

Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian journal of leprosy*. 1999; 71 (1): 61-7.

Melchjorsen J, Kristiansen H, Christiansen R, Rintahaka J, Matikainen S, Paludan SR, et al. Differential regulation of the OASL and OAS1 genes in response to viral infections. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 2009 Apr 1; 29 (4): 199-208.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988 Feb 11; 16 (3): 1215.

Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. Caderno 7. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hanseníase no Brasil: dados e indicadores epidemiológicos selecionados. Brasília: Ministério da Saúde, 2009b.

Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2013; vol. 44 (11): 1-12.

Min-Oo G, Fortin A, Tam MF, Nantel A, Stevenson MM, Gros P. Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nature genetics*. 2003 Dec; 35 (4): 357.

Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the human genome. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2010 Dec 1; 74 (4): 589-620.

Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *The Journal of infectious diseases*. 2006 Feb 1; 193 (3): 346-53.

Moet FJ, Pahan D, Oskam L, Richardus JH. Effectiveness of single dose rifampicin in preventing leprosy in close contacts of patients with newly diagnosed leprosy: cluster randomised controlled trial. *Bmj*. 2008 Apr 3; 336 (7647): 761-4.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005 May 13; 308 (5724): 1040-2.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature genetics*. 2009 Dec; 41 (12): 1282.

Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell host & microbe*. 2009 Oct 22; 6 (4): 343-53.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA Expression in Leprosy: A Possible Role of Interferon- and Interleukin-12 in Reactions (RR and ENL). *Scandinavian journal of immunology*. 1999; 50: 541-9.

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Leprosy review*. 2006 Sep 1; 77 (3): 189-202.

Moreira MV, Waldman EA, Martins CL. Hanseníase no Estado do Espírito Santo, Brasil: uma endemia em ascensão? *Cadernos de Saúde Pública*. 2008 Jul; 24 (7): 1619-30.

Moura RS, Calado KL, Oliveira ML, Bühner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41: 11-8.

Moura, RS. Avaliação de diferentes métodos para classificação de pacientes e de carreadores de antígenos empregados na sorologia da hanseníase. Goiânia. Tese [doutorado] – Universidade Federal de Goiás; 2014.

Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *The Journal of Immunology*. 2007 Jan 1; 178 (1): 338-44.

Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clinics in dermatology*. 2015 Jan 1; 33 (1): 90-8.

Nóbrega Martínez, A. Detecção de *Mycobacterium leprae* através da técnica de PCR e RT-PCR em tempo real. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Celular e Molecular] – Instituto Oswaldo Cruz; 2009.

Nogueira MES, Coelho KIR, Fleury RN, Arrudas MSP. Inoculação de *Mycobacterium leprae* na bolsa júgal do hamster. *Hansen Int* 1999; 24 (1): 5-14.

O'Connell RM, Saha SK, Vaidya SA, Bruhn KW, Miranda GA, Zarnegar B, et al. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2004 Aug 16; 200 (4): 437-45.

Oldenburg R, Demangel C. Pathogenic and immunosuppressive properties of mycobacterial phenolic glycolipids. *Biochimie*. 2017 Oct 1; 141: 3-8.

Opromolla DV. Recidiva ou reação reversa. *Hansen int*. 1994 Jul; 19 (1): 10-6.

Ottenhoff TH. *Mycobacterium leprae* and demyelination. *Science*. 2002 Aug 30; 297 (5586): 1475-6.

Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Disease markers*. 2009; 27 (3-4): 173-86.

Parkash O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2009 Jan 1; 55 (1): 1-5.

Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *Jama*. 2008 Mar 19; 299 (11): 1335-44.

Peeling RW, Mabey D, Herring A, Hook EW. Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections? *Nature Reviews Microbiology*. 2006 Dec; 4 (12): 909.

Penna ML, Penna GO, Iglesias PC, Natal S, Rodrigues LC. Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases: Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016 May 18; 10(5): e0004703.

Pereira AC. Hanseníase: genética ou não genética? Não mais uma questão. *Hansenologia Internationalis (Online)*. 2010; 35 (2): 5-6.

Pessolani MC, de Melo Marques MA, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes and infection*. 2003 Jun 1; 5 (7): 677-84.

Pinto, TG. Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de interferon tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular] –Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *Journal of clinical microbiology*. 1990 Sep 1; 28 (9): 1913-7.

PNUD, Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. Atlas do desenvolvimento humano. Taxa de analfabetismo, índice de Gini e IDH-M do ano de 2010 [acesso em 21 jul 2016]. Disponível em: <http://www.atlasbrasil.org.br/2013/pt/consulta>.

Prefeitura Municipal de Rio Branco. Decreto Municipal nº 674, de 27 de maio de 2014. Publicado no D.O.E., nº 11.314 de 28/05/2014. Pág. 127/130.

Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? *Leprosy: a genetic disease*. *An Bras Dermatol*. 2007; 82 (5): 451-9.

Qayum A, Arya R, Kumar P, Lynn AM. Socio-economic, epidemiological and geographic features based on GIS-integrated mapping to identify malarial hotspots. *Malaria journal*. 2015 Dec; 14 (1): 192.

Qiagen. DNeasy Blood & Tissue: Quick Start Protocol. 2011 [acesso em 20 fev 2018]. Disponível em: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=21b4511b-4aaa-470a-a141-191ed91c54be&lang=en>.

Queiroz JW, Dias GH, Nobre ML, Dias MC, Araújo SF, Barbosa JD, et al. Geographic information systems and applied spatial statistics are efficient tools to study Hansen's disease (leprosy) and to determine areas of greater risk of disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010 Feb 1; 82 (2): 306-14.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2017.

Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Current opinion in microbiology*. 2001 Feb 1; 4 (1): 21-7.

Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med* 2013; 19: 1597–608.

Reis EM, Araujo S, Lobato J, Neves AF, Costa AV, Gonçalves MA, et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clinical microbiology and infection*. 2014 May 1; 20 (5): 447-52.

Reveiz L, Buendía JA, Téllez D. Chemoprophylaxis in contacts of patients with leprosy: systematic review and meta-analysis. *Revista panamericana de salud pública*. 2009 Oct; 26 (4): 341-9.

Richardus RA, van der Zwet K, van Hooij A, Wilson L, Oskam L, Faber R, et al. Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017 Dec 11; 11 (12): e0006083.

Ritz C, Spiess AN. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics*. 2008 May 14; 24 (13): 1549-51.

Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 BC). *PloS one*. 2009 May 27; 4 (5): e5669.

Robottom-Ferreira, AB. Estudos moleculares da interação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann: uma abordagem de expressão gênica. Rio de Janeiro. Tese [doutorado em Biologia Computacional e Sistemas] – Instituto Oswaldo Cruz; 2011.

Rodrigues LC, Lockwood DN. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *The Lancet infectious diseases*. 2011 Jun 1; 11 (6): 464-70.

Romero EC, Pimenta F, Diament D. *Neglected Infectious Diseases: Mechanism of Pathogenesis, Diagnosis, and Immune Response. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2012.

Roy MF, Riendeau N, Bédard C, Hélie P, Min-Oo G, Turcotte K, et al. Pyruvate kinase deficiency confers susceptibility to *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 2007 Nov 26; 204 (12): 2949-61.

Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, Sittiwakin T, Likanonsakul S, Pasadorn S, et al. LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2008 Oct 8; 54 (2): 263-70.

Sales AM, de Leon AP, Düppre NC, Hacker MA, Nery JA, Sarno EN, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011 Mar 15; 5 (3): e1013.

Sampaio PB, Bertolde AI, Maciel EL, Zandonade E. Correlation between the spatial distribution of leprosy and socioeconomic indicators in the city of Vitória, State of ES, Brazil. *Lepr Rev*. 2013 Dec 1; 84 (4): 256-65.

Santos AR, Balassiano V, Oliveira ML, Pereira MA, Santos PB, Degrave WM, et al. 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*. 2001 Nov; 96 (8): 1123-33.

Santos SM, Barcellos C. *Abordagens espaciais na saúde pública*. Brasília: Ministério da Saúde. 2006.

Santos SM, Souza-Santos R. *Sistemas de Informações Geográficas e análise espacial na saúde pública*. Brasília: Ministério da saúde. 2007.

Santos SM, Souza WV. *Introdução à estatística espacial para a saúde pública*. Brasília: Ministério da Saúde/Fundação Oswaldo Cruz. 2007.

Sauer ME, Salomão H, Ramos GB, Espindula HR, Rodrigues RS, Macedo WC, et al. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. *Clinics in dermatology*. 2015 Jan 1; 33 (1): 99-107.

Schenk M, Fabri M, Krutzik SR, Lee DJ, Vu DM, Sieling PA, et al. Interleukin-1 β triggers the differentiation of macrophages with enhanced capacity to present mycobacterial antigen to T cells. *Immunology*. 2014 Feb 1; 141 (2): 174-80.

Schuenemann VJ, Singh P, Mendum TA, Krause-Kyora B, Jäger G, Bos KI, et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science*. 2013 Jun 13: 1238286.

Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the Human Toll-Like Receptor 1 Gene Is Related to Leprosy and Leprosy Reactions. *The Journal of infectious diseases*. 2009 Jun 15; 199 (12): 1816-9.

Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *American journal of clinical pathology*. 1998 May 1; 109 (5): 642-6.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clinical microbiology reviews*. 2006a Apr 1; 19 (2): 338-81.

Scollard DM, Joyce MP, Gillis TP. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clinical Infectious Diseases*. 2006b Jul 15;43(2): e19-22.

Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Disease models & mechanisms*. 2013 Jan 1; 6 (1): 19-24.

Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infection and immunity*. 2013 Jul 1; 81 (7): 2645-59.

Silva CL, Fonseca SC, Kawa H, Palmer DD. Spatial distribution of leprosy in Brazil: a literature review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2017 Aug; 50 (4): 439-49.

Silva EA, Rosa PS, Faria A, Belone F, Maria N, Tomimori J. Serodiagnosis of leprosy and follow-up of household contacts using a commercial rapid test containing ND-O/LID-1 antigens. *Lepr Rev*. 2017 Jun 1; 88: 174-83.

Silva RM, da Farias Pinto HR, Costa SG, da F Pinto KR. Modelagem geoespacial e temporal da hanseníase entre 2001 e 2011 no município de Bayeux, Paraíba. Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde. 2012 Dec 1; 8 (15).

Silveira RP, Damasceno D, Muniz V, Lagoas VL, Raele S, Oliveira PP. Tendência da epidemia de hanseníase no estado do Acre: evolução das formas clínicas de 1996 a 2006. Cad Saúde Coletiva. 2009; 17 (1): 163-74.

Singh HB, Katoch K, Natrajan M, Sharma RK, Gupta UD, Sharma VD, et al. Effect of treatment on PCR positivity in multibacillary leprosy patients treated with conventional and newer drugs ofloxacin and minocycline. Acta leprologica. 1999; 11 (4): 179-82.

Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. Future microbiology. 2011 Jan; 6 (1): 57-71.

Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015 Apr 7; 112 (14): 4459-64.

Smith WC, Aerts A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. Lepr Rev. 2014 Mar 1; 85 (1): 2-17.

Souza C, Anna WJ, da Lima RS. Distribuição espacial da epidemia hanseníase em menores de 15 anos em Juazeiro-Bahia, entre 2003 e 2012. Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde. 2014 Dec 1; 10 (19): 35.

Souza C, Rodrigues M. Magnitude, tendência e espacialização da hanseníase em menores de 15 anos no estado da Bahia, com enfoque em áreas de risco: um estudo ecológico. Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde. 2015 Jun 1; 11 (20): 201.

Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. Leprosy review. 2011 Dec 1; 82 (4): 344.

Staples J. Interrogating leprosy 'stigma': why qualitative insights are vital. Leprosy review. 2011 Jun 1; 82 (2): 91.

Stefani MM. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008; 41: 89-94.

Steinmann P, Reed SG, Mirza F, Hollingsworth TD, Richardus JH. Innovative tools and approaches to end the transmission of *Mycobacterium leprae*. The Lancet Infectious Diseases. 2017 Sep 1; 17 (9): e298-305.

Su X, Yee LJ, Im K, Rhodes SL, Tang Y, Tong X, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in interferon signaling pathway genes and interferon-stimulated genes with the response to interferon therapy for chronic hepatitis C. Journal of hepatology. 2008 Aug 1; 49 (2): 184-91.

Talwar G, Sarathchandra K, Walia R, Parida S, Pandey R, Rani R, et al. Immunoprophylactic effects of the anti-leprosy Mw vaccine in household contacts of leprosy patients: clinical field trials with a follow up of 8–10 years. Lepr Rev. 2005; 76: 127-43.

Teles RM, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. Science. 2013 Mar 22; 339 (6126): 1448-53.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. New England Journal of Medicine. 2011 Apr 28; 364 (17): 1626-33.

Tsegaw T, Gadisa E, Seid A, Abera A, Teshome A, Mulugeta A, et al. Identification of environmental parameters and risk mapping of visceral leishmaniasis in Ethiopia by using geographical information systems and a statistical approach. Geospatial health. 2013; 7 (2): 299-308.

Turankar RP, Lavania M, Chaitanya VS, Sengupta U, Darlong J, Darlong F, et al. Single nucleotide polymorphism-based molecular typing of *M. leprae* from multicase families of leprosy patients and their surroundings to understand the transmission of leprosy. Clinical Microbiology and Infection. 2014 Mar 1; 20(3): O142-9.

Ura S, Opromolla DVA. Noções de Hansenologia. Epidemiologia. 2000 [acesso em 21 jun 2016]. Disponível em: http://hansen.bvs.isl.br/textoc/livros/OPROMOLLA_DILTOR_nocoas/PDF/epide.pdf.

Vieira, ML. Os rumos da cidadania das pessoas atingidas pela hanseníase: uma análise do papel do Morhan no contexto da Constituição de 1988. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Serviço Social] – Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro; 2009.

Warke RV, Khaja K, Martin KJ, Fournier MF, Shaw SK, Brizuela N, et al. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. Journal of virology. 2003 Nov 1; 77 (21): 11822-32.

Wen Y, You YG, Yuan LC, Yuan YH, Zhang Y, Duthie MS, et al. Evaluation of novel tools to facilitate the detection and characterization of leprosy patients in China. *BioMed research international*. 2014.

Wickham H. Tidyverse: Easily install and load 'tidyverse' packages. R package version 1.2.1. 2017.

Woods SA, Cole ST. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS microbiology letters*. 1989 Dec 1; 65(3): 305-9.

World Health Organization (WHO). The World Health Report 2002. Geneva: WHO, 2002.

World Healthy Organization (WHO). Cluster analysis of the overall detection rate of leprosy in Brazil the triennium 2011-2013. Geneva: WHO, 2013.

World Health Organization (WHO). Global Leprosy Strategy: Accelerating towards a leprosy-free world. Geneva: WHO, 2016a.

World Healthy Organization (WHO). National leprosy programmes. Map: Global leprosy programme. Geneva: WHO, 2016b.

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991 Oct 11; 254 (5029): 277-9.

Zanella A, Bianchi P. Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2000 Mar 1; 13 (1): 57-81.

8. APÊNDICES

8.1. APÊNDICE I – TCLE (HC/Acre)	112
8.2. APÊNDICE II – TCLE (Hemoacre)	116
8.3. APÊNDICE III – Adaptação do Protocolo DNeasy Blood & Tissue Kit ..	118
8.4. APÊNDICE IV – Adaptação do Protocolo de Salting Out	122

APÊNDICE I

TCLE (HC/Acre)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO FEDERAL DO ACRE (IFAC)/ FIOCRUZ

TÍTULO DO PROJETO: NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DE MÉTODOS MOLECULARES E SOROLÓGICOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE NO ESTADO DO ACRE

O(a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) da Pesquisa Científica **Novas estratégias de diagnóstico através de métodos moleculares e sorológicos de pacientes com hanseníase no Estado do Acre**, com duração de 48 meses, que está sendo realizada pelo **pesquisador Ricardo dos Santos Pereira**, servidor do IFAC e aluno do Curso de Doutorado em Biologia Celular e Molecular através do Programa de Cooperação IFAC/IOC-Fiocruz, **sob orientação do Dr. Milton Ozório Moraes**, Pesquisador Titular do IOC/FIOCRUZ.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A hanseníase é uma doença negligenciada, de evolução lenta e formas clínicas muito distintas. É causada pelo *Mycobacterium leprae*, que infecta células nos nervos e na pele. Caracteriza-se pela ausência de sinais óbvios e testes diagnósticos sensíveis/específicos. Por isso, o diagnóstico ainda se mostra impreciso e tardio, possibilitando o aparecimento de incapacidades e deformidades nos pacientes. A taxa de incidência de hanseníase no país é ligeiramente decrescente, mas a detecção nos estados das regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste é alta. No Estado do Acre, se apresenta superior à média nacional. Este quadro é ainda mais crítico em pacientes menores que 15 anos. É sabido que contatos domiciliares de pacientes com hanseníase apresentam maior risco de desenvolver a doença. Nesse sentido, a vigilância de contatos é de fundamental importância para o controle da endemia. Desta forma, a utilização de novas estratégias baseadas em métodos moleculares (qPCR-16S rDNA) e sorológicos (PGL-1) que visem um diagnóstico precoce de novos casos, de forma a interromper a cadeia de transmissão da doença, se faz necessária. Além disso, a caracterização genética de polimorfismos (genotipagem por qPCR - SNPs) associados à susceptibilidade/resistência à hanseníase (estudo caso-controle) e a caracterização das principais vias através de expressão gênica (qRT-PCR Multiplex) envolvidas na manifestação da doença, são fundamentais para a compreensão da imunopatogênese. O grupo de estudo consiste em pacientes com hanseníase retrospectivos e prospectivos (n=500), contatos (n=2000) e controles (n=500). O objetivo deste estudo é avaliar a utilização de novas estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos que visem um diagnóstico precoce de novos casos de Hanseníase, de forma a interromper a cadeia de transmissão da doença e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

BENEFÍCIOS ESPERADOS

O conhecimento gerado a partir deste estudo e sua aplicação podem ser de imenso valor para os programas de controle da Hanseníase no Brasil e no mundo, de forma a contribuir para a interrupção da cadeia de transmissão da doença e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

RISCOS ESPERADOS

Esta pesquisa pode apresentar riscos para seus participantes relativos à coleta de amostras, caracterizados alguns desconfortos como dor e/ou hematoma no local, decorrentes da coleta de sangue e/ou do raspado intradérmico auricular. Existem também riscos relacionados à estigmatização e danos psicológicos decorrentes da pesquisa para os participantes e seus familiares. No entanto, a coleta será realizada em domicílio pela Equipe de Enfermagem do Hospital das Clínicas do Acre e da Secretaria Municipal de Saúde de Rio Branco, o que minimiza tais riscos. O acompanhamento de pacientes e contatos ocorrerá de forma periódica. Além disso, as informações e resultados relativos à pesquisa são sigilosos e restritos aos pesquisadores envolvidos no projeto, sendo opcional o conhecimento por parte dos participantes da pesquisa. Caso necessário, os participantes da pesquisa receberão apoio psicológico e aconselhamento genético por parte da equipe multiprofissional do Hospital das Clínicas do Acre.

De acordo com o preconizado pela Resolução CNS 466/12, os participantes da pesquisa têm direito a assistência imediata e integral, sem qualquer ônus para o participante, para atender complicações e danos decorrentes, direta ou indiretamente, da pesquisa. Além disso, os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação têm direito à indenização, por parte do pesquisador, do patrocinador e das instituições envolvidas nas diferentes fases da pesquisa.

PROCEDIMENTOS DE COLETA E UTILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Nesta investigação serão coletadas amostras de raspado intradérmico do lóbulo auricular (6 mm³) de pacientes e contatos, para extração do DNA das células e posterior análise molecular para o *M. leprae* (16S rDNA). Além disso, serão coletadas amostras de sangue/soro (gotas de sangue) de pacientes e contatos para a análise da sorologia de *M. leprae* através de testes rápidos de diagnóstico para os antígenos PGL-1/LID-1. Também serão coletados cerca de 2,0 mL de sangue total (pacientes e doadores saudáveis) para a análise genética de polimorfismos e cerca de 2,0 mL de sangue total (contatos) para a análise da expressão gênica. As amostras biológicas obtidas (sangue, soro, DNA, RNA) armazenadas no IFAC/FIOCRUZ serão destruídas após a conclusão da pesquisa e não serão utilizadas em pesquisas futuras.

CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AO RESULTADO DA PESQUISA

As informações fornecidas são confidenciais, de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis e utilizadas somente para fins de pesquisa, incluindo o acesso ao prontuário clínico do paciente. O acesso ao resultado da pesquisa é opcional aos participantes da mesma.

UTILIZAÇÃO DOS DADOS DA PESQUISA

Os dados obtidos no estudo poderão ser apresentados em congressos e publicados em revistas científicas nacionais e internacionais, desde que mantida a confidencialidade.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NA PESQUISA

Sua participação é voluntária e a recusa não irá acarretar nenhuma penalidade ou perdas de benefícios. O(a) senhor(a) pode retirar o consentimento ou interromper sua participação a

qualquer momento da pesquisa. Você deve estar consciente que não existe remuneração referente à sua participação no estudo.

Se julgar necessário, o projeto de pesquisa está disponível para leitura e maiores esclarecimentos.

Você gostaria de ser informado sobre o resultado da pesquisa:

() Sim () Não

O(A) Senhor(a) receberá uma via deste termo de consentimento e a outra ficará com o pesquisador.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA

Caso o(a) senhor(a) necessite de maiores informações, poderá entrar em contato com o **Pesquisador Responsável Ricardo dos Santos Pereira**, no **Instituto Federal do Acre (IFAC)**, Câmpus Rio Branco – Xavier Maia, localizado na Avenida Brasil, nº 920, CEP: 69903-068, Rio Branco/AC, pelo **telefone (68) 3223-4142** ou através do **e-mail ricardo.pereira@ifac.edu.br**.

Este projeto foi **aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Acre (UFAC)**, localizado no Campus Universitário – Prédio da PROPEG: Sala 26. **Telefone: (68) 3901-2711. E-mail: cepufac@hotmail.com.**

Em caso de urgência, favor contatar o Pesquisador Responsável e o Setor de Hanseníase do Hospital das Clínicas do Acre, através do telefone (68) 3223-1331 ou pelo e-mail dermatologia.dabs@ac.gov.br.

Rio Branco, AC, ____ de _____ de _____.

Ricardo dos Santos Pereira
Pesquisador

EU LI AS INFORMAÇÕES ACIMA E COMPREENDI MINHA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO.

Com base no exposto, dou meu consentimento para participar voluntariamente desta pesquisa.

Assinatura do voluntário

APÊNDICE II

TCLE (Hemoacre)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO FEDERAL DO ACRE (IFAC) / FIOCRUZ

TÍTULO DO PROJETO: NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DE MÉTODOS MOLECULARES E SOROLÓGICOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE NO ESTADO DO ACRE

O(a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) da Pesquisa Científica **Novas estratégias de diagnóstico através de métodos moleculares e sorológicos de pacientes com hanseníase no Estado do Acre**, com duração de 48 meses, que está sendo realizada pelo **pesquisador Ricardo dos Santos Pereira**, servidor do IFAC e aluno do Curso de Doutorado em Biologia Celular e Molecular através do Programa de Cooperação IFAC/IOC-Fiocruz, **sob orientação do Dr. Milton Ozório Moraes (IOC/Fiocruz)**. Sua **participação na pesquisa será como Grupo Controle (não possui Hanseníase)**, necessário ao estudo caso-controle (genotipagem). A pesquisa será conduzida de acordo com a **Resolução CNS 466/12**.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A hanseníase é uma doença negligenciada, de evolução lenta e formas clínicas distintas. É causada pelo *Mycobacterium leprae*, que infecta células nos nervos e na pele. A transmissão da doença parece ocorrer pelo contato direto e a principal via de eliminação de bacilos pelas vias aéreas superiores (secreções nasais, gotículas da fala, tosse, espirro). Em 2014, foram detectados quase 25 mil casos novos de hanseníase no país. É sabido que contatos domiciliares de pacientes com hanseníase apresentam maior risco de desenvolver a doença. O grupo de estudo consiste em pacientes com hanseníase retrospectivos e prospectivos (n=250), contatos (n=500) e controles (n=700). O objetivo deste estudo é avaliar a utilização de novas estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos que visem um diagnóstico precoce de casos novos de Hanseníase e a caracterização genética de polimorfismos (genotipagem: estudo caso-controle) associados a doença, de forma a interromper a cadeia de transmissão da doença e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

CONFIDENCIALIDADE E UTILIZAÇÃO DOS DADOS DA PESQUISA

Os dados obtidos no estudo poderão ser apresentados em congressos e publicados em revistas científicas nacionais e internacionais, desde que mantida a confidencialidade.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NA PESQUISA

Sua participação é voluntária, ou seja, não existe remuneração referente à sua participação no estudo. O(A) Senhor(a) receberá uma via deste termo de consentimento e a outra ficará com o pesquisador.

Você gostaria de ser informado sobre o resultado da pesquisa:

() Sim () Não

INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA

Caso o(a) senhor(a) necessite de maiores informações, poderá entrar em contato com o **Pesquisador Responsável Ricardo dos Santos Pereira**, do **Instituto Federal do Acre (IFAC)**, Câmpus Rio Branco – Xavier Maia, através do e-mail ricardo.pereira@ifac.edu.br. Este projeto foi **aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Acre (CEP-UFAC: Parecer nº 750.553)**.

Rio Branco, AC, ____ de _____ de _____.

Ricardo dos Santos Pereira (Pesquisador)

EU LI AS INFORMAÇÕES ACIMA E COMPREENDI MINHA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO.
Com base no exposto, dou meu consentimento para participar voluntariamente desta pesquisa.

Assinatura do voluntário

APÊNDICE III

Adaptação do Protocolo

DNeasy Blood & Tissue Kit

Adaptação do Protocolo DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 2011)

A extração de DNA a partir de amostras de raspado intradérmico auricular não é tão simples devido a presença de poucas células na linfa. Desta forma, a utilização de um kit otimizado para evitar a perda de material como o DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), comparada a uma extração clássica de bioquímica (sem utilização de kits), se faz essencial.

O protocolo descrito abaixo considera algumas alterações em relação ao protocolo original da Qiagen para otimização da extração de DNA de *M. leprae* a partir de amostras de raspado intradérmico.

COLETA DAS AMOSTRAS: Adicionar 1,0 mL de Etanol PA em criotubos para coleta das amostras. Armazenar as amostras no freezer até o momento do experimento.

- 1) No momento do experimento, pegar as amostras e passar para microtubos de 1,5 mL (não vem no Kit).
- 2) Centrifugar as amostras a 735 x *g*, por 10 min, a temperatura ambiente (15-25° C). Não necessita de centrífuga refrigerada.
- 3) Após centrifugação, descartar o sobrenadante (observar o pellet branco (que representa o DNA) no fundo do tubo). Secar as amostras à 56 ° C (em banho seco ou estufa) por aproximadamente 20 min.
- 4) Após os tubos terem secado, adicionar 200 µL de PBS 1x (não vem no kit), 20 µL de Proteinase K (vem no kit) e 200 µL de Tampão AL (tampão de lise – vem no kit). Homogeneizar os tubos no vortex.
- 5) Incubar as amostras à 56 ° C (em banho seco) por 60 min. Após a incubação, homogeneizar os tubos novamente. Seguir para próxima etapa.

6) Adicionar 200 μL de etanol PA nos tubos. Homogeneizar os tubos no vortex. Transferir as amostras para as colunas mini spin (vem no kit).

7) Centrifugar as amostras a 5223 x g, por 02 min, a temperatura ambiente (15-25° C). Descartar os tubos contendo o sobrenadante e transferir as colunas mini spin para novos tubos (vem no kit).

8) Adicionar 500 μL do Tampão AW1 (vem no kit) nas colunas mini spin. Centrifugar as amostras a 5223 x g, por 02 min, a temperatura ambiente (15-25° C). Descartar os tubos contendo o sobrenadante e transferir as colunas mini spin para novos tubos (vem no kit).

9) Adicionar 500 μL do Tampão AW2 (vem no kit) nas colunas mini spin. Centrifugar as amostras a 15996 x g, por 05 min, a temperatura ambiente (15-25° C). Descartar os tubos contendo o sobrenadante e transferir as colunas mini spin para microtubos de 1,5 mL (não vem no kit).

10) Adicionar 200 μL de Tampão AE (tampão de eluição – vem no kit) para realizar a eluição das amostras. Incubar as amostras à temperatura ambiente (15-25° C), por 02 min. Centrifugar as amostras a 5223 x g, por 02 min, a temperatura ambiente (15-25° C).

11) Se necessário, repetir o passo 10, de forma a aumentar a massa de DNA obtida na extração.

12) Para concentrar o DNA extraído, os tubos contendo as amostras devem ser colocados para secar (vácuo, banho seco ou estufa). Após os tubos terem secado, ressuspender o DNA purificado em 20 μL de Tampão AE (tampão de eluição – vem no kit). As amostras contendo o DNA purificado podem ser armazenadas no freezer até o momento do experimento.

Análise da Pureza do DNA

A pureza e a quantidade de DNA são analisadas por espectrofotometria. A razão da absorbância em 260 e 280 nm é usada para medir a pureza do DNA. A razão considerada ideal é 2,0. Razões inferiores a 2,0 indicam a presença de contaminantes que absorvem nesta faixa de comprimento de onda, como proteínas ($\lambda = 280$ nm), isotiocianato de guanidina ($\lambda = 260$ nm), entre outros. A razão compreendida entre 1,8-2,0 é considerada aceitável. Além disso, é utilizada uma forma secundária para se determinar a pureza do DNA. É levada em consideração a razão da absorbância em 260 e 230 nm. A razão ideal está compreendida entre 1,8-2,2. Valores inferiores representam a presença de contaminantes que absorvem próximo ao $\lambda = 230$ nm (EDTA, carboidratos, fenol, etc). Desta forma, é possível determinar a massa de DNA presente na amostra. A fórmula utilizada para o cálculo da concentração de DNA é a que se segue:

$$c = (A * e) / b$$

* c representa a concentração de ácido nucléico (ng / μ L).

* A representa a absorbância.

* e representa o coeficiente de extinção dependente do comprimento de onda (ng-cm / μ L). O coeficiente de extinção varia de acordo com a molécula: DNA de dupla fita = 50 ng-cm / μ L; DNA de fita simples = 33 ng-cm / μ L; RNA = 40 ng-cm / μ L.

* b representa o caminho óptico (cm). O NanoDrop apresenta caminho óptico de 1,0 mm e 0,2 mm. Já o espectrofotômetro tradicional apresenta caminho óptico de 10 mm.

É possível realizar a análise em qualquer espectrofotômetro. No entanto, é recomendada a utilização do espectrofotômetro NanoDrop (ND – 1000, NanoDrop Technologies) devido a sua capacidade analisar 1,0 μ L de amostra com alta precisão e reprodutibilidade.

APÊNDICE IV

Adaptação do Protocolo

Salting Out

Adaptação do Protocolo de Salting Out (Miller *et al.*, 1988)

1 – Distribuir 1,0 mL de Tampão TE (para a lise de hemácias) em tubos cônicos de 1,5 mL.

2 – Adicionar 500 μ L de sangue total em cada tubo.

3 – Homogeneizar os tubos no vortex por 01 minuto. Deixar as amostras em banho seco à 56°C, por 10 minutos.

4 – LAVAGEM: Centrifugar as amostras a 640 x *g*, por 20 minutos. As células ficarão posicionadas no fundo do tubo (cor mais clara). Retirar o sobrenadante cuidadosamente com a pipeta e descartá-lo.

5 – Adicionar 1,0 mL de Tampão TE (para a lise de hemácias). Homogeneizar os tubos no vortex por 01 minuto. Deixar as amostras em banho seco à 56°C por 10 minutos.

6 – Repetir o processo de lavagem (passo 4) duas ou três vezes (de acordo com a necessidade). Utilizar nestas repetições centrifugação a 510 x *g*, por 15 minutos.

7 – Após o processo de lavagem, adicionar ao pellet 200 μ L de tampão de lise nuclear, 50 μ L de SDS 10% e 5 μ L de proteinase K (solução a 25 mg/mL). Homogeneizar os tubos no vortex com cuidado. Incubar as amostras a 56°C em estufa, overnight (por 18 horas).

8 – Após este período, adicionar 200 μ L de solução de acetato de sódio saturado. Homogeneizar as amostras no vortex por 01 minuto.

9 – Centrifugar as amostras a 640 x *g*, por 20 minutos. Transferir 500 μ L do sobrenadante com a pipeta para um novo tubo cônico de 1,5 mL.

10 – Adicionar 1,0 mL de Etanol Absoluto P.A. (GELADO) ao sobrenadante transferido (2 vezes o volume obtido). Misturar por inversão até observar precipitação de DNA.

11 – Centrifugar as amostras a 11752 x g, por 15 minutos. Verter os tubos, descartando o sobrenadante. Deixar os tubos em banho seco à 56°C para secar, por aproximadamente 20 minutos.

12 – Após os tubos terem secado, adicionar 1,0 mL de Etanol 70% (tentar soltar o pellet da parede do tubo antes de centrifugar).

13 – Centrifugar as amostras a 11752 x g, por 15 minutos. Verter os tubos, descartando o sobrenadante. Deixar os tubos em banho seco à 56°C para secar, por aproximadamente 40 minutos.

14 – Após os tubos terem secado, ressuspender o DNA em 50 µL de Tampão TE de ressuspensão (5,0 mM Tris, 0,1 mM EDTA).

15 – Deixar os tubos em banho seco à 56°C para dissolver o pellet, por aproximadamente 30 minutos, antes de quantificar as amostras.

PREPARO DOS REAGENTES

Tampão TE (para lise de hemácias)

Concentração desejada	Solução estoque	Volume para 1 L de solução
Tris-HCL 10 mM	1 M (pH= 8,0)	10 mL
EDTA 1 mM	0,5 M (pH= 8,0)	2,0 mL
Água Mili-Q	-	q.s.p 1 L

Obs.: Estocar a temperatura ambiente.

Tampão de lise nuclear

Concentração desejada	Solução estoque	Volume para 100 mL de solução
Tris-HCL 10 mM	1 M (pH= 8.0)	1,0 mL
EDTA 2 mM	0,5 M (pH= 8.0)	0,4 mL
NaCl 400 mM	5 M	8,0 mL
Água Mili-Q	-	q.s.p 100 mL

Obs.: Estocar a temperatura ambiente.

Solução de acetato de sódio saturado

Preparo para 50 mL de solução.

- 1) Aquecer 50 mL de água destilada.
- 2) Pesar aproximadamente 28 g de acetato de sódio anidro.
- 3) Adicionar o acetato de sódio aos poucos à água previamente aquecida.
- 4) Manter sob agitação constante em placa quente até dissolução completa.

Obs 1.: Estocar a temperatura ambiente.

Obs 2.: Caso seja o acetato de sódio seja tri-hidratado deve ser utilizada a proporção de 40 g de sal para cada 40 mL de água quente.

Tampão TE de ressuspensão

Concentração desejada	Solução estoque	Volume para 50 mL de solução
Tris-HCL 5 mM	1 M (pH 8.0)	0,25 mL
EDTA 0,1 mM	0,5 M (pH 8.0)	0,01 mL
Água Mili-Q	-	p.s.p. 50 mL

Obs.: Estocar a temperatura ambiente.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I – Linha do Tempo: Bacurau	127
9.2. ANEXO II – Pareceres CEP	131

ANEXO I

Linha do Tempo: Bacurau

Bacurau

Linha do Tempo

No dia 9 de dezembro nasce Francisco Augusto Vieira Nunes, o futuro Bacurau.

1939



1945

Contava com cinco anos de idade quando a família percebe que ele havia contraído a hanseníase

Alguns moradores de Manicoré/AM denunciam Augusto ao posto de saúde. Dias depois a polícia sanitária vai a sua casa e encontra seu pai, abraçado ao filho, armado com um facão - Só levam meu filho morto! - Não levam o pequeno Augusto.

Aprende a ler e escrever estudando em casa com a ajuda de seus irmãos. Não conseguia matricular nas escolas por ter hanseníase.

A polícia sanitária entra na sua casa a força e levam, por engano, o seu irmão Pedro.

1947



1948

A família vai buscar tratamento para Augusto em Porto Velho, Rondônia.

É matriculado em uma escola de Porto Velho, mas o expulsam no primeiro dia de aula abandonando-o na porta do hospital da cidade.

A padaria do seu pai vai à falência devido à perda de clientes em razão do medo de contágio.

Seu pai é demitido da delegacia de polícia por possuir idéias anti-getulistas e por ter um filho com hanseníase.

Período de fome, medo e tristeza. A falta de alimentação adequada e tratamento médico precário da região levam a morte três irmãs de Bacurau: Maria Lucia, com quatro anos; Terezinha de Jesus, com seis; e Maria Eliza, ainda bebê.

1951

1952

Morre o pai de Augusto, João Monteiro Nunes. Desgastado por anos de trabalho pesado para a idade avançada e saúde frágil.

Pregam uma placa na frente da casa de Bacurau com a palavra ETERNITET significando que aquele lar estava condenado para sempre.

É internado aos 13 anos na colônia Jayme Abenathar. Na colônia, Augusto recebe do seu companheiro de quarto, o apelido Bacurau.

1953



1957

Sai da colônia de Porto Velho e vai morar com o seu irmão Zuza em Rio Branco, Acre.

Neste período tenta, sem sucesso - devido à doença -, por quase quatro anos, arrumar um emprego.

No dia 23 de junho toma a decisão de se internar na colônia Souza Araújo. Estava com 21 anos.

1961

1967

É eleito prefeito da colônia Souza Araújo e permanece no cargo por cinco anos.

Compõe a música "Lapinha na Mata". Um cântico bastante conhecido nos rituais da igreja e que foi gravado pela editora Irmãs Paulinas. Souza Araújo.

1972

1973

Pelo projeto Minerva, do Mobral – Movimento Brasileiro de Alfabetização –, adquire seu diploma de ensino básico junto com seus próprios alunos e, no mesmo ano, inicia a sua carreira de professor contratado pela Secretaria Estadual de Educação.

No dia 20 de janeiro, sai de Souza Araújo e vai morar no conjunto Castelo Branco, em Rio Branco, com Tereza Prudêncio, que conheceu na colônia Souza Araújo.

1977



1978

Lança seu primeiro livro "À Margem da Vida: num leprosário do Acre".

É convidado pelo Ministério da Educação para participar da coleção "Prosadores do Mobral".

No início do ano publica o livro "Chico Boi" pela série do Mobral e volta a Manicoré para o lançamento do livro.

Com graves problemas em seus pés, faz cirurgia no hospital Lauro Souza Lima, em Bauru, no estado de São Paulo.

No Lauro Souza Lima, conhece Cachoeira e Nélcio Ribeiro seus futuros parceiros na fundação do Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase – Morhan.

1979



1980

Redige uma carta programa para a criação de um movimento de defesa dos hansenianos.

O Morhan é fundado no dia 6 de junho. No dia 1º de julho, é realizado o primeiro encontro nacional em Bauru. A sede é instalada em uma sapataria ortopédica na cidade de São Bernardo do Campo, São Paulo.

1981



1982

Funda um núcleo do Morhan em Rio Branco e começa a viajar pelo Brasil para divulgar o movimento.

Graças ao impacto do Morhan, Bacurau é convidado a ser membro permanente do Conselho Nacional de Saúde.

1983

1986

É o candidato mais votado a deputado federal constituinte pelo PT no Acre, com cerca de 3 mil votos, mas não é eleito.

Em janeiro, a música "João Seringueiro", de Bacurau, vence o Festival Acreano de Musica Popular – FAMP.

Vai a Brasília, por três vezes, levar as suas propostas para a Assembléia Constituinte. Consegue influenciar a redação final do art. 3º, inciso IV da Constituição Federal ao defender a ampliação do sentido de preconceito no texto.

1988

Nas eleições municipais sai como candidato do PT para vereador. Novamente perde a eleição.



1990

Na cidade de Savona, na Itália, Bacurau recebe o Prêmio Nacional Raoul Follereau e percorre 30 cidades italianas para proferir palestras sobre o Morhan e os problemas brasileiros.

Ainda na Itália, é recebido pelo Partido Comunista Italiano. Em outra circunstância Bacurau encontra-se com o Papa João Paulo II e entrega-lhe um exemplar de "À Margem da Vida" e uma carta.

Começa a trabalhar como coordenador no setor de dermatologia da Secretaria Municipal de Saúde, durante o mandato de Jorge Viana na Prefeitura de Rio Branco. Fica até 1996, permanente do Conselho Nacional de Saúde.

1992



1993

No Congresso Internacional de Hanseníase, em Orlando, Flórida, nos Estados Unidos, Bacurau apresenta o artigo "Leproso: Uma Identidade Perversa". No texto ele alerta para as formações culturais que degeneram a identidade das pessoas por conta das doenças por elas contraídas.

Sente os primeiros sintomas da doença que iria encerrar a sua vida, o câncer.

Vai para São Bernardo confirmar o diagnóstico de câncer na cabeça. Fica em estado grave, faz quimioterapia e é submetido a uma delicada cirurgia na cabeça.

Bacurau representa o Morhan na fundação da IDEA - Integration Dignity and Economic Advancement.

Participa ainda do encontro nacional do Morhan, em Fortaleza, quando se despede dos companheiros de luta.

São feitas campanhas de doação para ajudar nas altas despesas do seu tratamento.

1995



1996

Ainda se recuperando de uma cirurgia viaja para a China a convite do governo chinês. É bem recepcionado pelo público e pelos pacientes, mas se estranha com as autoridades chinesas por perceber que estavam manipulando a tradução da sua fala.

Concede entrevista em vídeo para Abrahim Farhat. "Caboclo amazônico" se torna um verdadeiro testamento ideológico e humanitário.

Bacurau falece em sua casa no dia 12 de janeiro.

1997



Apoio:  **EBX** Morhan Supported by  日本 THE NIPPON 財団 FOUNDATION

ANEXO II
Pareceres CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DE MÉTODOS MOLECULARES E SOROLÓGICOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE NO

Pesquisador: Ricardo dos Santos Pereira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 18811513.9.0000.5010

Instituição Proponente: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DO ACRE

Patrocinador Principal: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DO ACRE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 750.553

Data da Relatoria: 22/05/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo observacional que, segundo o projeto, se caracteriza como "caso-controle pareado" em que "as frequências dos polimorfismos entre os pacientes e os controles serão comparadas através de modelos de regressão logística condicional". Quanto ao período de referência, segundo o projeto, a pesquisa é caracterizada como retrospectiva e prospectiva. O objetivo da pesquisa não está claramente definido, visto que são apresentados três objetivos primários. Os participantes da pesquisa são pacientes diagnosticados com hanseníase, cadastrados no período de 2009 a 2013 que, para identificá-los, seus prontuários serão acessados. Também serão participarão da pesquisa pessoas saudáveis, que serão incluídas na pesquisa por meio do uso de seu sangue, proveniente de bancos de sangue.

Hipótese:

O diagnóstico padrão de hanseníase, recomendado pela OMS, é realizado através de exames bacteriológicos (baciloscopia), histopatológicos e clínicos. Este diagnóstico se mostra muitas vezes impreciso e tardio, o que possibilita a evolução para a forma severa da doença. Nesse sentido, a proposição de novas estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos que visem um diagnóstico precoce de novos casos de hanseníase, de forma a interromper a cadeia de transmissão da doença, se faz necessária para o controle da endemia.

Endereço: "Campus Universitário" Reitor Aúlio G. A de Souza", Bloco da Pró-Reitoria de Pós-Graduação, sala 26

Bairro: BR364 Km04 Distrito Industrial **CEP:** 69.915-900

UF: AC **Município:** RIO BRANCO

Telefone: (68)3901-2711

Fax: (68)3229-1246

E-mail: cepufac@hotmail.com

Continuação do Parecer: 750.553

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

"Avaliar a utilização de novas estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos que visem um diagnóstico precoce de novos casos de Hanseníase, de forma a interromper a cadeia de transmissão da doença".

Objetivos Secundário:

- 1- "Estudar a influência de polimorfismos genéticos associados à hanseníase, de forma a avaliar a suscetibilidade/resistência individual à doença".
- 2- "Diferenciar contatos sadios e contatos que evoluem para doença através da análise da expressão gênica, de forma a definir os genes que funcionem como biomarcadores entre os grupos".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e os benefícios foram apresentados e atendem às exigências éticas estabelecidas nas Resoluções CNS Nº 340/2004 e 466/2012.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa tem pertinência e relevância social e atende aos critérios de científicidades.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1- FOLHA DE ROSTO (FR): A Folha de Rosto está totalmente e adequadamente preenchida.
- 2- PROJETO DE PESQUISA: Foi revisado e atende às exigências éticas estabelecidas pelas Resoluções CNS Nº 340/2004 e 466/2012.
- 3- TCLE: atende às exigências estabelecidas nas Resoluções CNS Nº 340/2004 e 466/2012.
- 4- TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E USO DE PRONTUÁRIO CLÍNICO: foi anexado ao Protocolo de Pesquisa e expressa precisamente que os prontuários clínicos serão acessados para fins da pesquisa e inclui informações sobre o local e espaço para a data da assinatura ser informada, bem como há espaço para o participante da pesquisa apor sua assinatura
- 5- DECLARAÇÃO DE USO ESPECÍFICO DOS DADOS E MATERIAL COLETADOS: foi anexado ao Protocolo de Pesquisa e expressa, clara e precisamente, que o restante do material biológico (incluindo soro, plasma, DNA e RNA) será descartado após a conclusão do projeto de pesquisa e que nenhum material biológico e os dados dos prontuários dos pacientes será(ão) utilizado(s) em pesquisas futuras.
- 6- AUTORIZAÇÃO PARA USO DO BANCO DE SANGUE: foi anexado ao Protocolo de Pesquisa e está elaborado adequadamente.

Endereço: "Campus Universitário" Reitor Aúlio G. A de Souza", Bloco da Pró-Reitoria de Pós-Graduação, sala 26

Bairro: BR364 Km04 Distrito Industrial **CEP:** 69.915-900

UF: AC **Município:** RIO BRANCO

Telefone: (68)3901-2711 **Fax:** (68)3229-1246 **E-mail:** cepufac@hotmail.com

Continuação do Parecer: 750.553

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que no Protocolo de Pesquisa constam todos os Termos de Apresentação Obrigatória, os quais estão elaborados e/ou preenchidos adequadamente, atendendo as exigências estabelecidas nas Resoluções CNS N° 340/2004 e 466/2012, conclui-se pela emissão de Parecer favorável à realização da Pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP-UFAC informa que:

1- Esta pesquisa não poderá ser descontinuada pelo pesquisador responsável, sem justificativa previamente aceita pelo CEP, sob pena de ser considerada antiética, conforme estabelece a Resolução CNS N° 466/2012, X.3- 4.

2- Em conformidade com as diretrizes estabelecidas a Resolução CNS N° 466/2012, XI.2, d; o pesquisador responsável deve apresentar relatórios parcial e final ao CEP. O Relatório parcial deve ser apresentado após coleta de dados, "demonstrando fatos relevantes e resultados parciais de seu desenvolvimento" (Resolução CNS N° 466/2012, II.20) e o Relatório Final deverá ser apresentado "após o encerramento da pesquisa, totalizando seus resultados" (RESOLUÇÃO CNS N° 466/2012, II.19).

RIO BRANCO, 14 de Agosto de 2014

Assinado por:

**Luciete Basto de Andrade Albuquerque
(Coordenador)**

Endereço: "Campus Universitário" Reitor Aúlio G. A de Souza", Bloco da Pró-Reitoria de Pós-Graduação, sala 26

Bairro: BR364 Km04 Distrito Industrial

CEP: 69.915-900

UF: AC

Município: RIO BRANCO

Telefone: (68)3901-2711

Fax: (68)3229-1246

E-mail: cepufac@hotmail.com



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DE MÉTODOS MOLECULARES E SOROLÓGICOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE NO

Pesquisador: Ricardo dos Santos Pereira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18811513.9.3002.5248

Instituição Proponente: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DO ACRE

Patrocinador Principal: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DO ACRE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 775.694

Data da Relatoria: 09/09/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa da área de genética humana a ser desenvolvida como tese de doutorado do Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular do Instituto Oswaldo Cruz a ser desenvolvido no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre, que visa a utilização de estratégias baseadas em métodos moleculares (qPCR-16S rDNA) e sorológicos (PGL-1) para o diagnóstico precoce de novos casos de hanseníase, de forma a interromper a cadeia de transmissão da doença.

Em estudo híbrido de , será realizada a caracterização genética de polimorfismos (genotipagem por qPCR - SNPs) associados à susceptibilidade/resistência à hanseníase (estudo caso-controle) e a caracterização das principais vias através de expressão gênica (qRT-PCR Multiplex) envolvidas na manifestação da doença. O doutorando pretende avaliar grupo de 500 pacientes afetados pela hanseníase (retrospectivos e prospectivos), contatos (n=2000) e doadores de sangue como controles (n=500).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é avaliar a utilização de novas estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos que visem um diagnóstico precoce de novos casos de Hanseníase, de forma a interromper a cadeia de transmissão da doença e contribuir para o desenvolvimento de

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 775.694

novas estratégias terapêuticas.

Os objetivos são válidos e avaliáveis pelas técnicas e métodos explicitados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Possíveis riscos, diretos e indiretos, ao participante são avaliados no projeto conforme às resoluções CNS 466 e 340. Descritas as medidas para a minimização dos riscos. Caso necessário, os participantes da pesquisa receberão apoio psicológico e aconselhamento genético por parte da equipe multiprofissional do Hospital das Clínicas do Acre. Os autores oferecem assistência imediata e integral gratuita e indenização caso necessário. Apenas benefícios indiretos são apresentados, no entanto a pesquisa nos contatos poderá trazer benefício direto para o participante de diagnóstico precoce da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto suficientemente claro, bem fundamentado, sem necessidade de ser encaminhado para a CONEP. O estudo proposto parece pertinente e possui interesse científico para a área. Apresenta parecer aprovado do CEP do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre.

Na metodologia não é apresentada o cálculo do tamanho da amostra de 3000 participantes, nem da seleção de um subgrupo de 50 contatos para análise de expressão gênica, assim como estão ausentes os critérios de inclusão e exclusão, especialmente se serão incluídos menores de idade. Considerando que "A análise dos coeficientes de detecção de hanseníase em menores de 15 anos no Estado do Acre no ano de 2008 (figura 3), considerado um parâmetro fundamental de análise, demonstrou que vários municípios apresentam índices elevados de casos, entre eles o município de Rio Branco ("muito alto") e de Cruzeiro do Sul ("hiperendêmico)" espera-se que sejam incluídas crianças e adolescentes dentre os pacientes com hanseníase e seus contatos.

Os autores estabelecem que a coleta de material será realizada em domicílio pela Equipe de Enfermagem do Hospital das Clínicas do Acre e da Secretaria Municipal de Saúde de Rio Branco, mas não esclarecem a forma e momento de aplicação do TCLE aos participantes, nem os cuidados de biossegurança para o transporte do material. Também segundo o delineamento do estudo o "projeto visa à análise de casos retrospectivos (pacientes cadastrados e contatos) dos últimos cinco anos (2009-2013) e prospectivos (casos novos e contatos) de hanseníase no Estado do Acre", mas a coleta aparentemente será feita apenas na Capital Rio Branco.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados e avaliados os seguintes documentos:

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 775.694

Folha de rosto: assinada pelo estudante, e o responsável pela instituição proponente.

Projeto: no formato Plataforma e na íntegra

TCLE apresentado, parcialmente conforme a Res 466 do CNS em linguagem técnica

Questionários, instrumento de coleta dos dados: não apresentados

Termos de Compromisso e confidencialidade: Termo de Compromisso - Utilização de dados de arquivo (assinado), Declaração de uso específico de dados e material coletados

Cronograma apresentado: Informa a duração total e das diferentes etapas da pesquisa por semestre a partir do segundo semestre de 2014 até o primeiro semestre de 2017. Estabelece início de coleta de amostras em julho de 2014 embora apresenta declaração de não início de coleta

Orçamento detalhado não apresentado, menção a custeio no valor de R\$120.000,00 pelo Convênio IFAC/IOCFiocruz.

Curriculae vitae do estudante: confirmada a capacidade técnica. Não foram apresentados a equipe nem os respectivos CV dos participantes.

Termos de Anuência e de Compromisso das instituições colaboradoras: Termo de Autorização - Realização da pesquisa (Instituição Coparticipante - Fiocruz), Termo de Autorização para Utilização do Banco de Sangue - HC Acre, Termo de Autorização para Realização da Pesquisa - Fundação Hospital Estadual do Acre – FUNDHACRE

Termo de Autorização - Acesso e Uso de Prontuário Clínico (Paciente)

Declaração de que a coleta de dados não foi iniciada assinada pelo doutorando e orientador.

Declaração - Servidor do doutorando

Portaria - Autorização Doutorado

Recomendações:

Avaliar os benefícios diretos aos participantes, dado que a pesquisa poderá trazer o benefício do diagnóstico precoce da doença ao participante contato.

Esclarecer na metodologia onde serão realizados os testes de biologia molecular e se haverá maior participação do Instituto Oswaldo Cruz neste sentido, além do curso de pós-graduação. Ainda, esclarecer os critérios de inclusão e exclusão dos participantes, se serão incluídos crianças e/ou adolescentes e população indígena. Caso menores de 18 anos vierem a ser incluídos, será necessária a apresentação de termo de assentimento além da assinatura do TCLE por parte do responsáveis.

Apresentar orçamento detalhado.

Apresentar Termo de Compromisso e confidencialidade do pesquisador principal, ie. do orientador.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 775.694

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

No conjunto o protocolo parece adequado e o projeto pode ser considerado eticamente aceitável, no entanto, o TCLE deverá ser redigido conforme à Res. 466 do CNS. A linguagem deve ser simplificada, deverá ser explicitado na metodologia o momento de aplicação do TCLE. Deverá ser esclarecido que o contato com o CEP é apenas em caso de questionamentos sobre os aspectos éticos do estudo. Uma vez que não foi apresentado termo de assentimento e TCLE para responsável pelo menor de idade não deverão incluir menores de 18 anos de idade nesse projeto. Além disso, uma vez que um percentual considerável da população do Acre é contituida por indígenas, e como não foi anexado TCLE específico e autorização do DSEI, não está autorizada a inclusão de voluntários indígenas nesse projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 196a Reunião Ordinária, realizada em 26.08.2014, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

RIO DE JANEIRO, 02 de Setembro de 2014

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO ATRAVÉS DE MÉTODOS MOLECULARES E SOROLÓGICOS DE PACIENTES COM HANSENÍASE NO

Pesquisador: Ricardo dos Santos Pereira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 18811513.9.3001.5009

Instituição Proponente: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DO ACRE

Patrocinador Principal: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DO ACRE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 910.309

Data da Relatoria: 04/09/2014

Apresentação do Projeto:

O presente projeto visa à análise de casos retrospectivos (pacientes cadastrados e contatos) dos últimos cinco anos (2009-2013) e prospectivos (casos novos e contatos) de hanseníase no Estado do Acre. Além disso, será realizado um estudo do tipo caso-controle de pacientes retrospectivos e prospectivos em relação a doadores saudáveis (pacientes x controle). Inicialmente, o Centro de Referência de Hanseníase no Estado, o Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas do Acre, será contatado para levantamento de prontuários de pacientes e contatos no referido período, além do acompanhamento de casos novos. Como controle, haverá um grupo de doadores saudáveis provenientes do banco de sangue do Hospital das Clínicas do Acre. A apresentação do projeto encontra-se dentro dos padrões exigidos pela CONEP com base na Resolução nº. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Avaliar a utilização de novas estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos que visem um diagnóstico precoce de novos casos de Hanseníase, de forma a interromper a cadeia de transmissão da doença.

Endereço: BR 364 - Km 02

Bairro: Distrito Industrial

CEP: 69.914-217

UF: AC

Município: RIO BRANCO

Telefone: (68)3226-4809

Fax: (68)3226-4809

E-mail: cep.hc@ac.gov.br

Continuação do Parecer: 910.309

Objetivos Específicos:

- Estudar a influência de polimorfismos genéticos associados à hanseníase, de forma a avaliar a suscetibilidade/resistência individual à doença;
- Diferenciar contatos sadios e contatos que evoluem para doença através da análise da expressão gênica, de forma a definir os genes que funcionem como biomarcadores entre os grupos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A presente pesquisa atende aos aspectos éticos, conforme a Resolução nº. 466/2012 do CNS, assegurando a confidencialidade e a privacidade dos participantes e dos dados coletados. A pesquisa é de grande importância, pois visa descobrir a utilização de novas estratégias baseadas em métodos moleculares e sorológicos que visem um diagnóstico precoce de novos casos de Hanseníase. No entanto, a pesquisa deverá ser interrompida caso coloque a vida dos participantes em risco. Portanto, de acordo com o item V.1, do Capítulo V, os riscos citados na pesquisa justificam os benefícios esperados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A iniciativa de desenvolver pesquisa visando produzir mais conhecimentos técnico-científicos que possibilitem melhor qualidade de vida para os seres humanos é de fundamental importância.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos apresentados estão elaborados adequadamente e atendem as normas e padrões estabelecidos pela Resolução nº. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela análise precedida, este Comitê de Ética em Pesquisa (Registrado junto à CONEP - Ofício Circular nº 149/Carta nº 050 - CONEP/CNS/MS) considera o presente protocolo Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, cabe ao pesquisador responsável, ao término da pesquisa, elaborar e apresentar o relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP.

Relatório Final: É o documento apresentado após o encerramento da pesquisa, totalizando seus

Endereço: BR 364 - Km 02

Bairro: Distrito Industrial

CEP: 69.914-217

UF: AC

Município: RIO BRANCO

Telefone: (68)3226-4809

Fax: (68)3226-4809

E-mail: cep.hc@ac.gov.br

FUNDAÇÃO HOSPITAL
ESTADUAL DO ACRE -
FUNDHACRE



Continuação do Parecer: 910.309

resultados.

RIO BRANCO, 11 de Dezembro de 2014

Assinado por:
Rosely de Freitas
(Coordenador)

Endereço: BR 364 - Km 02

Bairro: Distrito Industrial

UF: AC

Município: RIO BRANCO

CEP: 69.914-217

Telefone: (68)3226-4809

Fax: (68)3226-4809

E-mail: cep.hc@ac.gov.br