

*Beatriz Gomes Carreira Sartori*

Determinação Molecular da Viabilidade do  
*Mycobacterium leprae*: uma comparação com  
outras abordagens metodológicas.

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho”, Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestra em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Botucatu  
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Sartori, Beatriz Gomes Carreira.

Determinação molecular da viabilidade do Mycobacterium leprae : uma comparação com outras abordagens metodológicas. / Beatriz Gomes Carreira Sartori. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ida Maria Foschiani Dias Baptista  
Capes: 40101096

1. Hanseníase. 2. Mycobacterium leprae. 3. Reação em cadeia de polimerase. 4. Acido ribonucleico. 5. Biologia molecular.

Palavras-chave: 16SrRNA; Hanseníase Experimental; Mycobacterium leprae; RLEP; qPCR.

*Beatriz Gomes Carreira Sartori*

Determinação Molecular da Viabilidade do  
*Mycobacterium leprae*: uma comparação com  
outras abordagens metodológicas.

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Doenças Tropicais.

---

Orientadora: Profa. Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Comissão Examinadora

---

Prof. Dr. Cleverson Teixeira Soares  
Instituto Lauro de Souza Lima

---

Profa. Dra. Fernanda Saloum de Neves Manta  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ

Botucatu, 27 de Fevereiro de 2015

*Epígrafe*

“A regra da igualdade não consiste senão em quinhoar desigualmente aos desiguais, na medida em que se desigualam. Nesta desigualdade social, proporcionada à desigualdade natural, é que se acha a verdadeira lei da igualdade... Tratar com desigualdade a iguais, ou a desiguais com igualdade, seria desigualdade flagrante, e não igualdade real”

Rui Barbosa

*Dedicatória*

A **Deus**... Que me deu o dom da vida. E que me permitiu trilhar esse caminho de conhecimento.

Aos **meus pais**, Mara Rúbia (*in memoriam*) e Orlando (*in memoriam*)... Que me criaram, me instruíram, me ajudaram. Sei que onde quer que estejam, estão vibrando comigo.

Ao meu **irmão** Marcus, sua esposa Ana Laura e minha amada sobrinha Sophia. Mais que família.

Ao meu amado **marido** André Luiz Sartori... Meu maior incentivador. Meu melhor amigo. A razão dos meus dias mais felizes e dos meus momentos de lucidez.

Aos pacientes portadores de hanseníase... Que generosamente compartilharam, que doaram, que acreditaram.

Ao Dr. Diltor Opromola (*in memoriam*)... Que nos faz tanta falta.

A minha **orientadora** Ida Maria Foschiani Dias Baptista...

Que dividiu comigo seus conhecimentos de forma generosa.

Que me incentivou e me guiou.

Que me levantou.

Que acreditou.

Obrigada !

## *Agradecimientos*

A diretoria técnica do Instituto Lauro de Souza Lima na pessoa do Diretor Marcos da Cunha Lopes Virmond, que me permitiram usar as instalações deste centro de Pesquisa.

A toda Equipe Técnica de Microbiologia, principalmente Suzana Madeira Diório que contribuíram de forma significativa para os resultados deste trabalho.

A Equipe Técnica de Biologia, Fátima Moreno, Adriana Barbosa e Patrícia Rosa pelo suporte e incentivo.

A Amanda Finardi e Eloise Moraes. Por compartilharem caronas, idéias, lágrimas e sorrisos.

Aos meus amigos músicos, Ana Luísa, Luiz Fernando Tosi, Guilherme, Marcela, Clarissa, Aline, Luiz Fernando, Luiz César, Éder Anderson, Paulo Maia e Cristiane Pachiega, que estiveram presentes de forma anônima.

A todos os meus familiares, os de longe e os de perto, pelas palavras de encorajamento.

Ao Dr. Jaison Antonio Barreto, por compartilhar comigo seus conhecimentos em hanseníase.

Aos meus colegas de trabalho no Instituto Lauro de Souza Lima, Lazara, Marcia, Érika, Patrícia, Priscila, Ana Elisa, Izilda, Camila e Luciana.

Ao Dr. Milton Ozório Moraes do Laboratório de Hanseníase da FIOCRUZ/RJ, pelo incentivo, por toda a ajuda, por compartilhar conhecimentos e idéias.

Aos Dr. Marcelo Ribeiro Alves por toda a ajuda na parte de análise estatística.

*Resumo*

## Resumo

O acesso às informações sobre a hanseníase, seu diagnóstico e tratamento com a Poliquimioterapia (PQT) se constituem como elementos chave da estratégia para seu controle. Resultado da infecção pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), a hanseníase é uma doença crônica que acomete pele e nervos e a impossibilidade de cultivo do *M. leprae* em meio de cultura axênico, tem dificultado os estudos *in vitro* e o desenvolvimento de ensaios clínicos mostram-se complicados pela lenta progressão do bacilo. Assim, um método sensível e específico para a detecção da viabilidade do *M. leprae* adicionaria um critério imparcial aos meios já disponíveis, possibilitando ainda o diagnóstico em estágio mais precoce da doença. O presente estudo teve por finalidade a avaliação da viabilidade bacilar por meio da detecção de RNAr 16S específico para o *M. leprae* com a normalização das quantidades totais de micobactérias a partir da quantificação do DNA total de *M. leprae*. Foi utilizada como padrão a inoculação em coxim plantar de camundongos (Técnica de Shepard). Foram avaliados pacientes antes do tratamento, suspeitos de recidivas e pacientes em fim de tratamento. A inoculação foi altamente positiva nos pacientes não tratados quando comparados com os dos grupos recidiva e fim de tratamento. Os resultados sugerem que existe uma boa correlação entre os dados obtidos com a inoculação e o ensaio molecular, uma vez que também foi possível detectar níveis de RLEP e 16S rRNA nestas amostras. Esta metodologia poderá, futuramente, ajudar no monitoramento da eficácia do tratamento e na busca de novas possibilidades para o estudo da interação parasito-hospedeiro.

Palavras chave: Hanseníase Experimental; qPCR; *Mycobacterium leprae*; RLEP; 16S rRNA

*Abstract*

## Abstract

Access to information about the disease, its diagnosis and treatment with multidrug therapy (MDT) are constituted as key elements of the strategy for its control. Result of infection by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), leprosy is a chronic disease that affects the skin and nerves and the impossibility of cultivating *M. leprae* in axenic culture medium, has hampered in vitro studies and the development of clinical trials show is complicated by the slow progression of the bacillus. Thus, a sensitive and specific method for detection of viable *M. leprae* add a fair criterion to the means already available, allowing diagnosis even in early stage disease. This study aimed at evaluating the bacterial viability by specific 16S rRNA detection for *M. leprae* with the normalization of the total quantities of mycobacteria from the quantification of total DNA of *M. leprae*. It was used as a standard inoculation into the footpads of mice (Shepard Technique). Patients were evaluated prior to treatment and relapses in patients suspected to treatment. The inoculation was highly positive in untreated patients compared to the relapse groups and end of treatment. The results suggest that there is a good correlation between the data obtained from inoculation and molecular assay, since it was also possible to detect levels of 16S rRNA and RLEP these samples. This methodology may in the future help monitor the effectiveness of treatment and the search for new possibilities for the study of host-parasite interaction.

Key Words: Mouse foot pad; qPCR; *Mycobacterium leprae*; RLEP; 16S rRNA

## *SUMÁRIO*

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Referencial teórico</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Hanseníase</b>	<b>4</b>
<b>2.1.1 História, etiologia e transmissão</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2. Classificação clínica, imunidade e tratamento</b>	<b>7</b>
<b>2.1.3. Diagnóstico clínico e laboratorial</b>	<b>13</b>
<b>2.1.4. Diagnóstico alternativo na hanseníase</b>	<b>15</b>
<b>2.1.4.1. PGL-1</b>	<b>15</b>
<b>2.1.4.2. Inoculação em camundongos- Técnica de Shepard</b>	<b>15</b>
<b>2.1.4.3. A PCR no diagnóstico da hanseníase</b>	<b>17</b>
<b>2.1.4.3.1. Viabilidade molecular do <i>M. leprae</i></b>	<b>18</b>
<b>3. Objetivo geral</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Objetivos específicos</b>	<b>20</b>
<b>4. Casuística e métodos</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Casuística</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Métodos</b>	<b>22</b>
<b>4.2.1. Coleta das biópsias</b>	<b>22</b>
<b>4.2.2. Critérios de inclusão</b>	<b>24</b>
<b>4.2.3. Exame histopatológico</b>	<b>25</b>
<b>4.2.4. Inoculação em coxim plantar de camundongos isogênicos BALB/c (técnica de Shepard - 1960)<sup>8</sup> - Laboratory Techniques for Leprosy<sup>61</sup></b>	<b>27</b>
<b>4.2.5. Extração de RNA de <i>M. leprae</i></b>	<b>29</b>
<b>4.2.6. Transcrição reversa do RNA do <i>M. leprae</i></b>	<b>30</b>
<b>4.2.7. Ensaio de viabilidade para o <i>M. leprae</i> utilizando qPCR</b>	<b>31</b>
<b>4.2.8. Extração de DNA de <i>M. leprae</i></b>	<b>33</b>
<b>4.2.9. Análise estatística</b>	<b>34</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>35</b>
<b>5.1. Exame histopatológico</b>	<b>35</b>
<b>5.1.1. Pacientes não tratados</b>	<b>35</b>
<b>5.1.2. Pacientes com suspeita de recidiva</b>	<b>37</b>
<b>5.1.3. Pacientes em final de tratamento</b>	<b>39</b>

<b>5.2. Inoculação em coxim plantar de camundongos</b>	<b>41</b>
<b>5.2.1. Pacientes não tratados</b>	<b>41</b>
<b>5.2.2. Pacientes com suspeita de recidiva</b>	<b>43</b>
<b>5.2.3. Pacientes em final de tratamento</b>	<b>45</b>
<b>5.3. Resultados de qPCR – Viabilidade Molecular</b>	<b>47</b>
<b>5.3.1. Correlação BAAR/RLEP (bacilos – DNA)</b>	<b>48</b>
<b>5.3.1.1. Correlação BAAR/RLEP em amostras de pacientes e camundongos</b>	<b>48</b>
<b>5.3.1.2. Correlação BAAR/RLEP em pacientes</b>	<b>50</b>
<b>5.3.2. Viabilidade baciloscópica: Recup/Inoculado</b>	<b>54</b>
<b>5.3.3. Viabilidade baciloscópica – observados/esperados</b>	<b>57</b>
<b>5.3.4. Viabil Molecular X Viabil Baciloscópica</b>	<b>63</b>
<b>5.3.5. Viab. baciloscópica x crescimento exponencial</b>	<b>63</b>
<b>5.3.6. Viab. molecular x crescimento exponencial</b>	<b>65</b>
<b>5.4. Reavaliação de pacientes após o tratamento</b>	<b>67</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>70</b>
<b>7. Conclusão</b>	<b>76</b>
<b>8. Referências</b>	<b>77</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>89</b>
<b>10. Apêndice</b>	<b>94</b>

## 1. Introdução

A hanseníase é uma doença crônica que acomete pele e nervos e adquire especial significância uma vez que sua progressão pode levar a neuropatias periféricas e deformidades permanentes, as quais acarretam discriminação e estigmatização social<sup>1</sup>. A prevalência global da hanseníase tem declinado em razão da implantação da poliquimioterapia (PQT) em 1981 pela Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>2,3,4</sup>. De acordo com os dados relatórios oficiais referentes ao ano de 2013, 103 países distribuídos em cinco grandes regiões apresentaram 215.656 novos casos de hanseníase registrados, com uma taxa de prevalência global de 3.81 (nº de casos/100.000 população). Quando comparado ao ano de 2012 houve uma redução no total de 17.201 novos casos detectados.

Segundo WHO, Índia, Brasil e Indonésia continuam sendo os países com as maiores taxas de detecção de casos novos, e estes países em conjuntos com outros 11, num total de 14 países, são responsáveis por 96% dos novos casos de hanseníase em todo o mundo. Costa do Marfim, República Democrática do Congo, Etiópia e Madagascar foram os únicos países que registraram um número maior de casos novos quando comparados aos outros anos, embora a quantidade seja pequena. Quatro países registraram <1000 novos casos, tendo registrado >1000 novos casos no ano anterior: República Popular da China apresentou 924 novos casos em 2013, (1206 em 2012); Sudão Sul registrou 677 novos casos em 2013, (1801 em 2012); Angola e Sudão também registraram <1000 novos casos em 2012<sup>5</sup>.

Apesar da tendência mundial de redução dos coeficientes de prevalência e detecção de casos novos, o Brasil em 2013 ainda apresentou número elevado de casos detectados chegando a 31.044 casos novos. Com relação ao ano de 2012 houve uma redução de 2.259 casos novos registrados. Dados oficiais mostram que existem 10 clusters de endemicidade no Brasil, onde o risco de se contrair a doença pode variar entre 03-08 vezes. Um total de 621 municípios está distribuído nestes 10 clusters e eles estão localizados principalmente nos estados de Mato Grosso, Pará, Maranhão, Tocantins, Goiás, Rondônia e Bahia. Se considerarmos o número total de casos registrados em todos os distritos destes estados, verificamos que eles representam 44% (13,597/31,044) de casos novos detectados diagnosticados em 2013, além de representarem somente 14% da população brasileira<sup>5</sup>.

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) que é um bacilo álcool-ácido resistente e parasita intracelular com predileção pelas células de Schwann, macrófagos e tecido epitelial. Acredita-se que a transmissão ocorra pelo contato estreito e prolongado entre um indivíduo susceptível e um paciente infectado pelo bacilo por meio da

inalação dos bacilos contidos na secreção nasal ou gotas *Flügge*, portanto, a principal via de transmissão é a da mucosa nasal<sup>6</sup>. A doença apresenta um espectro de sintomas que se manifesta como formas clínicas distintas, de acordo com o tipo de resposta imunitária que o hospedeiro apresenta frente ao microrganismo<sup>7</sup>.

Grande parte do conhecimento sobre as características microbiológicas do *M. leprae* é oriundo de estudos em patas de camundongos, em decorrência da impossibilidade de seu cultivo em meio de cultura axênico. No clássico modelo desenvolvido por Shepard em 1960<sup>8</sup>, os camundongos são tipicamente inoculados na pata traseira com 5000-10000 bacilos, e o crescimento destes organismos é avaliado após 120-360 dias<sup>9</sup>.

Embora a multiplicação do *M. leprae* em patas de camundongos imunocompetentes seja limitada e nenhuma lesão seja produzida nestes animais, o sistema desenvolvido por Shepard representa o primeiro modelo realmente confiável e reprodutível da infecção. O emprego desta técnica permite a pesquisa em questões básicas, como as que dizem respeito à microbiologia do *M. leprae*, epidemiologia, tratamento e controle da hanseníase. Entretanto a técnica é extensivamente trabalhosa, além de consumir muito tempo e alto custos para manutenção dos animais. Ademais é bastante imprecisa e insensível, em comparação com técnicas utilizadas no trabalho com microrganismos cultiváveis. Por estas razões a técnica tem sido abandonada em muitos centros de pesquisa<sup>10</sup>.

Outro aspecto que corrobora com a baixa sensibilidade da metodologia é a impossibilidade de examinar todo o homogeneizado, assim, poucos os organismos presentes na amostra são realmente enumerados. O *M. leprae*, assim como outras micobactérias tende a aglutinar-se. Então durante o procedimento de homogeneização nem todas as células do tecido são rompidas, logo nem todos os bacilos são liberados e, portanto, o *M. leprae* não está distribuído uniformemente no homogeneizado e a enumeração dos bacilos pode ficar sujeita a erros<sup>11, 12</sup>.

Outras fontes de erro precisam ser resolvidas: (i) o sacrifício realizado precocemente pode impedir a detecção da multiplicação do *M. leprae*, ao passo que o sacrifício tardio pode esconder importantes diferenças entre os grupos de animais experimentais. Uma possível seria o aumento do tempo de inoculação principalmente para as amostras paucibacilares (ii) outro aspecto relacionado com a indução de erro é a presença de um inóculo de uma proporção muito pequena de organismos viáveis. O inóculo de *M. leprae* contém apenas uma pequena porcentagem de organismos viáveis, de modo que, durante a inoculação, algumas das patas inoculadas com um maior número de organismos viáveis, ao passo que outras são inoculadas apenas com organismos mortos<sup>11</sup>.

Atualmente, métodos de detecção de RNA têm sido propostos, como ferramenta promissora para detecção do *M. leprae*, com a finalidade de promover importante discriminação entre organismo viável e não viável visando o correto prognóstico dos pacientes de hanseníase durante o tratamento, na identificação de recidiva e na diferenciação das reações hansênicas<sup>13, 14</sup>.

Portanto, habilitar testes moleculares para análise da viabilidade do bacilo, constitui-se num melhoramento necessário ao correto manejo da hanseníase e suas complicações.

## 2. Referencial Teórico

### 2.1. Hanseníase

#### 2.1.1. História, etiologia e transmissão.

Referências muito claras em relação à hanseníase podem ser encontradas em muitos livros antigos. Essa doença é considerada uma das primeiras doenças infecciosas descritas, sendo relatada na Índia em 1500 aC, com o nome de Kushta cuja manifestação se apresentava de duas formas: (i) anestesia local e deformações nas extremidades e (ii) e por ulcerações, reabsorção óssea e desabamento da pirâmide nasal<sup>15</sup>.

Acredita-se que a hanseníase tenha sido introduzida da Índia para a Europa pelas tropas de Alexandre, o Grande, em 300 aC. Sua incidência foi alta na Europa e no Médio Oriente durante a Idade Média. O número de casos foi reduzido drasticamente por volta de 1870 em decorrência do desenvolvimento socioeconômico. Acredita-se que a hanseníase tenha sido introduzida na América Latina durante o período de colonização dos franceses nos Estados Unidos e por espanhóis e portugueses na América do Sul. O tráfico de escravos africanos foi a principal causa da disseminação da hanseníase nas Américas. Os primeiros casos foram notificados no Brasil em 1600, na cidade do Rio de Janeiro e o primeiro hospital para isolamento foi instalado também na mesma cidade. Depois disso, a doença se espalhou para outras regiões brasileiras<sup>16</sup>.

A hanseníase é uma doença extremamente associada à pobreza e constitui ainda é um problema de saúde pública em alguns países em desenvolvimento, como Brasil e Índia, e especialmente em muitas comunidades subdesenvolvidas dessas nações. A globalização e o fluxo intensificado da migração têm aumentado o risco de transmissão de doenças infectocontagiosas, como a hanseníase, em áreas onde já tinham sido eliminadas como problema de saúde pública<sup>17</sup>.

O papel dos fatores ambientais não é claro. Nos países que apresentaram melhoras nas condições de vida, houve declínio no número de casos de hanseníase. Entretanto, não existem fatores ambientais específicos identificados que contribuíram para este declínio. A mitigação da superpopulação e pobreza, e melhorias nas condições de higiene parecem ser as razões, mas estes são conceitos gerais que não são fáceis de serem quantificados<sup>18</sup>.

Seu agente etiológico, o *M. leprae* é um bacilo fortemente álcool-ácido resistente, e seu formato é muito semelhante ao de outras micobactérias como, por exemplo, o agente da tuberculose<sup>19</sup>. É um parasita intracelular obrigatório que se reproduz lentamente por divisão binária. O tempo médio de multiplicação pode variar entre 11-16 dias, e permanecer viável no

meio ambiente por até nove dias, sendo que a maioria permanece viável por até três dias e somente 1% até sete dias<sup>15, 20, 21</sup>. Possui o tempo mais lento de multiplicação entre as micobactérias patogênicas, o que se reflete no tempo de incubação prolongado e na cronicidade da doença<sup>21,22</sup>.

O bacilo foi descrito por G.H. Armauer Hansen em 1874, sendo a primeira bactéria relacionada com uma doença no homem. Apesar de passados 140 anos desta descoberta, seu cultivo *in vitro*, se constitui em grande desafio para os microbiologistas. Nos tecidos humanos apresenta-se como bastonetes retos ou levemente encurvados e seu tamanho pode variar entre 2 e 8  $\mu$  de comprimento por 0,2 a 0,5  $\mu$  de largura, podendo aparecer isolados ou dispostos em feixes paralelos (como um maço de cigarros). Ocorre também formando as denominadas globias que são característica ao bacilo e resultam da sólida união entre os bacilos por meio de uma substância chamada gléia<sup>19, 23, 24</sup>.

Shepard em 1960<sup>8</sup> descreveu uma metodologia onde foi possível o cultivo do bacilo em linhagens de camundongos imunocompetentes a partir do lavado nasal e biópsias de pacientes multibacilares. Neste trabalho, verificou-se que o bacilo se multiplicava durante um período de seis a oito meses, atingindo então um platô (onde não há mais multiplicação). Desde foi descrita esta metodologia tem sido utilizada como padrão para estudos de viabilidade, recidiva, resistência a drogas, entre outros.

Na microscopia eletrônica do *M. leprae*, pode ser observado um envoltório celular com uma estrutura tripartida composta pela membrana plasmática, parede celular e uma camada mais externa, cuja organização é rica em lipídios complexos, muito diferente do que se verifica em outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os lipídios mais característicos do seu envelope celular são ácidos graxos de 60 a 90 átomos de carbono, também denominados de ácidos micólicos. Várias das propriedades relacionadas à virulência e sua sobrevivência dentro da célula hospedeira parecem estar associadas à estrutura característica do seu envelope<sup>25</sup>.

O envoltório celular do *M. leprae* é composto por uma membrana plasmática seguida de uma camada de peptidoglicano covalentemente ligado a arabinogalactana. Os ácidos micólicos estão ligados a resíduos terminais de arabinose da arabinogalactana. Uma camada mais externa está presente sendo composta por lipopolissacarídeos livres, glicolipídeos e fosfolipídeos. O lipídio dominante da parede celular que confere especificidade imunológica ao *M. leprae* é o PGL-1 (Glicolipídeo fenólico-1)<sup>26</sup>. A parede celular do *M. leprae* parece diferir das outras micobactérias na composição das unidades peptídicas e na multiplicidade das camadas de peptidoglicanos que constituem a estrutura completa da parede celular. Um

conhecimento mais detalhado desta estrutura poderia levar a um melhor entendimento da susceptibilidade a drogas e também o metabolismo do organismo e também permitir a identificação de alvos específicos para novas drogas, além do desenvolvimento de uma vacina eficiente e métodos para monitoramento da viabilidade da bactéria<sup>18</sup>.

A porta de entrada para o bacilo permanece incerta, embora seja amplamente aceito que, na maioria das vezes, o bacilo provavelmente entra no corpo pelo trato respiratório. O nariz é o maior portal de saída do bacilo. Pacientes multibacilares podem verter milhões de bacilos por dia em suas secreções nasais. De fato, acredita-se que um paciente multibacilar possa apresentar cerca de 100 milhões de organismos vivos por dia em suas secreções nasais. Entretanto, a descarga nasal se torna bacteriologicamente negativa com a PQT, e esta observação tem grande importância no controle da endemia. Ferimentos na pele também poderiam servir como porta de saída para estes bacilos. Estudos longitudinais tem repetidamente confirmado que pacientes com alta carga bacilar constituem a maior fonte de infecção. Mas também o possível papel dos pacientes paucibacilares precisa ser esclarecido, especialmente tendo em vista um número significativo desses pacientes estão em áreas endêmicas. Existem casos documentados de transmissão vertical (mãe-filho) e também casos paucibacilares associados a tatuagens na Índia<sup>27, 28, 29, 30</sup>.

O *M. leprae* tem alta infectividade e baixa patogenicidade, ou seja, infecta muitas pessoas, embora poucas delas adoeçam. Dentre essas, algumas apresentam resistência ao bacilo, constituindo os casos paucibacilares (PB), que abrigam pequeno número de bacilos no organismo, aparentemente insuficientes para infectar outras pessoas. Um número menor de pessoas não apresenta resistência ao bacilo, o qual se multiplica no organismo infectado, passando a ser eliminado para o meio exterior e podendo infectar outros indivíduos. Essas pessoas constituem os casos multibacilares (MB), que são a principal fonte de infecção e manutenção da cadeia epidemiológica da doença<sup>15, 24</sup>.

A infecção subclínica ocorre em uma grande proporção de pessoas<sup>31</sup>. Em uma minoria de indivíduos infectados ocorre a propagação do bacilo para nervos periféricos e pele onde é fagocitado por células de Schwann e macrófagos. Uma vez instalada no organismo, o bacilo tem um período de incubação que pode variar de 2 a 10 anos com uma média de cinco anos. A localização intracelular obrigatória no sistema fagocítico mononuclear é que imprime a característica de doença crônica á hanseníase<sup>32</sup>.

Há boas evidências de que a hanseníase é transmitida de pessoa para pessoa no curso da interação social normal<sup>33</sup>. Moet et al.<sup>34</sup> mostrou que o risco de infecção foi maior em

contatos domiciliares dos casos índices, menor nos vizinhos e contatos sociais, e menores em pessoas com nenhum contato com uma pessoa com hanseníase.

Pelo fato do *M. leprae* ainda não ser cultivado *in vitro*, as dinâmicas de transmissão exatas não são conhecidas, mas gradualmente vem se tornando mais clara por meio da genotipagem dos isolados, que mostra, por exemplo, que hanseníase em tatus na Louisiana e Texas (EUA) é a mesma que a encontrada em pessoas da mesma área<sup>35</sup>. No entanto, não existem evidências de que um reservatório animal é importante em outros lugares, mas a genotipagem tem possibilitado olhar para os padrões de transmissão entre as pessoas em áreas endêmicas, como a ilha de Cebu, nas Filipinas<sup>36</sup>.

### **2.1.2. Classificação clínica, imunidade e tratamento na hanseníase.**

Muito antes da introdução da PQT, Ridley e Jopling<sup>37</sup> propuseram uma classificação para hanseníase baseada em critérios clínicos, imunológicos e histológicos, onde foi estabelecido um espectro com os extremos representados pelos tipos polares tuberculóide (TT) e lepromatoso (LL) e as formas intermediárias, subdivididos em borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatoso (BL).

A manifestação inicial da doença pode ser a forma clínica indeterminada (I), onde a resposta do hospedeiro é insuficientemente diferenciada para permitir classificação. Pode evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos clínicos da doença estabelecida dentro do espectro, dependendo da sua capacidade em montar uma resposta imune celular contra o *M. leprae*<sup>24</sup>. Neste estágio, apesar da dificuldade do diagnóstico clínico, é onde a hanseníase pode ser curada facilmente<sup>28</sup>.

No espectro tuberculóide (TT e BT) a hanseníase se apresenta como máculas bem delimitadas, com bordas eritematosas elevadas, zonas centrais atróficas hipopigmentadas e hipoestésicas. Na face é difícil encontrar diminuição da sensibilidade devido a uma abundante inervação. Esta associada também com anidrose<sup>28</sup>

Os pacientes com hanseníase tuberculóide (TT) possuem um estado imunológico competente que limita o crescimento do bacilo e sua manifestação está relacionada à exacerbação da resposta imune celular, com poucas e delimitadas lesões e formação de granulomas bem definidos, embora a degradação do tecido dos nervos seja frequente<sup>38</sup>. Devido às condições imunológicas do paciente, pode apresentar cura espontânea.

O espectro lepromatoso (LL e BL) se caracteriza por pápulas e nódulos que confluem, podendo originar uma infiltração difusa da pele podendo dar lugar à chamada face leonina e madarose. As lesões frequentemente são simétricas e bilaterais. Nas etapas precoces a pele pode apresentar uma aparência infiltrada e cerosa. Neste espectro existe comprometimento nervoso e incapacidades maiores que no polo tuberculóide. Apresentam duas situações clínicas distintas que são a nodular e a difusa<sup>28</sup>.

Os pacientes com hanseníase lepromatosa apresentam-se com alta susceptibilidade caracterizada pela deficiência da resposta imune celular e uma excessiva multiplicação dos bacilos, apresentando inúmeras lesões de pele e disseminação da infecção para vísceras e tecidos nervosos. A imunidade humoral está presente apenas no polo lepromatoso que exibe alta quantidade de anticorpos específicos, como o anti-PGL-1, associado com a depressão da imunidade celular<sup>24, 37, 38</sup>.

Vários estudos comprovam a relação da resposta imune do paciente com as diferentes formas da doença, devido à dicotomia imunológica entre hospedeiro e bacilo<sup>24, 38, 39, 40</sup>.

Mutiset al<sup>41</sup> estudando o padrão de citocinas produzidas pelos Linfócitos T(LT) do sangue periférico em hansenianos, encontraram linfócitos com atividades semelhantes aos LTh1 (helper 1) e LTh2 (helper 2). Segundo os autores, na forma Tuberculóide os bacilos estimulariam os linfócitos Th1 a produzirem altos níveis de interleucina-2 (IL-2) e de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), responsáveis pela ativação macrofágica, enquanto, na forma HV, a estimulação dos LTh2 levaria a produção de níveis elevados de IL-4, que atua sobre os linfócitos B (LB) levando a produção de anticorpos. Entretanto, os mecanismos que ditam a polarização da resposta imune não estão esclarecidos, mas fatores genéticos devem estar envolvidos<sup>42, 43, 44</sup>.

Outro aspecto importante a ser considerado são os episódios reacionais, descritos como fenômenos agudos sobrepostos à evolução crônica e insidiosa da hanseníase, os quais são potencialmente responsáveis por perda funcional de nervos periféricos e agravantes das incapacidades. As reações decorrem do processo inflamatório e resposta imunológica, dirigida contra os antígenos do *M. leprae*, e se correlacionam com a carga bacilar e o status imune do hospedeiro. O diagnóstico precoce, o manejo terapêutico adequado dos eventos reacionais graves, recorrentes ou crônicos são desafios atuais<sup>45</sup>.

São dois os eventos reacionais que podem ocorrer durante a evolução da hanseníase: a reação tipo 1, mediada por células, e outra mediada por anticorpos, denominada reação tipo 2.

A reação do tipo 1, ou reação reversa tornou-se mais proeminente nos programas de controle da hanseníase desde a introdução da PQT, possivelmente por causa do melhor monitoramento dos pacientes. Ocorrem geralmente durante a PQT, embora alguns casos BT tratados por seis meses possam apresentar-se com reação reversa após o término da terapia. Apresenta-se geralmente como uma exacerbação de lesões pré-existentes além do acometimento de nervos periféricos. Não há ainda um consenso sobre a sua patogênese. Alguns autores subdividem essas reações em reações de piora ou “downgrading” que ocorrem antes do indivíduo iniciar o tratamento e seriam devidas a multiplicação bacilar, e reações de melhora ou “upgrading” que surgem quando o paciente já está em tratamento e estariam ligadas à liberação de determinado tipo de antígeno. Outros consideram que as reações que ocorrem antes, durante ou após o tratamento, tem a mesma conotação e estão relacionadas sempre à multiplicação bacilar ou destruição parcial ou total dos mesmos pelo sistema imune do paciente ou pela terapêutica, e também pela liberação de antígenos que gerariam uma reação de hipersensibilidade. Em casos de suspeita de reação reversa, uma conduta apropriada seria o exame baciloscópico para a exclusão da recidiva bacteriana, e quando possível a coleta de uma biópsia para confirmação do diagnóstico<sup>18, 45, 46</sup>.

Essa discordância tem implicações terapêuticas, pois se as reações tipo 1 que ocorrem após o tratamento são decorrentes de um fenômeno imunológico ligado a presença de antígenos, elas devem ser tratadas somente com corticoides. Por outro lado, se esse fenômeno agudo acontece devido à multiplicação de bacilos, os pacientes que sofrem estas reações após o término do tratamento devem ser tratados por períodos mais longos ou até mesmo retratados, o que acarretaria um grande impacto no programa de controle da hanseníase<sup>46</sup>.

Um elemento crucial no manejo adequado das reações reversas é a detecção e o tratamento precoce, pois estes previnem as neurites que geram extensas deformidades. O tratamento é feito com corticosteróides e depende do grau de severidade da reação. Um acompanhamento regular, com o mapeamento das áreas de sensibilidade dos pacientes também são estratégias simples que previnem e contribuem para uma melhora na qualidade de vida dos pacientes<sup>18</sup>.

Na reação tipo 2 ou reação de eritema nodoso (ENH), que ocorre usualmente durante o tratamento específico, há destruição de bacilos com liberação de antígenos e formação de

complexos imunes que fixam o complemento causando inflamação e alterações teciduais. Durante o tratamento para a reação tipo 2 a droga de eleição é a Talidomida, que por ser uma substância com efeitos teratogênicos, deve ser administrada em mulheres que não estejam em idade fértil, ou então, sob cuidadosa supervisão<sup>18,46</sup>.

A detecção precoce dos casos e a regularidade na tomada mensal das drogas do esquema PQT continuam sendo as principais estratégias para o tratamento e eliminação da hanseníase. A PQT encurta a duração da infecciosidade e, por conseguinte reduz o risco de transmissão para os indivíduos saudáveis na comunidade. Três décadas atrás, a PQT foi aplicada em doentes em mais de 122 países e cerca de 16 milhões de pacientes foram curados. Em 2012, os dados estatísticos mostram que menos de 20 países relataram > 1000 novos casos, o que indica que a hanseníase tende a ficar gradualmente limitado a um pequeno número de países<sup>19,47</sup>.

Entretanto, com a diminuição da incidência e prevalência da doença, tem havido uma tendência natural de desativação de serviços, levando a falhas na supervisão do tratamento. Assim, a irregularidade do tratamento predispõe ao desenvolvimento de incapacidades físicas e ocorrência de recidivas, que em pouquíssimos casos têm sua causa investigada para elucidação se estas decorrem de falha no tratamento, reinfecção, persistência bacilar ou resistência às drogas.

### **2.1.3. Diagnóstico clínico e laboratorial da hanseníase**

O diagnóstico da hanseníase é clínico e se baseia em três sinais cardinais que foram propostos por um comitê da OMS em 1997: 1- lesões dermatológicas hipopigmentadas ou eritematosas na pele com perda de sensibilidade; 2- espessamento de nervos periféricos; 3- baciloscopia positiva ou bacilos na biópsia. Há relatos que mostram uma sensibilidade de até 97% quando os três sinais são positivos. Quando se utiliza a quantificação de lesões anestésicas hipopigmentadas nos pacientes multibacilares cerca de 30% dos casos podem ser sub-diagnosticados, em comparação com os pacientes paucibacilares nos quais até 90% dos casos são diagnosticados por meio da observação dessas lesões. O espessamento dos nervos periféricos normalmente sucede a aparição de máculas anestésicas e comprometimento tem uma distribuição característica e frequentemente são mais importantes nos casos multibacilares<sup>28,48,49,50,51</sup>.

Em muitos serviços, o exame baciloscópio para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) é utilizado para confirmação diagnóstica e auxílio na classificação. A baciloscopia tem uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 50%. O material obtido para a realização deste exame é coletado de lóbulo de orelha, dos cotovelos, dos joelhos ou de lesões na pele. Utiliza-se a coloração de Ziehl-Neelsen para a visualização da micobactéria. O resultado é interpretado utilizando a escala logarítmica de Ridley para determinação do índice baciloscópio, resultado este expresso em cruces (0 a 6+), que é o número equivalente de bactérias por campo observado na lâmina. Para os casos de difícil diagnóstico, biópsias de pele ou nervo são obtidas e o diagnóstico é feito com base em achados histopatológicos e na presença de BAAR. A coloração de BAAR requer pelo menos  $10^4$  organismos por grama de tecido para uma detecção confiável, o que torna sua sensibilidade baixa, particularmente nos pacientes com forma tuberculóide da doença, nas quais os bacilos são raros ou ausentes<sup>28, 52, 53</sup>,

A determinação do índice bacteriológico ou baciloscópio é muito importante e de grande relevância para o controle da hanseníase. Entretanto, a qualidade da coleta do raspado intradérmico, dos corantes e do procedimento de fixação das lâminas, assim como dos microscópios para leitura, são os pontos frágeis nos programas de controle da hanseníase. Sendo assim, um rigoroso controle de qualidade, com contínua supervisão e monitoramento são necessários para que os altos padrões sejam mantidos<sup>18</sup>.

O índice morfológico dá uma indicação da proporção de bacilos viáveis no paciente. É realizado pela observação da morfologia do bacilo, que deve estar com a parede celular íntegra. Neste caso, o bacilo deve estar isolado (nunca em globias). O bacilo íntegro destaca-se entre os demais por apresentar-se com extremidades preservadas, bordos lisos e regulares com uniformidade em sua coloração. O índice morfológico é dado de acordo com o número de bacilos íntegros observados para cada esfregaço. Por exemplo: 1 bacilo íntegro (livre) entre outros 99 bacilos (também livres e fragmentados) = IM 1%<sup>54</sup>.

Bacilos que se apresentam com coloração mais desbotada, e parede celular rompida, tem um forte indicativo de bacilo morto. O índice é liberado em porcentagem, sendo que a principal dificuldade é a contagem dos bacilos, pois, enquanto no índice baciloscópio o examinador pode estimar a quantidade de bacilos presentes na amostra de acordo com o tamanho das globias, no índice morfológico os bacilos a serem considerados na contagem tem que estar livres, ou seja, não podem estar aglomerados. Para a liberação deste resultado, os mesmos cuidados observados no índice baciloscópio devem ser mantidos. Entretanto, existem problemas com a padronização e reprodutibilidade, uma vez que a observação dos

contornos bacilares é difícil e subjetiva, e precisa de um observador experiente e bem treinado. Diante das dificuldades em usar este parâmetro em condições de campo, a técnica deve ser utilizado somente em centros de referência<sup>18</sup>.

Não há nenhum teste padrão-ouro em hanseníase, e o diagnóstico final é alcançado por uma combinação de vários critérios considerando exame clínico, baciloscopia e histopatologia<sup>55, 56</sup>.

#### **2.1.4. Diagnóstico alternativo na hanseníase**

##### **2.1.4.1. PGL-1**

Abordagens diagnósticas alternativas vêm sendo utilizadas por meio de alguns antígenos exclusivos do *M. leprae*, como o PGL-1, presente no envoltório do bacilo que são encontrados nos tecidos infectados e desencadeiam resposta imune humoral precocemente. Outras espécies micobacterianas possuem antígenos glicolipídicos, mas eles diferem entre si por sua porção de carboidratos, que é o determinante antigênico da molécula. Assim, a detecção de anticorpos anti-PGL-1 por meio do teste de ELISA (do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) vem sendo utilizada para análises epidemiológicas em comunidades endêmicas principalmente porque a diminuição da prevalência é acompanhada pela detecção reduzida de soropositivos para PGL-1 em crianças<sup>57</sup>.

Bührer e col. (1998)<sup>58</sup> descreveram um teste capaz de detectar anticorpos anti-PGL-1 no sangue de pacientes hanseníacos por meio de um Ensaio de *Dipstick* que apresenta alta concordância com o teste de ELISA. Ambos os sistemas (ELISA ou *Dipstick*), alternativos ao diagnóstico convencional, mostraram-se pouco sensíveis, porém muito específicos para a detecção de anticorpos contra essa molécula que representa a possível presença do bacilo em amostras de sangue desses indivíduos<sup>58</sup>.

##### **2.1.4.2. Experimentação em camundongos- Técnica de Shepard**

Desde que a técnica de inoculação em camundongos foi descrita por Shepard e confirmada por Rees<sup>22</sup>, vários trabalhos em diversas partes do mundo tem buscado melhorar a técnica e utilizá-la em diversas frentes de trabalho. Nos últimos 50 anos, a técnica tem sido extensivamente utilizada em testes de triagem para novas drogas, pesquisa viabilidade, testes para agentes imunoproliféricos e estudos para determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Nas últimas décadas, o foco dos estudos vem mudando conforme as tentativas

de aprimoramento e melhor entendimento dos resultados. Um dos resultados do aprimoramento da técnica de Shepard foi a implantação da PQT. Testes realizados em camundongos mostraram que uma associação de drogas era mais eficiente do que a administração de uma droga única. Assim, Rifampicina e Clofazimina se juntaram a Dapsona como drogas de eleição no combate à doença<sup>10</sup>. O modelo de inoculação em pata de camundongo proposto por Shepard é preconizado pela OMS como “padrão ouro” em algumas situações:

(i) Resistência medicamentosa: vários trabalhos têm sido publicados para detecção de cepas com resistência primária ou secundária, mas a utilização da técnica requer condições mínimas e necessárias, como por exemplo, um inóculo mínimo de  $5,0 \times 10^3$ , pessoal profissional especializado, um biotério em condições adequadas para criação e manutenção dos animais. Poucos lugares no mundo ainda realizam este procedimento, e mesmo baixa frequência de publicação os trabalhos são suficientes para demonstrar que embora seja limitada e de baixa sensibilidade, sua utilização dessa metodologia até o momento tem sido alternativa na identificação de resistência medicamentosa em pacientes<sup>59,60,61,62,63,64</sup>.

(ii) Testes para agentes imunoproliféricos: o modelo de inoculação em pata de camundongo tem sido utilizado também na identificação de agentes imunoterapêuticos/imunoproliféricos contra o *M. leprae*, que possam atuar como possível vacina<sup>65,66</sup>.

(iii) Estudos em imunopatogênese: alguns estudos utilizam o modelo Shepard com a finalidade de estabelecer os mecanismos de patogênese e proteção na hanseníase, por meio do estudo sobre os padrões da resposta imune, e da interação parasita-hospedeiro usando abordagens genômicas. Para pesquisadores que buscam maior entendimento sobre estas interações, a inoculação em camundongos ainda é de grande utilidade<sup>67,68</sup>.

(iv): Quimioterapia experimental: com a diminuição do interesse da indústria farmacêutica na identificação de novos compostos para o tratamento da hanseníase, essa técnica ainda é utilizada em centros de pesquisa especializados com a finalidade na identificação de novas drogas antimicobacterianas<sup>10,69</sup>.

(v): Identificação do *M. leprae*: Depois do desenvolvimento de diversas sondas e métodos de amplificação gênica para o *M. leprae*, a necessidade do cultivo da bactéria em pata do camundongo para propósitos de identificação é meramente de interesse acadêmico<sup>70, 71</sup>.

(vi): Determinação de viabilidade: o modelo da pata de camundongo foi extensivamente utilizado para estabelecer e monitorar a viabilidade dos bacilos da hanseníase para desenvolvimento de testes quimioterápicos e também para estudar a viabilidade do *M. leprae* fora do corpo humano<sup>72, 73</sup>.

Enquanto o método foi importante neste tipo de pesquisa, o modelo revelou-se de uso limitado, pois, a maioria dos pacientes apresentam necessariamente uma carga bacteriana baixa e provavelmente 90% não tem organismos suficientes, ou seja, 5-10.000 bacilos/pata para a inoculação. Alguns pesquisadores relatam o crescimento do *M. leprae* provenientes de amostras paucibacilares e esfregaços negativos, o que indicaria uma viabilidade alta ainda que o número de bactérias seja baixo. Estes são resultados isolados e raros<sup>74,75,76,77</sup>.

Em segundo lugar, existem metodologias alternativas validadas e rápidas para estabelecer a viabilidade do *M. leprae*, tais como bioluminescência com ATP, PCR, RT-PCR e real time PCR usando um alvo de RNA. Enquanto técnicas como bioluminescência são baseadas na estimativa de produção de ATP pela bactéria e requerem >100 bacilos vivos por amostra, os métodos moleculares usando alvos específicos de DNA e RNA podem detectar menos que 10 organismos. Tais métodos também são úteis para detectar *M. leprae* vivos no meio ambiente<sup>77,78,79,80,81</sup>.

#### 2.1.4.3. A PCR no diagnóstico da hanseníase

A impossibilidade de cultivo do *M. leprae* em meio de cultura axênico complica sobremaneira o desenvolvimento de ensaios laboratoriais para o melhor entendimento das questões mencionadas anteriormente, assim como os protocolos clínicos são complicados pela progressão lenta do bacilo. No entanto, o conhecimento de algumas sequências nucleotídicas do *M. leprae* anterior ao sequenciamento do seu genoma tornou possível a realização de métodos de amplificação enzimática de DNA e identificação do bacilo em amostras clínicas.

O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) trouxe uma oportunidade sem precedentes para a detecção sensível, específica e rápida de *M. leprae* em amostras clínicas<sup>82</sup>.

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm utilizado a PCR para o desenvolvimento de diferentes sistemas de amplificação de varias sequências genômicas de *M. leprae* visando aumentar o limite de detecção, principalmente quando um número baixo de bacilos está presente<sup>83,84,85,86,87,88</sup>. Desse modo, inúmeras metodologias para a detecção do bacilo em amostras clínicas foram descritas<sup>89,90</sup> e muitos estudos envolvendo sistemas simples e específicos foram padronizados para amplificação de regiões gênicas que codificam para o antígeno de 36-kDa<sup>91</sup>, de 18-kDa<sup>92</sup> ou de 65-kDa<sup>93</sup>, assim como para outras sequências repetitivas<sup>94</sup> do *M. leprae*.

#### **2.1.4.3.1. Viabilidade molecular do *M. leprae***

Embora a PCR para DNA seja amplamente aceita para detecção da infecção, uma importante limitação é sua inabilidade para distinguir entre organismos viáveis e não viáveis.

Face ao exposto, a padronização de um método sensível e específico para a detecção da viabilidade do *M. leprae* pode auxiliar no diagnóstico em estágios mais precoces da doença e no tratamento, principalmente na questão recidivas/reações. No entanto, a única medida definitiva da viabilidade bacteriana é a capacidade de replicação. Um ensaio de RNA é uma ferramenta adicional para o diagnóstico molecular e determinação da viabilidade do bacilo da hanseníase.

Dessa forma, métodos de detecção de RNA têm sido propostos, nos últimos anos como ferramenta promissora para detecção não somente do *M. leprae*, mas também para realizar importante discriminação entre organismo viável e não viável, com vistas ao correto prognóstico dos pacientes de hanseníase durante o tratamento, determinação de resistência a drogas ou identificação de recidiva e sua diferenciação com as reações hansênicas<sup>13,95</sup>.

Publicação de Martinez e Col. (2009)<sup>13</sup> ampliou as possibilidades de um melhor entendimento sobre a estabilidade dos RNAs mensageiros do *M. leprae*, mais particularmente da longevidade da mensagem do gene 16S RNAr que foi avaliada após a morte do bacilo por meio do ensaio de PCR em tempo real (sodA RNAm/16S rRNA). Um detalhe importante deste estudo foi a escolha do DNA da sequência repetitiva (RLEP) específica do *M. leprae* como normalizador estável dessa análise, por ser uma ferramenta de enumeração molecular objetiva e rápida para detecção e quantificação do número de bacilos na amostra<sup>13</sup>. A técnica de PCR tem sido de extrema utilidade principalmente no diagnóstico de casos do tipo neural puro, casos paucibacilares e pacientes com apresentação clínica atípica e histopatologia

compatíveis com hanseníase. Também, a detecção do *M. leprae* em diferentes amostras de contatos de pacientes com hanseníase parecem ser muito promissora. Embora a positividade do *M. leprae* não seja suficiente para estabelecer uma relação com a progressão da doença, a quantificação por qPCR poderia indicar um risco em desenvolver a doença e poderia alertar os clínicos numa abordagem mais direta com os contatos, e até mesmo definir regras de quimioprofilaxia<sup>96</sup>.

Trabalho recente de Davis e col (2013)<sup>97</sup> investigaram a viabilidade do *M. leprae* em tecidos de animais *nu/nu* experimentalmente infectados e tratados com rifampicina e rifapentina. Neste estudo os pesquisadores concluíram que os ensaios de qPCR são indicadores sensíveis e confiáveis para detectar a viabilidade do bacilo em tecidos sem a necessidade de isolamento bacteriano ou processamento imediato, tornando-o uma ferramenta importante em amostras clínicas diretas e em pesquisas de campo<sup>97</sup>.

Uma aplicação importante da técnica de qPCR seria naqueles casos de difícil diagnóstico clínico e histopatológico. Trabalho de Barbieri e Col.<sup>98</sup> demonstraram que a técnica pode ser aplicada principalmente naqueles casos paucibacilares de lesão única onde a ausência de características típicas histopatológicas dificulta o diagnóstico da doença. Nestes casos, a técnica molecular reduziria a demora no diagnóstico e evitaria o tratamento excessivo<sup>98</sup>.

### 3. Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade bacilar por meio da detecção de 16S r RNA específico para o *M. leprae* com a normalização das quantidades totais de micobactérias a partir da quantificação do DNA total do bacilo (RLEP) em biópsias de pacientes e do coxim plantar de camundongos.

#### 3.1. Objetivos específicos

- Otimizar e aplicar a técnica de qPCR (Real Time RT-PCR) para avaliação da viabilidade de *M. leprae*.
- Aplicar a técnica de qPCR na avaliação do tratamento e nos casos de suspeita de recidiva.
- Estabelecer um banco de cDNA de biópsia de pele de pacientes com hanseníase para estudos futuros da expressão de genes humanos associados a virulência bacteriana e de genes do *M. leprae* associados a sobrevivência intracelular.

## **4. Casuística e Métodos**

### **4.1. Casuística**

Neste estudo foram incluídos 50 pacientes (43 multibacilares e sete paucibacilares) atendidos no ambulatório do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP e com diagnóstico confirmado de hanseníase após a avaliação dermatoneurológica e classificação clínica realizada de acordo com os critérios de Ridley e Jopling<sup>37</sup>.

Os pacientes foram divididos em três grupos:

Grupo 1: 25 pacientes avaliados no diagnóstico, no decurso do tratamento e quando possível ao final do mesmo.

Grupo 2: 11 pacientes com suspeição de recidiva, com tratamento finalizado há pelo menos cinco anos e com no mínimo um ciclo de PQT/MB.

Grupo 3: 12 pacientes na iminência do término do tratamento.

Informações adicionais dos pacientes podem ser encontradas nos anexos 1, 2 e 3.

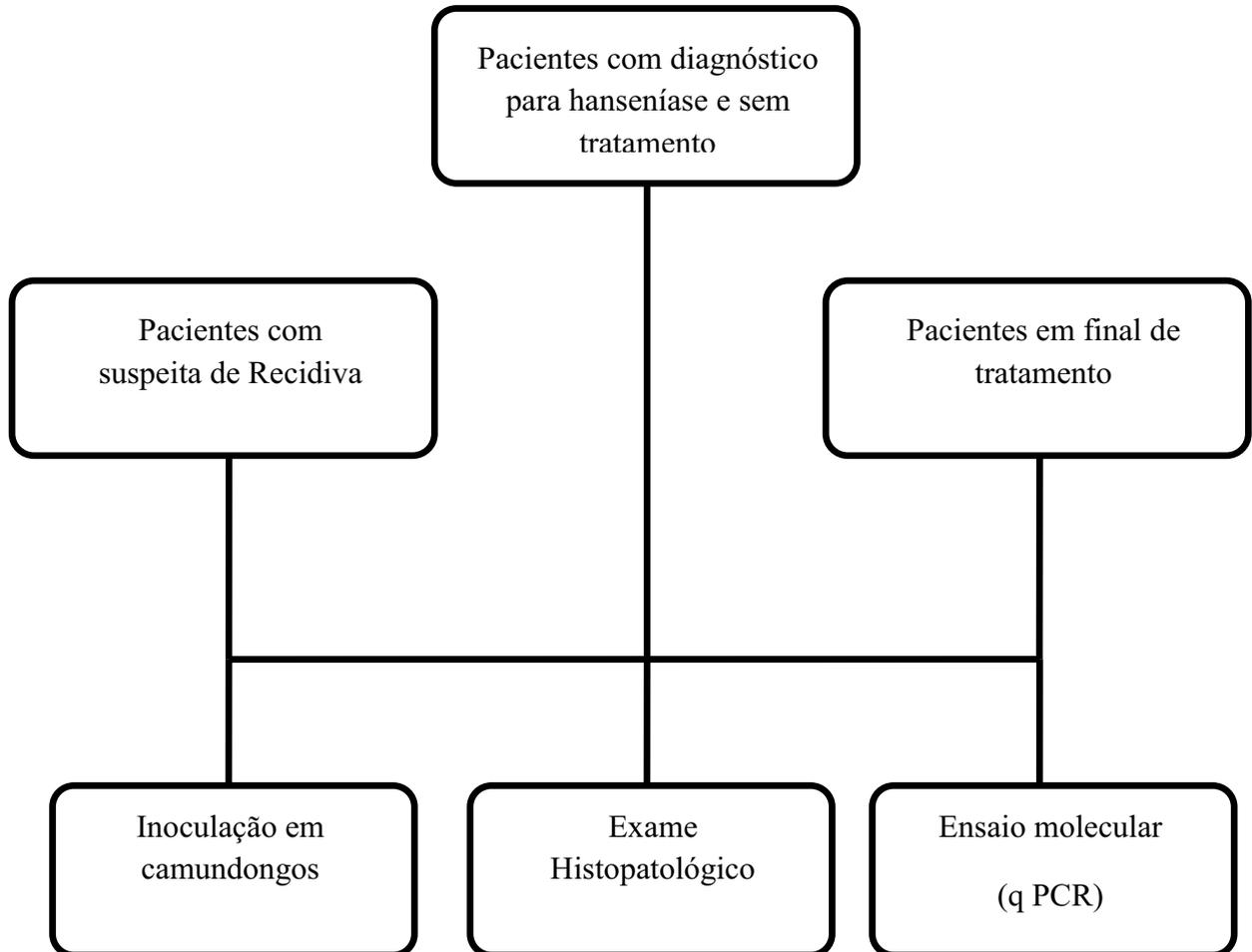
## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Coleta das biópsias**

Após antissepsia e anestesia local foram coletadas duas biópsias cutâneas: (i) uma com punch n° 8 (dividida ao meio para extração de RNA e inoculação em coxim plantar de camundongos) e (ii) outra com punch n° 6 (para exame histopatológico). Quando não foi possível a coleta com punch, e a critério do clínico, foi realizado um fuso, e a peça foi então dividida em três partes e encaminhada aos laboratórios para os procedimentos, a seguir:

1. Inoculação em coxim plantar de camundongos e exame histopatológico.
2. Extração de RNA: as biópsias foram colocadas em 600 $\mu$ L de solução estabilizadora de RNA (Ambion®) ainda na sala de procedimentos e em seguida levadas ao laboratório para armazenamento a -20°C até o momento de uso.

**Figura 1.** Fluxo de coleta e processamento das biópsias de pele



#### **4.2.2. Critérios de inclusão.**

Pacientes maiores de 18 anos, que receberam o diagnóstico clínico e bacteriológico de hanseníase, que aceitaram o convite para a participação no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). (Apêndice).

### 4.2.3. Exame histopatológico.

O fragmento de biópsia cutânea foi fixado em formalina a 10% tamponada e enviado para exame histopatológico e baciloscopia, segundo a rotina diagnóstica do Instituto Lauro de Souza Lima.

Na análise histopatológica e baciloscópica, foram realizados cortes histológicos seriados de 5µm de espessura que em seguida foram corados por Hematoxilina-Eosina (H&E) para análise do infiltrado celular e presença de granulomas e por Faraco- Fite, coloração específica para bacilos ácido-álcool resistentes, utilizado para a contagem do *M. leprae* presente na lesão cujo o resultado foi expresso na forma de cruces: 0 a 6+.

A determinação do índice baciloscópico (IB) do paciente (raspado intradérmico) e o índice baciloscópico das biópsias (IBB) seguiram os critérios descritos por Ridley e Jopling<sup>37</sup>, a seguir nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Escala logarítmica de Ridley<sup>37</sup>.

IB	Leitura
0	Nenhum BAAR em 100 campos microscópicos.
1+	1 a 10 BAAR em 100 campos microscópicos.
2+	10 a 100 BAAR em 100 campos microscópicos.
3+	100 a 1000 BAAR em 100 campos microscópicos.
4+	1000 a 10.000 BAAR em 100 campos microscópicos.
5+	10.000 a 100.000 BAAR em 100 campos microscópicos.
6+	Mais de 100.000 BAAR em 100 campos microscópicos.

IB= Índice Baciloscópico; BAAR= bacilo álcool-ácido resistente.

**Tabela 2.** Guia para histologia e classificação clínica dos grupos em hanseníase.

Classificação Clínica	ÍBB (IH)
I	Baciloscopia sempre negativa
TT	0 ou 1+. Muito raro os casos que apresentam BAAR.
BT	0 a 2+.
BB	3+ a 4+
BL	4+ a 5+.
LL	5+ a 6+.

ÍBB (IH) = índice baciloscópico da biópsia; I= forma indeterminada; TT= forma tuberculóide; BT= forma borderline-tuberculóide; BB= forma borderline-borderline; BL= forma borderline lepromatosa; LL= forma lepromatosa.

#### **4.2.4. Inoculação em coxim plantar de camundongos isogênicos BALB/c (técnica de Shepard - 1960)<sup>8</sup> - Laboratory Techniques for Leprosy<sup>99</sup>.**

Para comprovação da presença de bacilos viáveis nas amostras testadas (início e final do tratamento), suspensões obtidas a partir de biópsias de pacientes com hanseníase foram inoculadas em camundongos, conforme protocolo descrito a seguir.

Brevemente, cada biópsia foi pesada em balança de precisão. Em seguida o tecido biopsiado foi lavado com solução salina estéril em uma placa de petri, cortado em pequenos fragmentos com auxílio de uma tesoura de ponta curva e pinça reta.

Após essa etapa, o tecido foi homogeneizado em 2,5mL de solução salina balanceada de Hank's (HBSS GIBCO<sup>®</sup>). A seguir, 2mL da solução foram retirados do homogeneizador e imediatamente transferidos para um tubo de ensaio. Este inóculo é chamado de normal (N), ou seja, a amostra concentrada sem diluição. Em seguida o inóculo foi diluído nas seguintes concentrações: (i) 1/10 do inóculo inicial (450µL de HBSS + 50µL do inóculo inicial (N)); (ii) 1/100 do inóculo inicial (450µL de HBSS + 50µL do inóculo diluído 1/10). Após a diluição da amostra, foram confeccionadas lâminas como descrito a seguir:

Cada lâmina (três para cada paciente, observando-se as diluições N, 1/10 e 1/100) foi marcada com três círculos de um cm de diâmetro cada. Em cada círculo foram depositados 10µL de solução fenol – soro fetal bovino 2% e 10µL do inóculo correspondente. O material depositado sobre cada lâmina foi então homogeneizado, respeitando-se o círculo de um cm. Após a secagem completa das lâminas, procedeu-se a fixação das mesmas pelo método de flambagem em bico de Bunsen (três ou quatro vezes para cada lâmina). A seguir, as lâminas foram submetidas a coloração pelo Método de Ziehl-Neelsen a frio<sup>54</sup>.

Após a coloração foi realizada a leitura das mesmas em microscópio binocular com objetivas planocromáticas (Nikon Eclipse E200) utilizando-se a objetiva de imersão 100x. Para cada círculo de cada lâmina foi realizada a contagem de bacilos em campos alternados, totalizando 60 campos. Após a contagem, os cálculos abaixo foram realizados com a finalidade de ajustar a concentração de bacilos para  $1,0 \times 10^4$  bacilos em 0,03mL para inoculação em camundongos.

BAAR/Campo = total de bacilos dividido pelo número de campos;

BAAR/mL = BAAR/Campo x  $\frac{\text{área de abertura da lâmina}}{\text{área de abertura da objetiva}}$

BAAR/0,03mL = BAAR/mL x 0,03mL

Para cada amostra a inoculação foi realizada por via intradérmica (Anexo 4) nos coxins plantares traseiros de 10 camundongos da linhagem BALB/c, com 6 a 8 semanas de idade e de ambos os sexos. Quando a contagem de bacilos não foi suficiente para a inoculação, ou seja, quando não atingiu o mínimo necessário exigido pela técnica que é  $5,0 \times 10^3$  bacilos em 0,03mL, qualquer quantidade foi inoculada, e neste caso, optamos por usar cinco camundongos imunodeficientes da linhagem *nude/nude* para cada amostra de paciente.

Os animais foram mantidos em salas climatizadas, em estantes de ventilação com temperatura média de 22°C (Anexo 5), recebendo água e ração *ad libitum*.

Após oito meses de inoculação os camundongos foram anestesiados com xylazina 10% (115mg/kg) e ketamina 2% (10mg/kg), administrados por via intraperitoneal e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, ambos os coxins plantares do tecido inoculado foi excisado e um deles foi imediatamente colocado em solução estabilizadora de RNA (Ambion<sup>®</sup>) e o outro foi macerado de acordo com o protocolo utilizado para a biópsia de pacientes (previamente descrito). O cálculo para determinação da multiplicação bacilar foi o seguinte:

BAAR/Campo = total de bacilos dividido pelo número de campos.

BAAR/mL = BAAR/Campo x  $\frac{\text{área de abertura da lâmina}}{\text{área de abertura da objetiva}}$

BAAR/mL x 2,0mL ÷ recuperado x volume inicial ÷ 4.

Foi considerada multiplicação bacilar quando o recuperado foi  $\geq 100.000$  ( $10^5$ ) bacilos/coxim plantar.

#### 4.2.5. Extração de RNA de *M. leprae*.

O RNA do *M. leprae* foi extraído e purificado utilizando-se os reagentes TriReagent (Ambion®), tubo FastPrep® ProBlue (MP-Biomedicals) e o equipamento FastPrep 24 (MP-Biomedicals), como descrito a seguir: após a completa retirada da solução estabilizadora de RNA (Ambion®), a biópsia congelada foi congelada em nitrogênio líquido (técnica de “snapfreeze”) e pulverizada em uma base de aço inox; a biópsia pulverizada foi colocada imediatamente no tubo FastPrep® adicionado com TriReagent (Ambion®) e levado ao aparelho FastPrep 24 (MP-Biomedicals) por 40 segundos numa velocidade de 6,5m/s; em seguida o tubo com material foi centrifugado por 15 minutos numa velocidade de 12.000 G a 4°C; após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e colocado em outro microtubo. Um volume de 500µL de clorofórmio foi adicionado. Após um período de repouso, o material foi centrifugado por 15 minutos em uma velocidade de 12.000G em 4°C; a fase aquosa foi retirada e colocada em outro microtubo. Foi então adicionado um volume igual de isopropanol e gentilmente misturado. A amostra foi então levada ao freezer -20°C overnight; todo o material restante no tubo foi recolocado no tubo FastPrep® ProBlue (MP-Biomedicals) para posterior extração de DNA; após o período overnight, o microtubo foi centrifugado por 30 minutos em uma velocidade de 12.000G em 4°C; todo o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi então lavado em 500µL de etanol e então centrifugado por 15 minutos em uma velocidade de 12.000G em 4°C; Novamente o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi então ressuspendido em água DPEC Rnase/Dnase/free (Ambion®) e congelado em freezer -80°C.

Do RNA total extraído, 2µg foram tratados com DNase turbo (Ambion®) segundo as recomendações dos fabricantes e ao final, um volume de cerca de 30µL de RNA tratado foi então levado para a transcrição em cDNA.

#### **4.2.6. Transcrição reversa do RNA do *M. leprae*.**

Foram transcritos 2000ng de RNA para cDNA usando o “Advantage RT-for-PCR kit (BD Biosciences) de acordo com as recomendações do fabricante, pelo uso de “random hexamer primers” os quais são uma mistura de oligonucleotídeos representando todas as possíveis sequências para um hexamero (incluso no Kit). O controle para contaminação com DNA foi de RNA total incubado com os reagentes para transcrição, excluindo a transcriptase reversa.

Após a transcrição, as amostras foram novamente quantificadas e diluídas para uma concentração de 25ng/μL.

#### 4.2.7. Ensaio de viabilidade para o *M. leprae* utilizando qPCR

Os níveis de 16S rRNA de *M. leprae* em biópsia de pele e coxim plantar de camundongos foram determinados usando qPCR. Primers e sondas foram desenhados usando o software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems) como descrito na tabela 3.

**Tabela 3** – Sequência de Primers e Sondas do alvo 16S rRNA específicos para o *M. leprae* utilizadas nos ensaios de PCR e RT-PCR TaqMan.

Alvo	Descrição	Primer	Seqüência de Primers
RNAr 16S	RNAr 16S	MLRNAr16S - F	5'-GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC - 3'
		MLRNAr16S - R	5'- CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT - 3'
		MLRNAr16S probe	5'- CAT CCT GCA CCG CA - 3'

Fonte: Martinez et al. J Clin Microbiol. 2009; 47(7) 2124–2130<sup>13</sup>.

O cDNA transcrito (2µL) foi adicionado a uma mix de PCR num volume total de 25µL (contendo 2x TaqMan master mix, 500nM de cada primer e 100nM da sonda para o ensaio 16S rRNA).

Os níveis de 16S rRNA foram normalizados com o número de bactérias utilizando-se um ensaio de qPCR para RLEP baseado em DNA previamente descrito<sup>9</sup>, e demonstrados na tabela 4.

**Tabela 4.** Sequência de Primers e Sondas do alvo RLEP específico para o *M. leprae* utilizadas nos ensaios de PCR e RT-PCR TaqMan.

Alvo	Descrição	Primer	Seqüência de Primers
RLEP	Elemento repetitivo	MLRLEP - F	5'- GCA GCA GTA TCG TGT TAG TGA A - 3'
		MLRLEP - R	5'- CGC TAG AAG GTT GCC GTA T- 3'
		MLRLEP probe	5'- CGC CGA CGG CCG GAT CAT CGA - 3'

Fonte: Truman et al. PLoS Negl Trop Dis. 2008. 2(11)<sup>9</sup>:

Para este ensaio foram utilizados 2 $\mu$ L de DNA purificado adicionados a uma mix de 25 $\mu$ L contendo 2x TaqMan master mix 200nM de cada primer e 100nM da sonda.

As reações de PCR, tanto 16S rRNA quanto RLEP, foram submetidas a uma ciclagem de 50°C for 2min, 95°C for 10min, e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 minuto utilizando equipamento StepOnePlus<sup>TM</sup> (Real Time PCR Systems – Life Technologies) e a otimização da reação foi a mesma descrita por Martinez et al<sup>13</sup>, incluindo a análise de amostras em triplicata, controle negativo e positivo, além de repetição de experimentos que se mostrassem indeterminadas.

Uma curva padrão para cada ensaio de PCR foi realizada usando-se DNA de *M. leprae* purificado num intervalo de diluição que foi de 1ng (nanograma) a 100fg (fentograma) utilizando uma diluição 1/10 e de 50fg à 6,25fg utilizando uma diluição 1/2.

#### 4.2.8. Extração de DNA de *M. leprae*.

O DNA do *M. leprae* foi purificado a partir fase aquosa e da interfase que permaneceu nos Tubos FastRNA Azul. Resumidamente, 100 $\mu$ L de Tris-EDTA 10mM (pH 8,0) e 150 $\mu$ L clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) foram adicionados à fase aquosa e ao material da interfase (~ 500 $\mu$ L) e homogeneizados por duas vezes no instrumento PQ FastPrep 24. Após centrifugação a 14.000g por 10min, a solução fase aquosa foi transferida para outro tubo e precipitada com acetato de sódio 0,3M e 2 volumes de etanol frio. O sedimento de DNA foi lavado em etanol 70%, dissolvido em 30 $\mu$ L de água destilada estéril e armazenado a -80°C até o uso.

#### 4.2.9. Análise estatística.

A curva padrão de cada análise usando os valores  $C_T$  versus a concentração serial de DNA e cDNA foi calculada usando modelos de regressão linear (GraphPadInStarversion 3 software). As médias e desvios padrões dos resultados das análises de qPCR de 16S rRNA/RLEP para detecção da viabilidade de *M. leprae* nos diversos ensaios foram analisados usando o teste T-Student. Um valor alfa de 0.05 foi usado para todas as análises. Todas as comparações estatísticas foram feitas usando o coeficiente de correlação linear de Pearson ( $r$ ), como medida de correlação entre as análises em intervalo determinado de tempo.

O número esperado de bacilos foi estimado usando uma curva de crescimento logarítmico assumindo o tempo de duplicação da bactéria como 13 dias. A curva foi ajustada usando como base uma quantidade de 4 bactérias vivas a cada  $5,0 \times 10^3$  bacilos, como descrito na literatura por Levy 1987<sup>100</sup>. Este valor foi confrontado à contagem observada e uma porcentagem de bactérias vivas foi definida. O Teste de Spearman foi usado para correlacionar a contagem de genomas (RLEP) e o número de bactérias (BAAR). A viabilidade molecular foi definida usando uma taxa de bacilos observada/estimado, e então comparado com a proporção RNA/DNA usando o pacote R.

## **5. Resultados**

### **5.1. Exame histopatológico**

Os resultados do exame histopatológico e a classificação clínica de Ridley & Jopling<sup>37</sup> de todos os pacientes avaliados podem ser observados a seguir:

#### **5.1.1. Pacientes não tratados.**

Em relação à forma clínica da doença nos pacientes não tratados foram observados um predomínio das formas BL (32% - 8/25) e BB (20% - 5/25), seguido de BT (16% - 4/25), LL (16% - 4/25), TT (8% - 2/25) e Sem Classificação (8% - 2/25). E também que em seis pacientes (24% - 6/25) havia algum tipo de reação associada. Na tabela 5 estão demonstrados os dados do exame histopatológico e da baciloscopia.

**Tabela 05** – Classificação histopatológica e baciloscopia dos pacientes não tratados.

<b>Amostra</b>	<b>Classificação R&amp;J</b>	<b>Reação</b>	<b>IBB</b>	<b>IM</b>
1	BL		5+	Positivo
2	BL		6+	Positivo
3	LL		6+	Positivo
4	BT		0	Negativo
5	TT	Tipo 1	0	Negativo
6	BL		5+	Positivo
7	BB	Tipo 1	3+	Positivo
8	BT	Tipo 1	2+	Positivo
9	SC		SI	SI
10	BB		4+	SI
14	BT		1+	Positivo
15	BL		5+	Positivo
16	BB		4+	Positivo
17	BB	Tipo 1	1+	Positivo
18	BL		5+	SI
20	LL	ENH	6+	Positivo
21	LL		6+	SI
28	TT		0	Negativo
29	BT		SI	SI
35	BL		5+	Positivo
37	BL		4+	Positivo
38	SC		SI	SI
41	BL		5+	Positivo
46	BB	Tipo 1	0	Negativo
49	LL		6+	SI

TT: tuberculóide; LL: lepromatoso; BT: borderline-tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatoso; SC – sem classificação. SI: sem informação. IBB: índice baciloscópico da biópsia. IM: índice morfológico. ENH: eritema nodoso hansênico. R&J: Ridley e Jopling.

### **5.1.2. Pacientes com suspeita de recidiva**

Foram avaliados pacientes com histórico de tratamento prévio, e que após um mínimo de cinco anos retornaram ao ambulatório de hanseníase com suspeita de doença em atividade.

Um total de 11 casos com suspeita de recidiva foram avaliados. Nesses pacientes observamos um predomínio das formas BL 45,45% (5/11), BB 27,27% (3/11), LL 18,18% (2/11) e neural puro 9,09% (1/11). E na tabela 6 também pode ser observado os tipos de reação associadas.

**Tabela 06** – Classificação histopatológica e baciloscopia dos pacientes com suspeita de recidiva.

<b>Amostra</b>	<b>Classificação R&amp;J</b>	<b>Reação</b>	<b>IBB</b>	<b>IM</b>
11	BL		5+	Positivo
13	BL		5+	Negativo
19	BL	ENH	6+	SI
22	BL	ENH	3+	SI
27	BL		SI	SI
32	LL	Regressão+ENH	Positivo	Multifragmentados
39	LL	Regressão+ENH	Positivo	Poeira bacilar
42	Neural Puro		Positivo	Negativo
44	BB	Tipo 1	Negativo	Negativo
45	BB		3+	Negativo
47	BB		SI	SI

BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatoso; LL: lepromatoso. ENH= Eritema Nodoso Hansênico.

IBB= índice baciloscópico da biópsia. IM= índice morfológico. SI: sem informação. R&J: Ridley e Jopling.

### 5.1.3. Pacientes em final de tratamento

Um total de 12 pacientes ao término da PQT foi submetido há vários exames clínicos e laboratoriais. Os dados prévios do tratamento desses pacientes não foram coletados e nenhuma metodologia foi realizada, pois estes tiveram seu tratamento iniciado em sua cidade de origem e na presença de algum tipo de piora associada a reações, foram então encaminhados ao ambulatório de hanseníase do Instituto Lauro de Souza Lima. Após avaliação clínica e as devidas condutas para alta, foram então coletadas as biópsias para esse estudo.

Os pacientes avaliados estavam distribuídos da seguinte forma: BB 8,3% (1/12), BL 41,7% (5/12) e LL 50% (6/12). Não houve nenhum caso de pacientes nos espectros TT e BT. A maioria dos casos estava associada há algum tipo de reação como podemos observar na tabela 07.

**Tabela 07.** Classificação histopatológica e baciloscópica dos pacientes do grupo final de tratamento.

<b>Amostra</b>	<b>Classificação R&amp;J</b>	<b>Reação</b>	<b>IBB</b>	<b>IM</b>
12	BL	ENH	2+	Regressão
23	BL	ENH	2+	Regressão
24	BL		5+	SI
25	BB	Tipo 1	2+	SI
26	BL	ENH	4+	SI
30	LL		3+	Multifragmentados
31	LL		5+	Negativo
33	BL	Tipo 1	5+	SI
34	LL	ENH	6+	Positivo
36	LL		6+	Positivo (raros)
40	LL	Reação Mista	4+	Granulosos
43	LL	ENH	6+	Negativo/regressão

LL: lepromatoso; BL: borderline-lepromatoso; BB: borderline-borderline. ENH: eritema nodoso Hansênico. IBB: índice baciloscópico da biópsia. IM: índice morfológico. SI: sem informação. R&J: Ridley e Jopling.

## 5.2. Resultados da inoculação em coxim plantar de camundongos.

### 5.2.1. Pacientes não tratados

As amostras do grupo de pacientes não tratados, em sua grande maioria, foram inoculadas em camundongos da linhagem BALB/c (15/20 – 75%). Em 60% (15/25) das amostras inoculadas, obtivemos uma recuperação bacilar 10 vezes superior ao inóculo inicial, como preconiza a técnica, e, portanto foram considerados resultados positivos. Em 20% (5/25) não foi possível a realização da inoculação, pois não foram encontrados bacilos, e em 12% (3/25) o resultado foi negativo, pois ao final do experimento não foi observada multiplicação bacilar. A forma clínica dos pacientes com inoculação negativa eram TT, LL e Sem Classificação.

A amostra do paciente 4 foi inoculada em camundongos *nu/nu* com  $1,2 \times 10^2$  de bacilos em 0,03 mL pelo fato de não apresentar a quantidade mínima indicada de bacilos que é  $5,0 \times 10^3 / 0,03 \text{ mL}$ . Ao final do tempo de 8 meses de inoculação a recuperação bacilar foi de  $5,5 \times 10^4$  bacilos, ou seja, um aumento de pelo menos 50 vezes a quantidade de bacilos inoculados no início.

A amostra do paciente 46 também foi inoculada em camundongos *nu/nu* com uma quantidade de  $1,2 \times 10^3$  em 0,03 mL. Ao final da inoculação, foram recuperados  $6,3 \times 10^4$  bacilos, o que configura um aumento de 16 vezes a quantidade do inóculo inicial. Esses dados estão representados na tabela 08.

**Tabela 08** - Resultado da recuperação bacilar antes e após a inoculação dos pacientes não tratados.

<b>Amostra</b>	<b>Biópsia inicial (BAARtotal)</b>	<b>Inóculo inicial (BAAR 0,03ml)</b>	<b>Resultado inoculação<sup>(a)</sup> (BAAR* Total/pata)</b>	<b>Linhagem Inoculada</b>
01	$2,75 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$3,87 \times 10^5$	BALB/c
02	$1,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^4$	$4,45 \times 10^5$	BALB/c
03	$9,75 \times 10^8$	$1,0 \times 10^4$	$4,1 \times 10^5$	BALB/c
04	$1,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	$5,5 \times 10^4$	<i>nu/nu</i>
05	$1,3 \times 10^4$	$1,0 \times 10^2$	SM	<i>nu/nu</i>
06	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^4$	$3,8 \times 10^5$	BALB/c
07	$1,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	BALB/c
08 <sup>(b)</sup>			NI	
09	$3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	$3,1 \times 10^6$	BALB/c
10	$1,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	BALB/c
14 <sup>(b)</sup>			NI	
15	$1,03 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^5$	BALB/c
16	$1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	$6,3 \times 10^5$	BALB/c
17 <sup>(b)</sup>			NI	
18	$9,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$3,3 \times 10^5$	BALB/c
20	$1,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	BALB/c
21	$3,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	SM	BALB/c
28 <sup>(b)</sup>			NI	
29 <sup>(b)</sup>			NI	
35	$1,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	BALB/c
37	$4,0 \times 10^5$	$4,8 \times 10^3$	$1,9 \times 10^6$	<i>nu/nu</i>
38	$3,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	SM	BALB/c
41	$4,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^5$	BALB/c
46	$1,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	$6,3 \times 10^4$	<i>nu/nu</i>
49	$2,2 \times 10^7$	$2,6 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$	<i>nu/nu</i>

BAAR: Bacilo Álcool-Ácido Resistente; (a) Inoculação intradérmica no coxim plantar dos camundongos, (b) biópsias 8, 14, 17, 28 e 29 negativas. SC: sem classificação, NI: não inoculado e SM (sem multiplicação).

### 5.2.2. Pacientes com suspeita de recidiva.

Um total de 11 amostras de pacientes com suspeita de recidiva foram processadas para inoculação, mas em quatro amostras não havia a presença nenhum bacilo não sendo possível a inoculação.

As amostras dos outros sete pacientes foram inoculadas em camundongos BALB/c (57% - 4/7) e *nu/nu* (43% - 3/7).Dentre as sete inoculações realizadas, houve multiplicação bacilar positiva ( $\geq 1,0 \times 10^5$ ) em apenas duas amostras (28,6%).

Os resultados das inoculações do grupo com suspeita de recidiva estão representados na tabela 09.

**Tabela 09** – Pacientes com suspeita de recidiva: resultado da recuperação bacilar antes e após a inoculação.

<b>Amostra</b>	<b>Biópsia inicial (BAAR <sup>(a)</sup> total)</b>	<b>Inóculo inicial (BAAR 0,03 mL)</b>	<b>Resultado inoculação<sup>(b)</sup>  (BAAR Total/pata)</b>	<b>Linhagem Inoculada</b>
11	$9,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	$6,8 \times 10^5$	BALB/c
13	$1,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	BALB/c
19	$6,9 \times 10^8$	$1,0 \times 10^4$	SM	BALB/c
22	$6,2 \times 10^4$	$7,4 \times 10^2$	SM	<i>nu/nu</i>
27	$1,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$	SM	<i>nu/nu</i>
32	$3,7 \times 10^5$	$4,5 \times 10^3$	SM	<i>nu/nu</i>
39***	-	-	NI	
42***	-	-	NI	
44***	-	-	NI	
45***	-	-	NI	
47	$4,7 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	SM	BALB/c

(a) BAAR (Bacilo Álcool-Ácido Resistente). (b) Inoculação intradérmica no coxim plantar dos camundongos. (c) biópsias negativas. NI: não inoculado. SM: sem multiplicação.

### **5.2.3. Pacientes em final de tratamento.**

Neste grupo, foram inoculadas amostras de 91,6% (11/12) dos pacientes. Das 11 inoculações realizadas, somente as dos pacientes 12 e 34 (20%) resultaram em alguma multiplicação ao final dos oito meses de inoculação, embora em nenhuma delas o recuperado final tenha atingido a quantidade necessária para se considerar um crescimento positivo. Todas as inoculações foram realizadas em camundongos da linhagem nu/nu.

Os resultados das inoculações do grupo fim de tratamento estão demonstrados na tabela 10.

**Tabela 10.** Pacientes do grupo fim de tratamento: Resultado da recuperação bacilar antes e após a inoculação.

<b>Amostra</b>	<b>Biópsia inicial (BAAR<sup>(a)</sup> total)</b>	<b>Inóculo inicial (BAAR 0,03 mL)</b>	<b>Resultado inoculação<sup>(b)</sup> (BAAR Total/pata)</b>	<b>Linhagem Inoculada</b>
12	$1,05 \times 10^7$	$1,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	<i>nu/nu</i>
23	$2,6 \times 10^6$	$7,7 \times 10^4$	SM	<i>nu/nu</i>
24	$2,4 \times 10^5$	$7,1 \times 10^3$	SM	<i>nu/nu</i>
25 <sup>(c)</sup>			NI	<i>nu/nu</i>
26	$2,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	SM	<i>nu/nu</i>
30	$1,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	SM	<i>nu/nu</i>
31	$6,5 \times 10^5$	$7,8 \times 10^3$	SM	<i>nu/nu</i>
33	$2,6 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3$	SM	<i>nu/nu</i>
34	$2,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	<i>nu/nu</i>
36	$8,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	SM	<i>nu/nu</i>
40	$1,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^4$	SM	<i>nu/nu</i>
43	$4,2 \times 10^5$	$5,1 \times 10^3$	SM	<i>nu/nu</i>

(a) BAAR (Bacilo Álcool-Ácido Resistente). (b) Inoculação via intradérmica no coxim plantar dos camundongos. (c) Biópsia negativa. NI: não inoculado. SM: sem multiplicação.

### **5.3. Resultados de qPCR – Viabilidade Molecular.**

A seguir, serão mostrados os resultados dos ensaios de biologia molecular realizados com a finalidade da determinação da viabilidade do *M. leprae*.

Os ensaios moleculares foram realizados em amostras coletadas dos 3 grupos de pacientes estudados e nas amostras de camundongos após a inoculação. Entretanto, nas amostras negativas dos pacientes (10/50 – 20%), os ensaios moleculares de viabilidade (detecção do gene 16S rRNA) não foram realizados.

Para alguns pacientes, a critério do clínico, foram coletados mais de uma biópsia para realização do ensaio molecular. Foram realizadas a extração de RNA e DNA para todas as amostras. No entanto, em alguns dos gráficos um número maior de amostras em relação aos dados já mostrados de histopatologia e inoculação serão visualizados (algumas se apresentam em duplicata ou triplicata).

As estimativas de viabilidade baciloscópica e molecular são apresentadas a seguir.

### **5.3.1. Correlação BAAR/RLEP (Bacilos – DNA)**

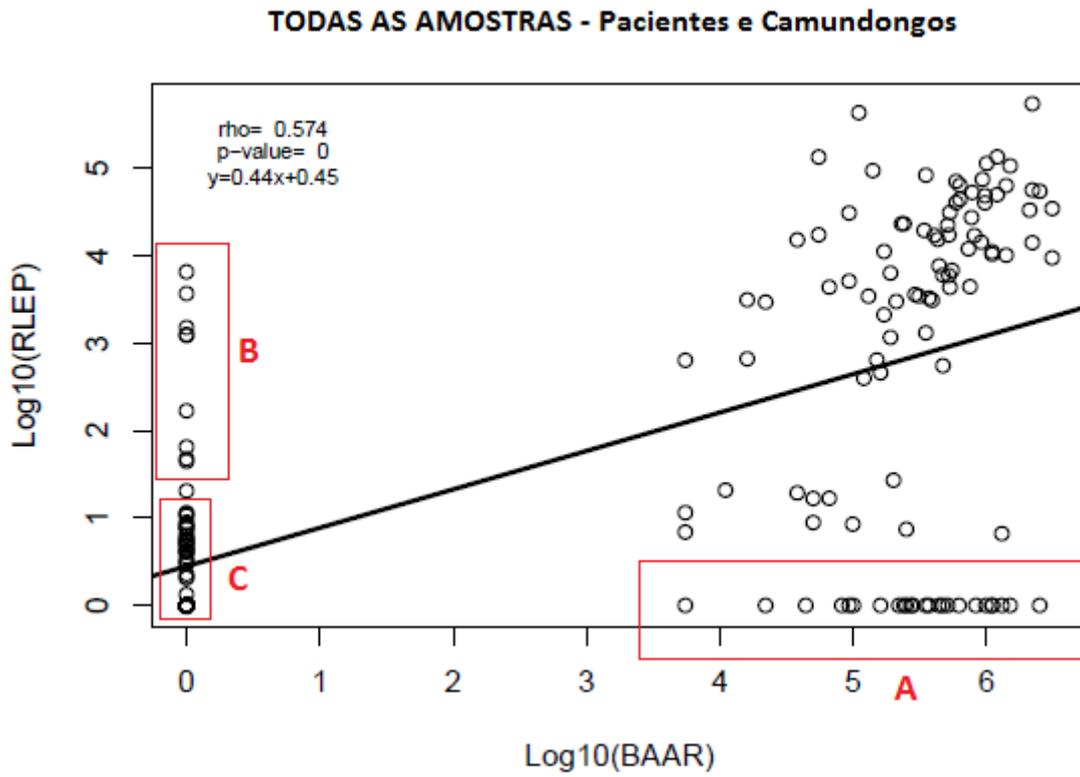
#### **5.3.1.1. Correlação BAAR/RLEP em amostras de pacientes e camundongos.**

Os resultados demonstrados na figura 02 referem-se à correlação entre os valores totais de bactérias contadas nas biópsias de pacientes e camundongos (BAAR) e os valores absolutos obtidos por amplificação por qPCR de DNA de *M.leprae* (RLEP). Podemos visualizar neste contexto (pacientes e camundongos juntos) que em algumas amostras foi possível a detecção das bactérias na baciloscopia, mas a não do gene no ensaio molecular (A).

Na mesma figura, podemos observar também que em algumas amostras onde não foi possível a detecção da bactéria pela baciloscopia (BAAR 0= negativo), mas foi possível a amplificação do gene no ensaio molecular (B e C).

No entanto, verificamos que na maioria das amostras existe uma boa correlação ( $\rho=57,4$ ) entre a quantidade de bacilos e a quantidade de DNA extraída das biópsias.

**Figura 02.** Correlação BAAR/RLEP para detecção do *Mycobacterium leprae* em biópsias de pacientes hansenianos e de coxim plantar de camundongos inoculados com a bactéria.



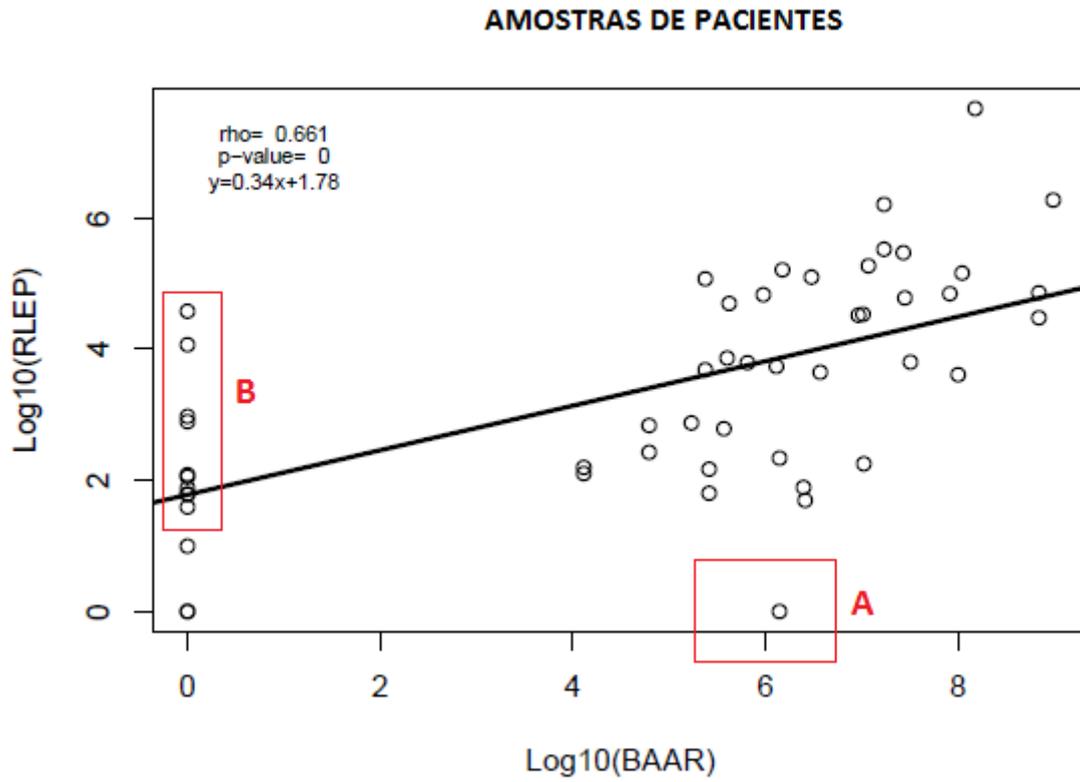
### **5.3.1.2. Correlação BAAR/RLEP somente em amostras de pacientes.**

A figura 03 refere-se à detecção do gene RLEP nas biópsias coletadas dos pacientes deste estudo. Nesta figura observamos todas as amostras dos três grupos avaliados.

Foi verificada a existência de uma discrepância em uma das amostras com relação a quantidade de bacilos observados e a detecção do gene RLEP (A), sendo que a contagem de bactérias foi elevada, e, entretanto não foi possível a detecção do gene na PCR.

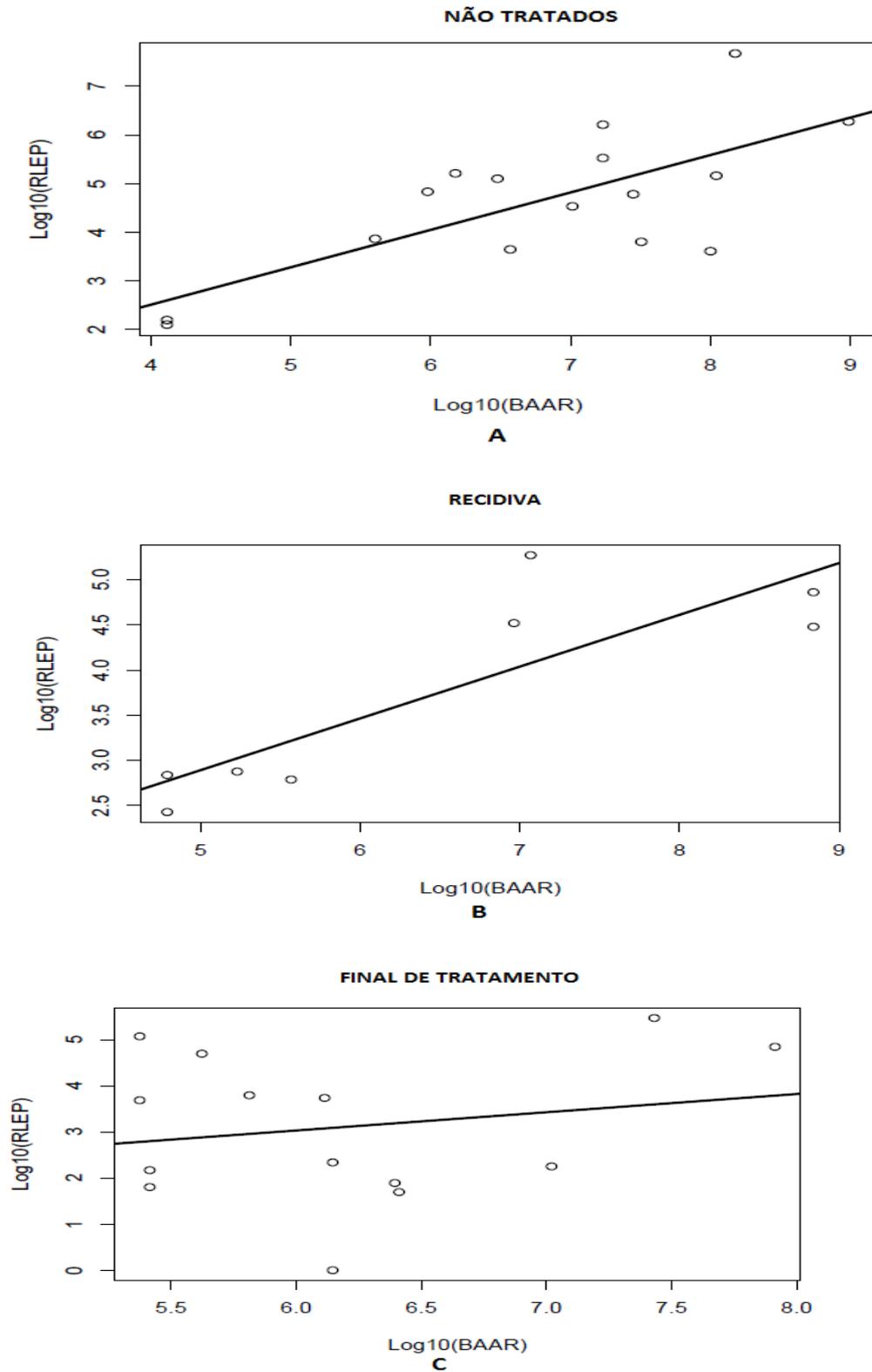
De forma contrária, também observamos que em várias amostras não foi possível a contagem de bactérias, mas a detecção do gene RLEP foi expressiva (B). Mesmo assim verificamos que na maioria das amostras existe uma boa correlação ( $\rho=66,1$ ) entre a quantidade de bacilos e a quantidade de DNA extraída das biópsias.

**Figura 03.** Correlação BAAR/RLEP para detecção do *Mycobacterium leprae* em biópsias de pacientes hansenianos.



Na figura 04 observamos correlação entre os valores totais de bactérias contadas nas biópsias de pacientes (BAAR) e os valores absolutos obtidos por amplificação por qPCR de DNA de *M.leprae* (RLEP), divididos entre os grupos.

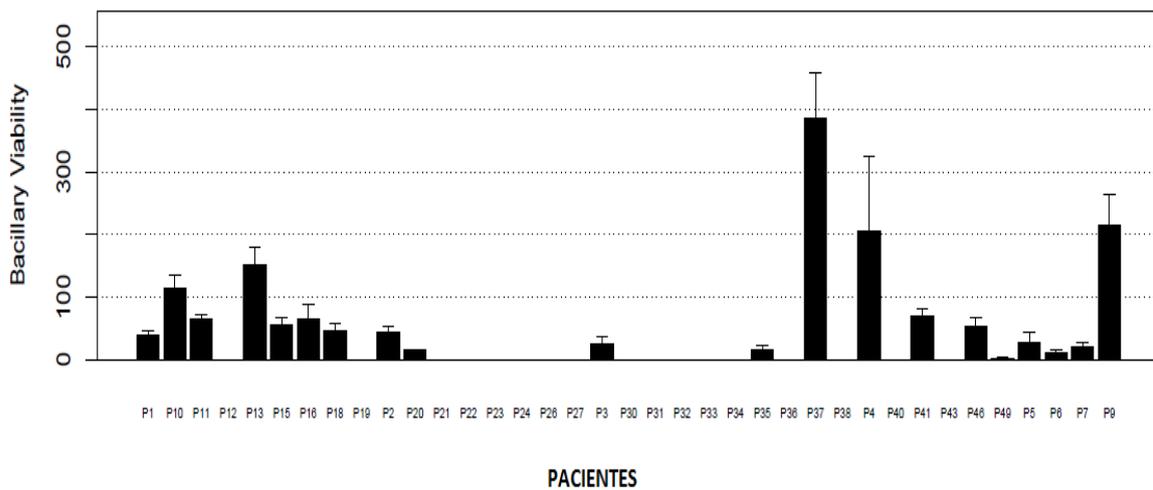
**Figura 04.** Correlação BAAR/RLEP para detecção do *Mycobacterium leprae* em biópsias de pacientes hansenianos (A: grupo de pacientes não tratados; B: grupo de pacientes com suspeita de recidiva; C: grupo de pacientes em final de tratamento).



### 5.3.2. Viabilidade baciloscóptica – Recuperado/Inoculado.

Na figura 05 foi observada a fração de bactérias viáveis a partir do inóculo inicial e o recuperado final (Recuperado/Inoculado). Nesta figura podemos observar todas as amostras dos três grupos avaliados. Os dados referem-se às biópsias de camundongos inoculados com o *M. leprae*.

**Figura 05.** Viabilidade baciloscóptica (recuperado/inoculado) em amostras de coxim plantar de camundongos inoculados com *M. leprae*.



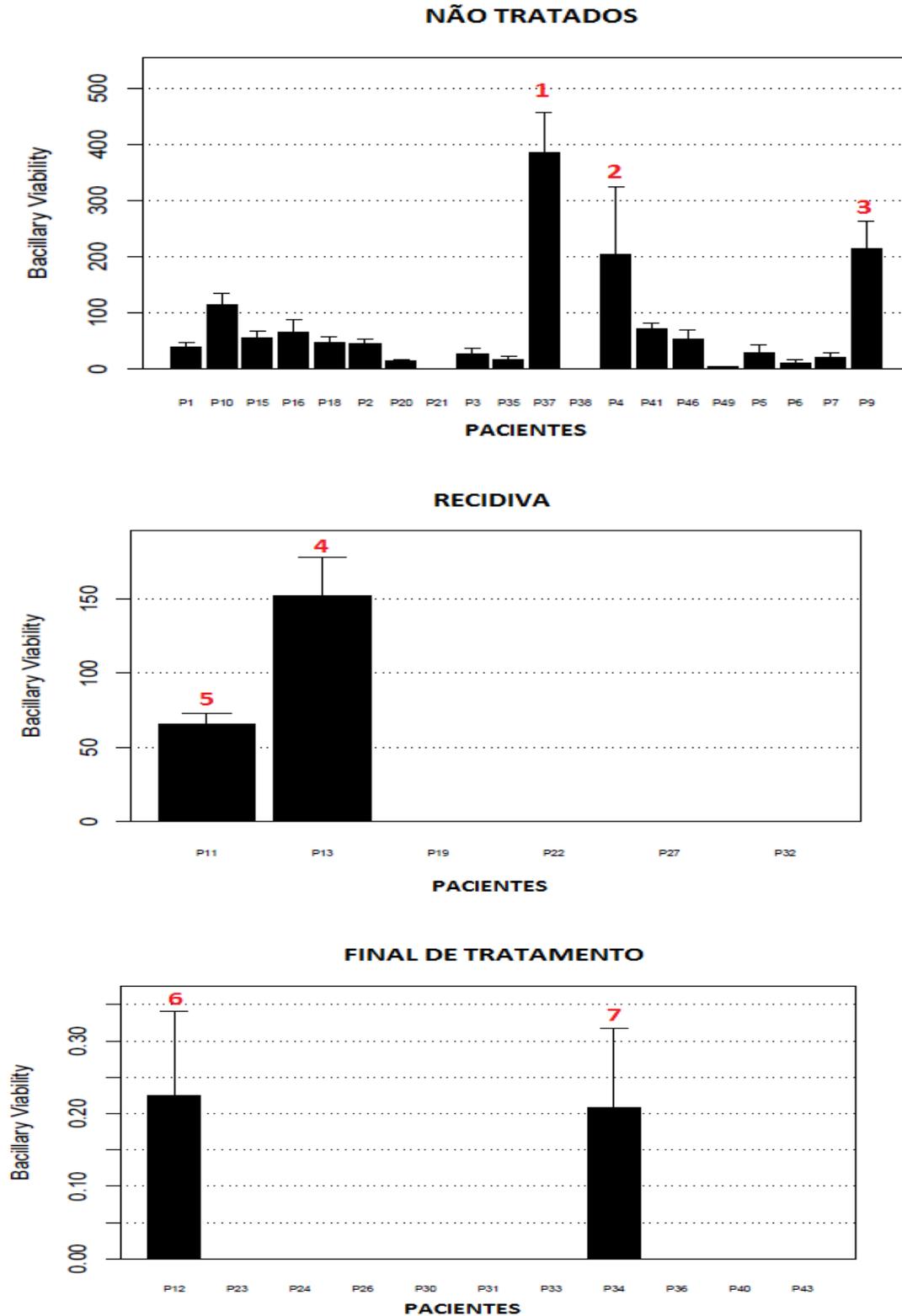
Na figura 06, os resultados estão divididos entre os três grupos avaliados.

No grupo de pacientes não tratados observamos uma viabilidade bastante significativa. O paciente 37(1), por exemplo, tinha um inóculo inicial de  $4,8 \times 10^3$  e um recuperado final foi  $1,9 \times 10^6$ . O paciente quatro (2), teve um inóculo inicial de  $1,0 \times 10^2$  e um recuperado final de  $5,5 \times 10^4$ . Finalmente, podemos destacar o resultado do paciente nove (3), cujo inóculo inicial foi de  $1,0 \times 10^4$  e o recuperado final foi de  $3,1 \times 10^6$ .

No grupo de pacientes com suspeita de recidiva, observamos que somente duas amostras apresentaram viabilidade após a inoculação. No paciente 13 (4) com inóculo inicial de  $1,0 \times 10^4$  e um recuperado final de  $1,4 \times 10^6$  e o paciente 11 (5) cujo inóculo inicial também foi de  $1,0 \times 10^4$ , com um recuperado final de  $6,8 \times 10^5$ . Quando comparados com os resultados do grupo de pacientes não tratados podemos perceber que aparentemente a viabilidade nos pacientes não tratados é maior que nos pacientes do grupo recidiva.

No grupo de pacientes em final de tratamento, observamos uma viabilidade baciloscópica pouco significativa. Somente duas amostras, pacientes 12 e 34 (6 e 7) mostrou algum traço de viabilidade cujo inóculo inicial foi de  $1,0 \times 10^5$ . Em ambas as inoculações, o recuperado final foi menor do que o inóculo inicial.

**Figura 06.** Viabilidade baciloscópica (recuperado/inoculado) em amostras de coxim plantar de camundongos inoculados com *M. leprae*. Resultados divididos por grupo (Não tratados, recidiva e final de tratamento).

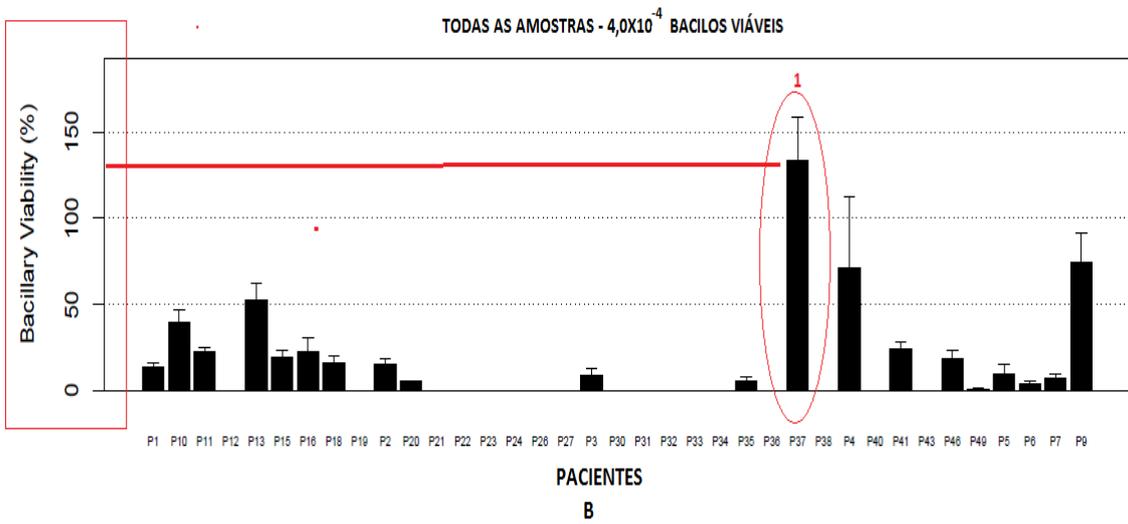
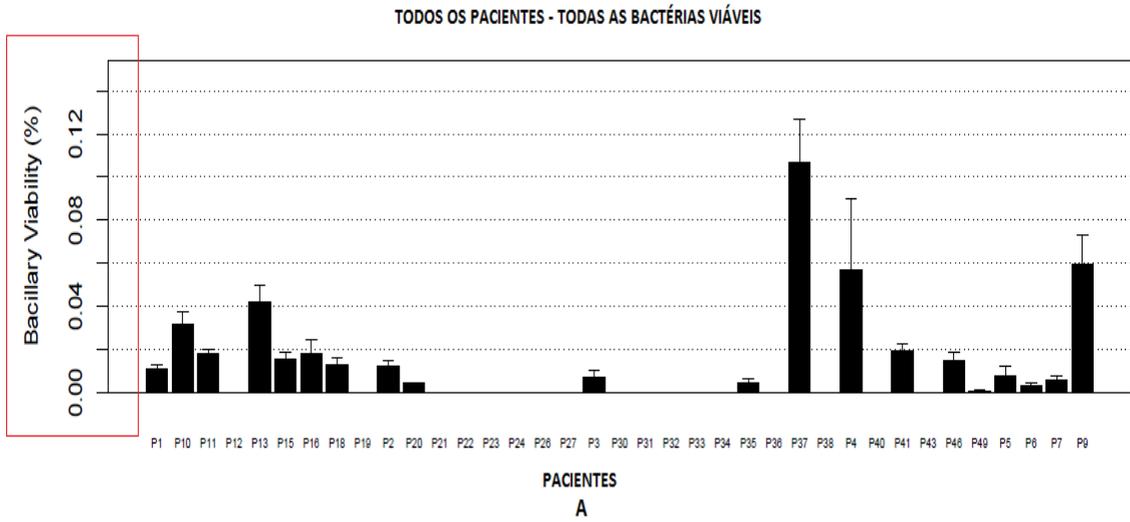


### 5.3.3. Viabilidade bacilosscópica – bacilos observados/esperados.

Para estes dados foram estimados a fração de bactérias viáveis confrontando os resultados de inoculação observado e os esperados, assumindo que em a cada  $1,0 \times 10^4$  bacilos apenas quatro bactérias estavam viáveis. E por fim comparando com os resultados admitindo que todas as bactérias do inóculo estavam viáveis.

Na figura 07 comparamos a viabilidade bacilosscópica de todas as amostras. Quando assumimos que todas as bactérias inoculadas estavam viáveis (A) percebemos que a viabilidade é extremamente baixa, sendo que a amostra que apresentou maior multiplicação no coxim plantar dos camundongos não alcançou 0,1% de viabilidade. Quando estimamos a viabilidade admitindo que apenas  $4,0 \times 10^{-4}$  bacilos estão viáveis no inóculo (B) percebemos que a viabilidade bacilosscópica parece ser mais real. A amostra 37 (1) citada anteriormente atinge mais de 100% de viabilidade, ou seja, 100% dos  $4,0 \times 10^{-4}$  bacilos estariam viáveis.

**Figura 07.** Viabilidade baciloscópica – observado/esperado em todas as amostras de coxim plantar de camundongos inoculados com *M. leprae*.



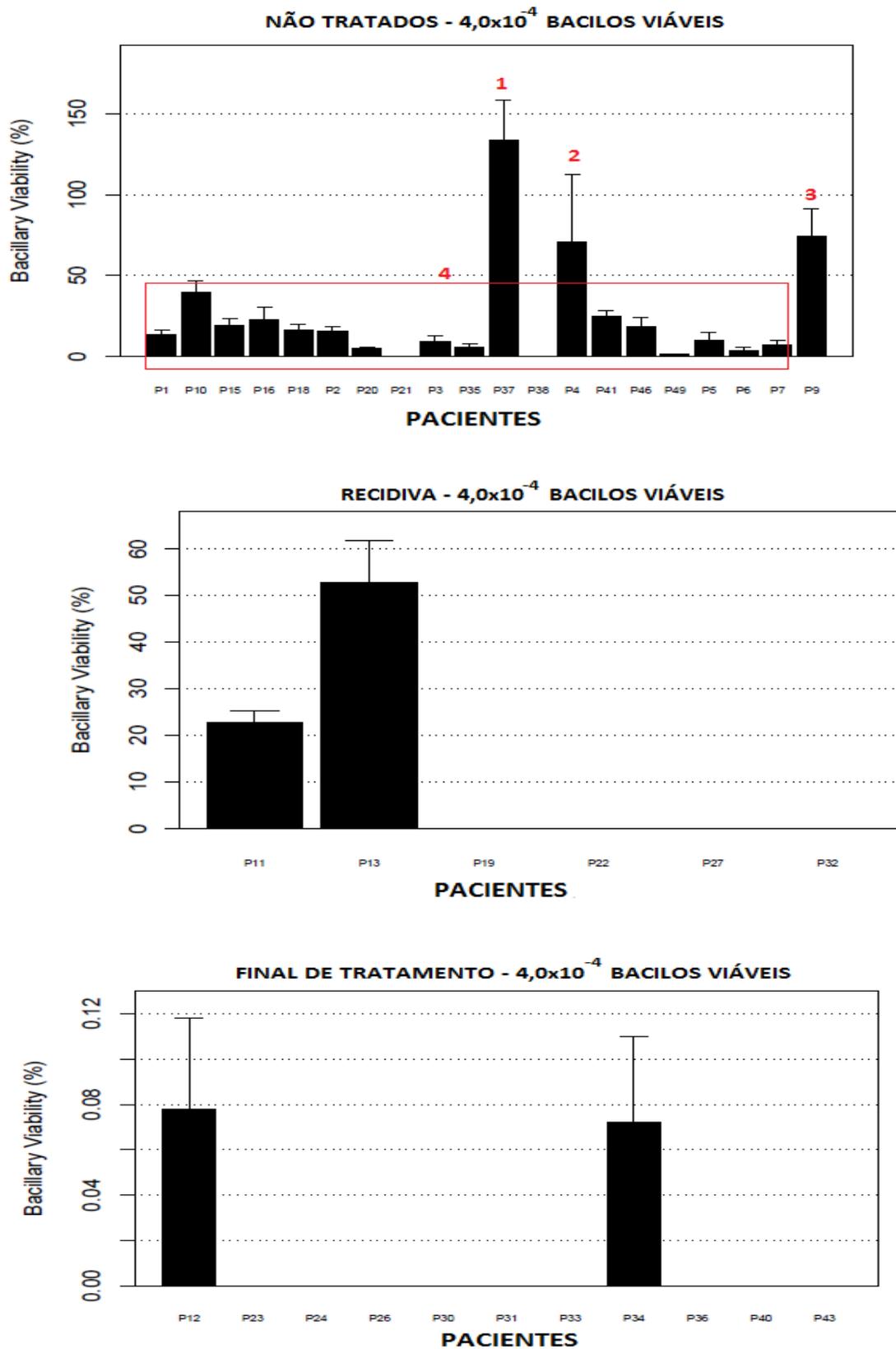
Uma vez que os resultados de viabilidade baciloscóptica nas duas situações (100% viáveis e  $4,0 \times 10^{-4}$  viáveis) apresentam resultados tão discrepantes, optamos por apresentar na figura 08 somente com os resultados dos pacientes divididos pelos grupos avaliados e assumindo que  $4,0 \times 10^{-4}$  bacilos estavam viáveis.

Quando observamos os grupos de pacientes, podemos perceber que entre os pacientes não tratados, a viabilidade baciloscóptica parece ser bastante significativa. Exceto as amostras 37, 4 e 9, cujas frações de viabilidade ultrapassam (1) ou se aproximaram de 100%, as demais amostras (4) tem em média cerca de 30% de viabilidade.

No grupo de pacientes com suspeita de recidiva, observamos nas duas únicas amostras em que houve multiplicação no coxim plantar dos camundongos, que a viabilidade não ultrapassa os 50%.

E por fim, no grupo de pacientes em final de tratamento a viabilidade baciloscóptica é praticamente insignificante quando comparada com os grupos de pacientes não tratados e suspeitos de recidiva.

**Figura 08.** Viabilidade baciloscópica – observado/esperado em todas as amostras de coxim plantar de camundongos inoculados com *M. leprae* divididos por grupos.



#### 5.3.4. Viabilidade Molecular X Viabilidade Baciloscóptica

Os dados a seguir são realmente importantes, pois foram estimados valores de viabilidade molecular para todas as amostras de pacientes e comparados então aos dados de estimativas microbiológicas de crescimento (e viabilidade). Os resultados apresentados a seguir dizem respeito a viabilidade molecular da média total de crescimento em coxim plantar de camundongos, comparadas com a viabilidade baciloscóptica da biópsia do paciente que gerou aquela inoculação.

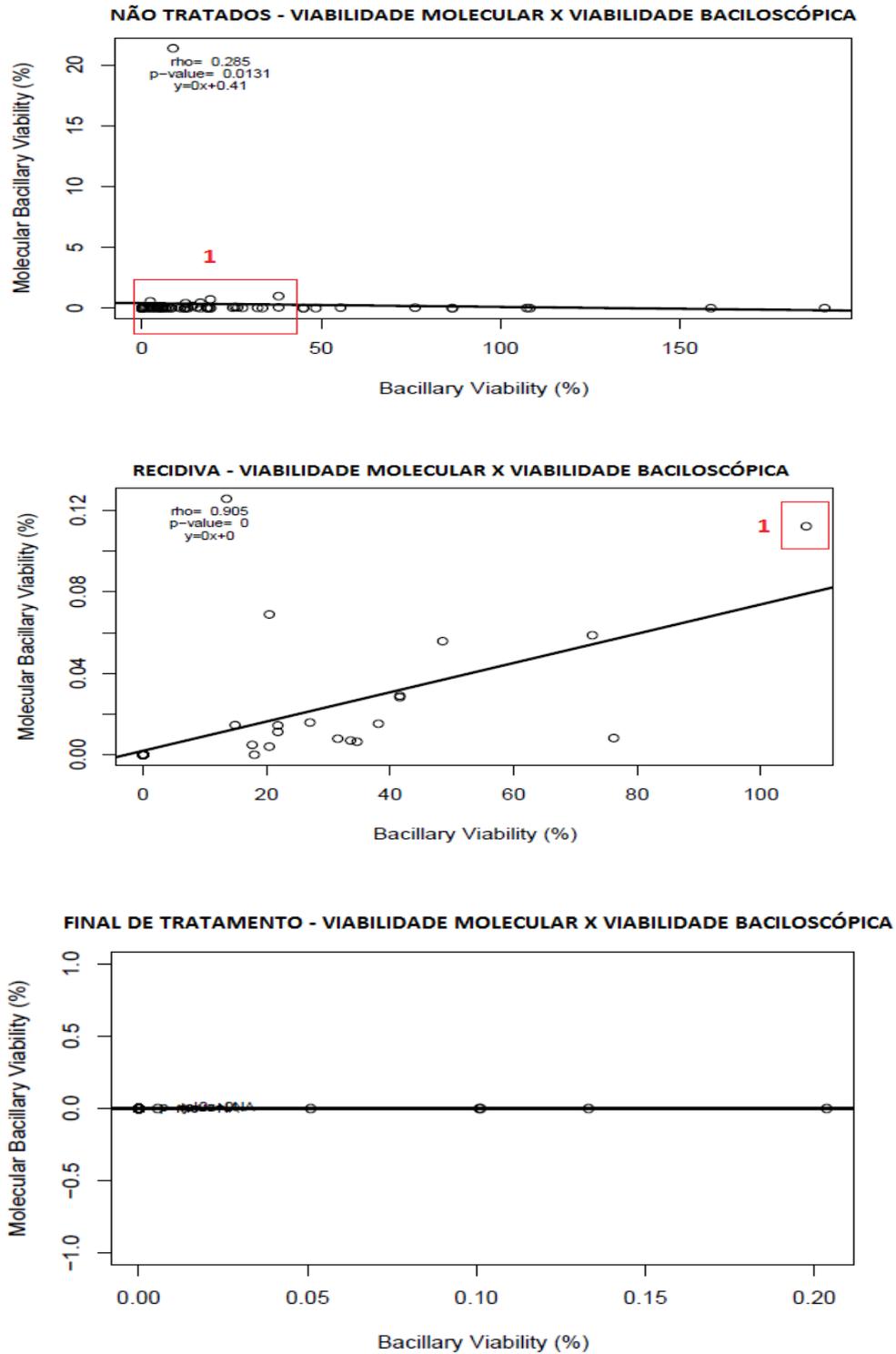
Na figura 09 podemos observar as estimativas de viabilidade molecular comparadas entre os grupos.

No grupo dos pacientes não tratados observamos que a razão RNA/DNA é bastante significativa, e a viabilidade da maioria das amostras fica entre 0 e 2% (1). A visualização da viabilidade molecular está comprometida no gráfico, uma vez que a escala utilizada para a geração do mesmo está muito elevada. O coeficiente de correlação também é baixo ( $\rho=28,5$ ). Estes resultados sugerem que a viabilidade molecular nos pacientes não tratados não é tão alta quanto se imaginava.

No grupo de pacientes com suspeita de recidiva podemos observar que a viabilidade molecular é ainda menor quando comparada com o grupo de pacientes não tratados. A amostra que apresentou uma viabilidade baciloscóptica mais alta ( $> 100\%$ ) não atingiu 0,12% de viabilidade molecular. Entretanto neste grupo, o coeficiente de correlação é alto ( $\rho=90,5$ ) demonstrando que as estimativas de viabilidade são mais coerentes no grupo recidiva que no grupo de pacientes não tratados.

No grupo de pacientes em final de tratamento, a estimativa de viabilidade molecular é tão baixa que o coeficiente de correlação não pode ser estabelecido. Observamos que mesmo a viabilidade baciloscóptica é baixa (máximo de 0,2%) e a viabilidade molecular é muito próxima de zero.

**Figura 09.** Estimativa de viabilidade molecular x viabilidade baciloscóica em biópsias de camundongos inoculados com *M. leprae*.



### 5.3.5. Viabilidade baciloscópica x curva de crescimento exponencial.

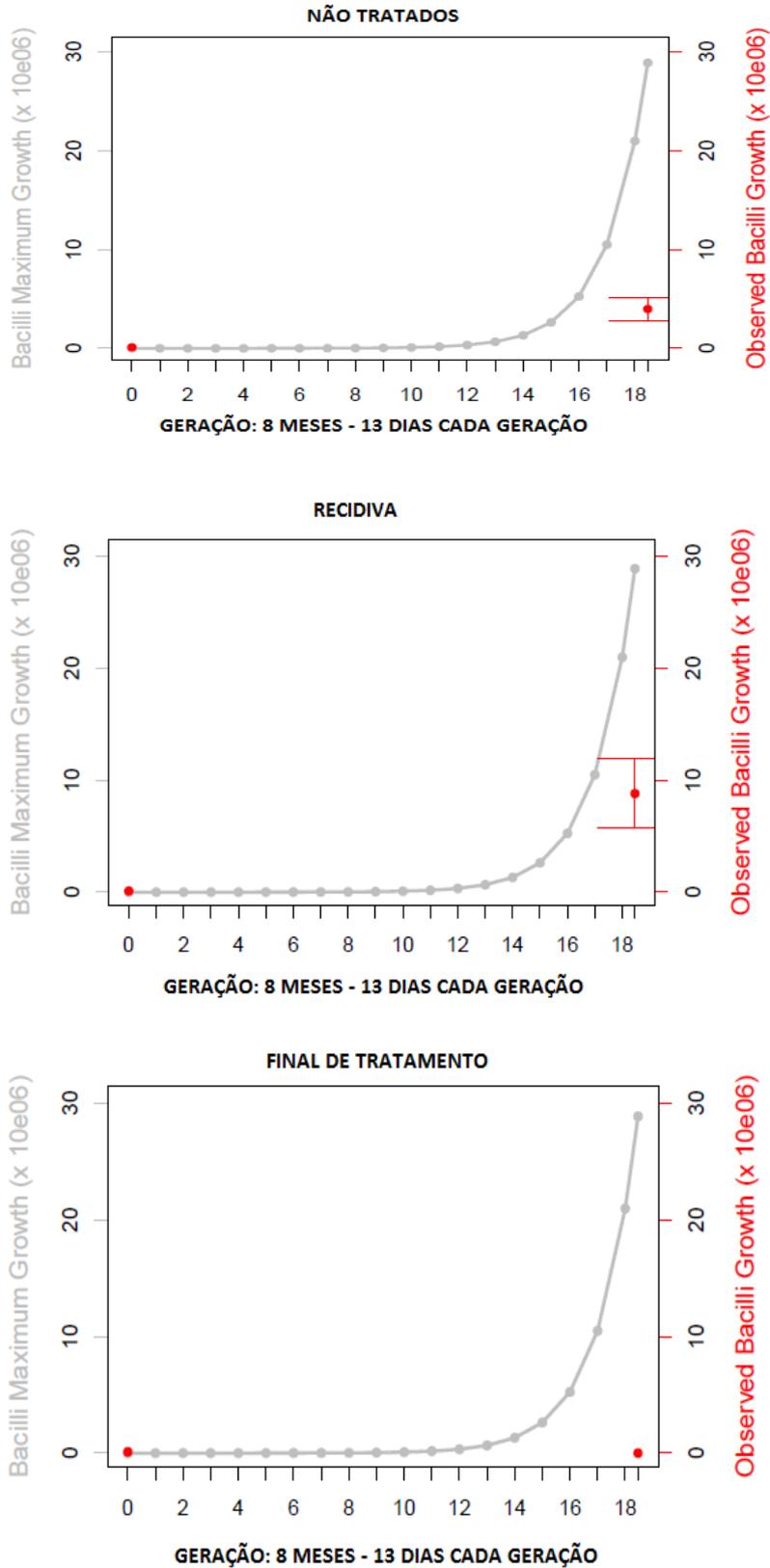
Para esta análise de viabilidade baciloscópica, estimamos a taxa de multiplicação do *M. leprae* (representada numa curva exponencial) e comparamos os resultados observados na inoculação. Para cada geração (duplicação) da bactéria estimamos um tempo de 13 dias e, então num período de oito meses de inoculação teríamos um crescimento máximo alcançado de bacilos. Reforçamos aqui, que nossos resultados foram estabelecidos com base no critério já descrito anteriormente, ou seja, que no inóculo inicial somente  $4 \times 10^{-4}$  bactérias estariam de fato viáveis.

Sendo assim na figura 10, observamos a estimativa de viabilidade baciloscópica comparadas com uma curva exponencial de crescimento.

No grupo de pacientes não tratados, podemos observar que a média de viabilidade baciloscópica fica próxima de  $5 \times 10^5$ . Já no grupo de pacientes com suspeita de recidiva, a viabilidade baciloscópica parece ser maior que no grupo de pacientes não tratados ficando próxima de  $1,0 \times 10^6$ .

No grupo de pacientes em final de tratamento a viabilidade baciloscópica é praticamente zero.

**Figura 10.** Viabilidade baciloscóptica x curva de crescimento exponencial nos grupos de pacientes inoculados com *M. leprae*.



### 5.3.6. Viabilidade molecular x curva de crescimento exponencial.

Para esta análise, estimamos a taxa de viabilidade do *M. leprae* (representada numa curva exponencial) e comparamos com os resultados observados (viabilidade). Para cada geração (duplicação) da bactéria estimamos um tempo de 13 dias e, então num período de oito meses de inoculação teríamos um valor máximo de viabilidade molecular, não contabilizando nenhuma perda durante os meses inoculados.

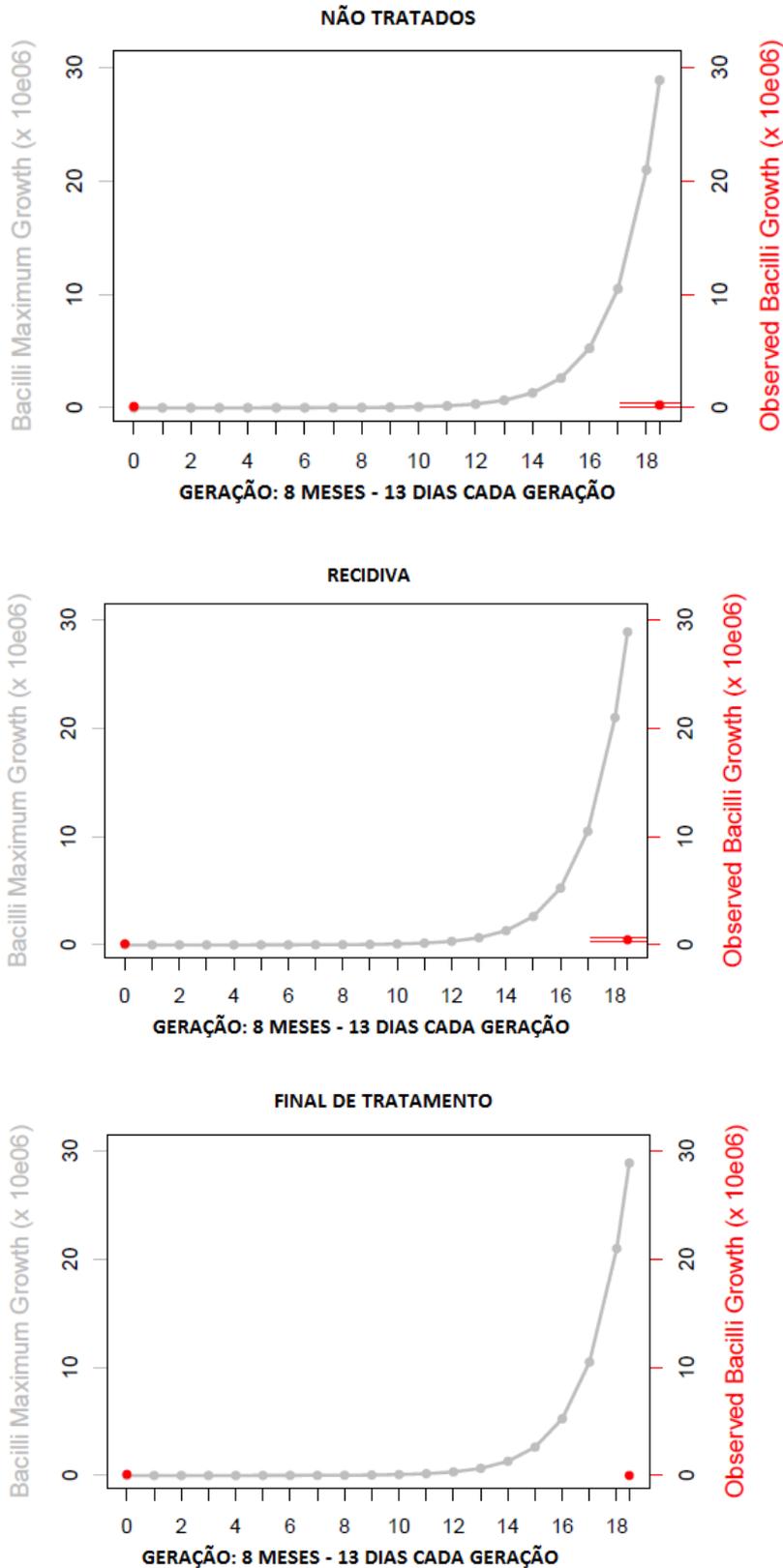
Nossos resultados foram estabelecidos com base no critério já descrito de que no inóculo inicial somente  $4 \times 10^{-4}$  bactérias estariam de fato viáveis. Sendo assim na figura 11, observamos a estimativa de viabilidade molecular comparadas com uma curva exponencial de crescimento.

Em todos os grupos avaliados: (i) pacientes não tratados, (ii) com suspeita de recidiva e (iii) em final de tratamento, podemos observar que a viabilidade molecular é extremamente baixa, próxima de zero quando comparadas aos valores esperados..

Os grupos de pacientes não tratados e com suspeita de recidiva apresentam uma pequena fração de viabilidade molecular, e ambos os resultados são bastante parecidos.

Já no grupo de pacientes em final de tratamento, a viabilidade molecular é negativa, assim como a viabilidade baciloscóptica.

**Figura 11.** Viabilidade molecular x curva de crescimento exponencial nos grupos de pacientes inoculados com *M. leprae*.



#### **5.4. Reavaliação de pacientes após o tratamento.**

Entre os pacientes do grupo não tratados, nove retornaram ao serviço de ambulatório do Instituto Lauro de Souza Lima, e foram reavaliados para a alta terapêutica, após terem iniciado o tratamento depois do diagnóstico.

Neste contexto, e como previsto originalmente no termo de consentimento livre e esclarecido, uma nova biópsia foi coletada para avaliação da viabilidade molecular e quando possível foi realizada a baciloscopia de raspado intradérmico.

Os resultados moleculares destes pacientes foram negativos. O gene 16S rRNA, indicador da presença de bactérias viáveis, não foi detectado pela técnica de qPCR em nenhuma das amostras analisadas. O gene RLEP foi detectado em apenas duas amostras, mas o resultado não foi significativo (dados não mostrados). Como não houve detecção dos genes estudados, uma análise completa, como mostrado em resultados anteriores não foi possível ser realizada.

De acordo com a classificação de Ridley & Jopling<sup>37</sup> estes 09 pacientes estavam distribuídos da seguinte forma: um TT (11%), um BT (11%), cinco BL (56%) e dois LL (22%). Apenas um paciente (20) ainda apresentava baciloscopia positiva após um ciclo completo de tratamento

Os resultados de baciloscopia destes pacientes estão representados na tabela 11.

**Tabela 11.** Resultados de baciloscopia dos pacientes do grupo não tratados após um ciclo completo de tratamento.

<b>Amostra</b>	<b>Classificação R&amp;J</b>	<b>Baciloscopia (1ª avaliação)</b>	<b>Baciloscopia (2ª avaliação)</b>
1	BL	2,83 +	NR
3	LL	NR	NR
4	BT	Negativa	Negativa
5	TT	Negativa	Negativa
6	BL	NR	Negativa
15	BL	NR	NR
18	BL	2,5+	Negativa
20	LL	4+	1,5+
37	BL	1,17+	NR

TT: tuberculóide-tuberculóide; BT: borderline-tuberculóide; BL: borderline-lepromatoso LL: lepromatoso-lepromatoso; NR: não realizada; R&J: Ridley e Jopling.

## 6. Discussão

O sequenciamento completo do genoma do *Mycobacterium leprae*<sup>101</sup> ofereceu perspectivas promissoras para o estudo da fisiologia, patogenia, epidemiologia e genética do bacilo da hanseníase. No entanto, a incapacidade de cultivo de *M. leprae* *in vitro*, não só impede um fornecimento regular de bacilos viáveis, mas também impede a distinção entre vivos e mortos. Estas duas lacunas em nosso conhecimento são obstáculos importantes para a exploração da interação entre o *M. leprae* e seu hospedeiro, uma relação que está na base da patogenicidade desta doença com lacunas a preencher<sup>102</sup>.

O desenvolvimento da técnica de inoculação em coxim plantar de camundongos por Shepard em 1960<sup>8</sup> com a finalidade de demonstrar a replicação do bacilo foi um avanço importante na pesquisa em hanseníase, pois permitiu um melhor entendimento da microbiologia do *M. leprae*, avaliação da viabilidade bacilar, testes de sensibilidade a drogas, assim como estudos cinéticos e de novos fármacos.

Essas dificuldades fizeram que muitos laboratórios descontinuassem essa metodologia e atualmente no Brasil somente o Instituto Lauro de Souza Lima mantém essa metodologia ativa, para os estudos de resistência e manutenção de bacilos para outras aplicações.

Por muitos anos, a única maneira de avaliar a viabilidade de uma população de *M. leprae* foi por meio de inoculações de diluições seriadas de bacilos para o coxim plantar de camundongos<sup>103,104</sup>. A metodologia requer a existência e manutenção de uma colônia com centenas de camundongos, profissionais treinados, um trabalho intenso, demorado, com custo relativamente alto.

A técnica de inoculação em coxim plantar de camundongo tem sido amplamente utilizada para avaliação e monitoramento da viabilidade dos bacilos e para o desenvolvimento de ensaios de quimioterapia e também para se estudar a viabilidade do *M. leprae* fora do corpo humano. Embora a metodologia seja importante, o modelo é de uso limitado<sup>105, 106, 107, 108, 109</sup>.

Em um esforço para simplificar e acelerar a determinação da viabilidade de *M. leprae*, uma série de ensaios foram desenvolvidos para investigar marcadores candidatos da viabilidade, tais como a determinação do índice morfológico, a síntese de PGL-1, a geração de ATP intracelular, a oxidação de ácido palmítico no sistema BACTEC e por radiorespirometria (RR). Atualmente, as técnicas mais usadas são RR e a coloração de viabilidade pelo BacLight<sup>110</sup>.

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm utilizado a PCR para o desenvolvimento de diferentes sistemas de amplificação de varias sequências genômicas de *M. leprae* visando aumentar o limite de detecção, principalmente quando um número baixo de bacilos está presente<sup>82, 83, 84, 85, 86, 87, 88</sup>. Desse modo, inúmeras metodologias para a detecção do bacilo em amostras clínicas foram descritas<sup>89, 90</sup> e muitos estudos envolvendo sistemas simples e específicos foram padronizados para amplificação de regiões gênicas que codificam para o antígeno de 36-kDa<sup>91</sup>, de 18-kDa<sup>92</sup> ou de 65-kDa<sup>93</sup>, assim como para outras sequências repetitivas<sup>94</sup> do *M. leprae*.

No entanto, embora a PCR para DNA seja amplamente aceita para detecção da infecção em virtude da alta sensibilidade, uma importante limitação esta relacionada a sua inabilidade para distinguir entre organismos viáveis e não viáveis. A única medida definitiva da viabilidade bacteriana é a capacidade de replicação, portanto a padronização de um método sensível e específico para a detecção da viabilidade do *M. leprae*.

Dessa forma, métodos de detecção de RNA foram propostos, nos últimos anos como ferramenta promissora para detecção não somente do *M. leprae*, mas também para realizar importante discriminação entre organismo viável e não-viável com vistas ao correto prognóstico dos pacientes de hanseníase durante o tratamento, determinação de resistência a drogas ou identificação de recidiva e sua diferenciação com as reações hansênicas<sup>13,14</sup>.

Assim este estudo teve por finalidade a avaliação da viabilidade bacilar por meio da detecção de 16S rRNA específico para o *M. leprae* com a normalização das quantidades totais de micobactérias a partir da quantificação do DNA total do bacilo.

A metodologia para essa avaliação foi aplicada em três grupos distintos: Não tratados, suspeitos de recidiva e final de tratamento.

Os dados publicados por Shepard<sup>8</sup> mostram que na inoculação em camundongos imunocompetentes o inóculo inicial pode variar entre  $5,0 \times 10^3$  ou  $1,0 \times 10^4$ , mas o resultado só será considerado positivo, quando houver de fato multiplicação bacilar na ordem de  $1,0 \times 10^5$ , ou seja, mais do que 10 vezes o inóculo inicial. Quando avaliamos os resultados das inoculações, observamos que quase 60% de nossas amostras apresentaram multiplicação na casa de 10 vezes o inóculo inicial. Isso de certa forma era o esperado, pois avaliamos biópsias de pacientes nas formas clínicas LL, BL e BB com indicativo pela coloração do Faraco-Fite da presença de bacilos viáveis.

Em três amostras de pacientes do grupo não tratados foi necessário inocular os bacilos em uma linhagem de camundongo nude/nude (sem resistência imunológica), devido à baixa concentração de bacilos recuperada e recomendada para inoculação. Em um caso BT

especificamente houve um crescimento na ordem de 50 vezes do inóculo inicial e essa amostra foi considerada positiva. A maioria dos pacientes tem apresentado carga bacteriana baixa e provavelmente 90% não tem bacilos suficientes, ou seja, 5-10000/bacilos por amostra, que possa ser inoculado em camundongos. Alguns pesquisadores relataram a capacidade de cultivar o *M. leprae* a partir de amostras paucibacilares e baciloscopia negativa em camundongos<sup>111</sup>. Os dados de inoculação em nude apresentados até aqui, podem ser corroborados por outro estudo que mostrou que esta linhagem de camundongos é mais sensível que as de camundongos imunocompetentes, principalmente em amostras com pequenas proporções de organismos vivos<sup>112</sup>. Assim, a manutenção de um biotério com uma estrutura maior, poderia abrigar linhagens de camundongos imunodeficientes, que seriam então utilizados em amostras de pacientes com baixa concentração de bacilo e não só para manutenção de isolados de *M. leprae*.

Os dados de inoculação no grupo de pacientes não tratados nos mostraram que cerca de 80% dos pacientes multibacilares apresentaram crescimento no coxim plantar dos camundongos. Estes dados são semelhantes há um estudo realizado na Índia onde 75% das amostras multibacilares foram positivas no sistema desenvolvido por Shepard<sup>8, 113</sup>. Com relação aos dados da viabilidade molecular, foco desse estudo, os genes avaliados apresentaram alta sensibilidade.

Na detecção do gene 16S rRNA apenas uma amostra de um paciente LL com 3,5+ no histopatológico e IM 2% não foi positiva. Isso pode ser explicado talvez pela escolha do sítio de coleta da biópsia para inoculação, que poderia abrigar somente bacilos degradados diferente da biópsia enviada para exame histopatológico, embora em nosso protocolo tenhamos buscado coletar biópsias contíguas. Quando olhamos para os polos TT os níveis de detecção moleculares foram muito baixos. Interessante observar que quanto menos bacilos a amostra apresenta, mais baixa é a detecção no sistema TaqMan.

O gene 16S rRNA parece não ser um bom marcador da presença do *M. leprae* em amostras paucibacilares. Isto poderia ser explicado pela presença de uma única cópia deste gene no genoma da bactéria, o que levaria então a uma baixa sensibilidade.

Nossos dados são bastante semelhantes aos apresentados em um estudo que mostrou que a sensibilidade na detecção do gene 16S rRNA em amostras de pacientes foi 62,9% quando comparados aos 77,7% encontrados em nosso trabalho<sup>114</sup>.

Já a detecção do gene RLEP (91%) nas amostras mostrou ser mais sensível do que a detecção do gene 16S rRNA. No entanto, quando 16S é detectado esse dado não pode ser

ignorado, visto que o gene RLEP aparece repetidas vezes no genoma do *M. leprae* (37 cópias), enquanto o outro gene aparece uma única vez.

Esses dados parecem coerentes em relação a outros aspectos na hanseníase, ou seja, quanto mais bacilos observamos nas amostras multibacilares (BB, BL e LL), mais chances temos de detectar o gene em níveis elevados, ou seja, a carga bacilar é um fator importante nos ensaios moleculares uma vez que quanto mais bacilos a amostra apresenta, menor o CT de detecção e quanto menos bacilos (TT e BT) maior o CT de detecção.

Assim parece que o gene 16S rRNA por apresentar uma cópia simples no genoma do *M. leprae*, sua detecção ocorre em níveis ainda que baixos, principalmente nas amostras paucibacilares e isso pode ser um excelente indicativo da presença de bactérias viáveis. Claro que a normalização do RNA com o DNA do *M. leprae* nos fornecerá dados mais precisos das quantidades de bacilos presentes em cada amostra, e esses dados ainda serão analisados, mas, grosso modo, ainda que na normalização os resultados sejam baixos, eles parecem promissores principalmente porque estamos falando da avaliação de viabilidade, ou seja, a presença de bacilos vivos, o que sugere indicativo de doença em atividade.

Neste trabalho, nos pacientes não tratados esses dados de detecção do gene 16S rRNA são muito expressivos, pois a técnica parece ser promissora para detecção de bacilos vivos, quando os comparamos com os dados da inoculação na pata do camundongo (padrão ouro).

Os casos de recidiva em hanseníase são raros em pacientes tratados regularmente com os esquemas poliquimioterápicos. Geralmente ocorrem em período superior a cinco anos e incluem pacientes que, após alta por cura, apresentam lesões cutâneas e/ou exacerbação de lesões antigas, novas alterações neurológicas que não respondem ao tratamento com talidomida e/ou corticosteróide nas doses e prazos recomendados, baciloscopia positiva e, quadro compatível com pacientes virgens de tratamento<sup>115</sup>.

Nesse grupo, dos 10 casos avaliados, somente seis tinham bacilos suficientes para inoculação e ao final dos oito meses somente dois casos apresentaram multiplicação bacilar. Estes dados diferem de outro estudo realizado com pacientes de recidiva onde um rendimento significativo de *M. leprae* no coxim plantar dos camundongos do grupo controle foi obtido, com 32/47 (68%) isolados de 26 casos confirmando então a viabilidade<sup>116</sup>

A detecção do gene 16S rRNA nos pacientes de recidiva não obedeceu o mesmo padrão como os não tratados.

Uma baixa detecção do gene 16S rRNA foi observada no grupo de recidiva e para o gene RLEP a detecção foi alta. Embora os bacilos possam ser detectados, eles não estão mais

viáveis, assim entendemos que essa positividade pode estar relacionada com a não eliminação dos bacilos mortos pelo organismo do paciente.

Situações como esta, em que a baciloscopia se apresenta positiva, levando o clínico a pensar em doença ativa, a detecção molecular de bacilos viáveis poderá ser útil no auxílio diagnóstico da doença em atividade, contribuindo para a interrupção da transmissão e para os casos em que os bacilos estejam mortos ser útil para o manejo do tratamento, pois um retratamento desnecessário pode até mesmo contribuir para o desenvolvimento da resistência bacteriana.

Entretanto é necessário salientar que o número de amostras avaliadas no grupo recidiva é muito menor que nos pacientes não tratados, sendo que neste as amostras são mais heterogêneas. Assim, a aparente homogeneidade do grupo recidiva pode ser a causa da aparente maior viabilidade.

Nossa experiência com a técnica de Shepard aqui no Instituto Lauro de Souza Lima, tem mostrado que nos casos em que a inoculação é realizada após o término do tratamento, as chances de se recuperação de bacilos ao final dos oito meses da inoculação são pequenas, ainda que os dados clínicos e laboratoriais ainda mostrem sinal de doença ativa. Uma das hipóteses para esta falha na multiplicação seria pela possibilidade das drogas usadas na PQT (por pelo menos 12 doses), poderiam ainda estar ativas e agindo sobre os bacilos, tornando-os inativos ou adormecidos para uma multiplicação, lembrando que a dapsona tem ação bacteriostática.

De um total de 12 inoculações, somente dois casos apresentaram multiplicação ao final dos 8 meses. Em estudos realizados com pacientes pós-PQT em diferentes períodos de tratamento (12, 24 e 36 doses de PQT) a taxa de positividade no coxim plantar de camundongos foi de 23,5% e 25% nos pacientes que finalizaram o tratamento coma a 12ª dose da PQT, um dado bastante semelhante encontrado em nosso trabalho cuja positividade foi de 20%<sup>117,118</sup>. Estes mesmos trabalhos mostraram que houve um declínio na positividade das inoculações com relação ao tempo de tratamento (7,1% e 8% na 24ª dose da PQT e 3,84% e 4% na 36ª), sugerindo que em pacientes na 12ª dose de PQT com qualquer sinal de multiplicação bacilar, esta positividade poderia estar relacionada ao tempo de tratamento, como é o caso dos pacientes em nosso estudo.

Mesmo que o recuperado final das suspensões de bacilo tenha ficado abaixo do definido pela técnica de Shepard, não podemos ignorar a multiplicação bacilar, pois a literatura refere que a dose mínima infectante de *M. leprae* é da ordem de cinco organismos viáveis. Como o inóculo é distribuído nos tecidos, tanto contíguos quanto distantes,

normalmente não englobados durante a excisão do tecido, uma grande fracção deste é perdido, sugerindo que a dose mínima infectante pode ser tão pequena quanto um ou dois organismos vivos<sup>100,119,120,121</sup>.

A variação entre os CTs parece ser explicada pela quantidade de bacilos presente nas amostras, e como discutido anteriormente, quanto mais bacilos existem, mais baixo é o limite de detecção. Interessante apontar que em uma delas, mesmo a detecção da RLEP aconteceu em níveis extremamente baixos (CT 38), sendo que o gene 16S não foi detectado. Isso reforça a ideia e a importância de se enumerar os bacilos.

Neste grupo em particular era esperado resultados baixos de detecção principalmente do gene 16S rRNA. Isto se deve ao fato de que os pacientes em questão terminaram o tratamento recentemente, e como se afirma que na primeira dose de Rifampicina cerca de 90% dos bacilos são mortos, era de se esperar então que ao final de 12 meses nenhum das amostras mostrasse qualquer sinal de atividade para o gene 16S rRNA.

A detecção em quatro das doze amostras, ainda que em níveis muito baixos (CT alto), pode sinalizar para um tratamento insuficiente, ou então um caso de resistência, e estes deveriam ser acompanhados e avaliados durante um período de tempo para se observar a evolução desses pacientes.

Ainda é importante ressaltar que os dados moleculares precisam ser ajustados a uma normalização, que permitam correlacionar os dados de RNA (16S) e DNA (RLEP) a fim de obtermos informações mais precisas e que possam de fato ser correlacionados aos achados da inoculação em coxim plantar de camundongos. Desta forma, estabeleceríamos uma metodologia sensível e precisa que poderá ser utilizada para o acompanhamento e monitoramento de pacientes que estejam em final de tratamento e com suspeitas de recidiva.

Nós entendemos que nosso método é consistente e pode trazer uma enorme ajuda para o clínico melhorando o manejo do paciente, especialmente em casos suspeitos de recidiva. Uma importante questão nas recidivas é saber se os bacilos estão vivos. Esta metodologia fornece uma técnica fácil para se estimar a viabilidade e o número de bacilos viáveis diretamente de amostras clínicas que pode ajudar a resolver esta questão. Entretanto nós também entendemos que a metodologia está longe de definir a viabilidade quantitativamente, uma vez que o índice de correlação que poderia indicar o número exato de bactérias viáveis na amostra direta ainda não foi estabelecido. Estes resultados melhoram os dados já conhecidos na literatura, e são uma esperança para um melhor acompanhamento dos pacientes de hanseníase. Esta abordagem poderia ser utilizada em outras bactérias ou fungos onde

culturas celulares in vitro são deficientes ou porque os ciclos de vida criam dificuldades para se estimar a viabilidade.

Esta metodologia, então permitirá reduzir o tempo de espera do clínico na obtenção dos resultados que auxiliará no diagnóstico preciso das recidivas, da persistência bacilar ou até mesmo nos casos de resistência. A interrupção da cadeia de transmissão é o ponto chave na eliminação da doença, dessa forma metodologias diagnósticas como essa de viabilidade molecular contribuirá para uma decisão rápida do clínico na conduta do tratamento.

## 7. Conclusão

Diante dos objetivos estabelecidos, da metodologia utilizada e resultados obtidos, podemos concluir que a detecção do gene 16S rRNA através da técnica de q PCR é uma ferramenta consistente e promissora na detecção de *Mycobacterium leprae* viáveis em amostras clínicas diretas do paciente com hanseníase, e em amostras de coxim plantar de camundongos que foram previamente inoculados.

Concluimos também que a detecção do gene RLEP é importante na detecção da bactéria mesmo em amostras paucibacilares, confirmando sua importância em estudos clínicos,

Finalizamos dizendo que as ferramentas moleculares são mais vantajosas em relação a inoculação em coxim plantar de camundongos, pois sua sensibilidade é grande quando comparados aos dados de baciloscopia.

## 8. Referências

1. Bryceson A, Pfallzgraff RE – Leprosy. 1990. Churchill Livingstone Inc., London.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para controle da Hanseníase. Ministério da Saúde. 1 ed. Brasília. 2002.
3. 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 Immunol. Med. Microbiol. 2008; 54 (2): 263-70.
4. Ura S, Diório SM, Carreira BG, Trino LM, Lauris JR, Barravieira B. Estudo terapêutico comparando a associação de rifampicina, ofloxacina e minociclina com associação rifampicina, clofazimina e dapsona em pacientes com hanseníase multibacilar. Hansen Int. 2007; 32(1): 57-65.
5. World Health Organization. Cluster analysis of the overall detection rate of leprosy in Brazil for the triennium 2011-2013. Leprosy Elimination. September 2014.
6. Martins AC, Miranda A, Oliveira ML, Bühner-Sékula S, Martinez A. Estudo da musoca nasal de contatos de hanseníase, com positividade para o antígeno glicolípido fenólico 1. Brazilian Journal of Otorhinolaryngol. 2010; 76: 579-87.
7. World Health Organization. Global Leprosy Situation. Weekly epidemiological record, 2010, 85, 337-348.
8. Shepard, C.C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot pads of mice. J. exp med. 1960; 112: 445-54.
9. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams, LB, Krahenbuhl JL, et al. 2008. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using Real-Time PCR. PloS Negl Trop Dis 2(11): e328;
10. Katoch, V.M. The contemporary relevance of the mouse foot pad model for cultivating *M. leprae*. Lepr Ver (2009) 80, 120-123.
11. Levy L, Baohong J. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. Leprosy Review. (2006), 77 (2): 5-24.
12. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clinical Microbiology Reviews, Apr 2006, 338-381.

13. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, Williams D L. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR J Clin Microbiol. 2009; 47(7) 2124–2130.
14. Phetsuksiri, B., J. Rudeeaneksin, P. Supapakul, S. Wachapong, K. Mahotarn, and P. J. Brennan. 2006. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006; 3:319–328.
15. Opromolla DVA. Noções de Hansenologia. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima 2000; p.1-5.
16. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. Saúde Soc. 2004; 13: 76-88.
17. Salgado CG, Barreto JG. Leprosy Transmission: Still a Challenge. Journal Compilation, 2012.
18. World Health Organization. Expert Committee on Leprosy. Sixth Report. Technical Report Series, 768; 1988.
19. World Health Organization. Leprosy Elimination: Microbiology of *Mycobacterium leprae*. 2013.
20. Hansen GA, et al. Leprosy: in Its Clinical and pathological aspects. Wright, Bristol, p. 43, 1985.
21. Lyon S, Grossi MAF. Hanseníase. Editora Medbrook, 2012. 520p.
22. Rees RFW. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC (ed) Leprosy, 1<sup>st</sup> edition, Churchill Livingstone Inc, New York, p. 31-52, 1985.
23. Talhari S, Neves RG. Dermatologia Tropical: hanseníase. Editora Tropical, Manaus, 1997.
24. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta immune e do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 35 (4): 365-375, Jul-Ago, 2002.
25. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem 1995; 64:29-63.

26. Vissa VD & Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene. *Genome Biol* 2001; 2(8):reviews1023.1–1023.8.
27. Davey TF, Rees RJ. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Leprosy Review* 1974; 25: 121-134.
28. Eichelman K, Gonzáles Gonzáles SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Lepra: puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento. *Actas Dermo-Sifilográficas*. 2013; 104(7): 554-563.
29. Ghorpade A. Ornamental tattoos and skin lesions. Tattoo inoculation borderline tuberculoid leprosy. *Int J Dermatol*. 2009; 48: 11-13.
30. Duncan ME, Melson R, Pearson JM, Menzel S, Barnetson RS. A clinical and immunological study of four babies of mothers with lepromatous leprosy, two of whom developed leprosy in infancy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1983; 51: 7-17.
31. Harboe, M. Leprosy in history. Hasting RC. *Leprosy*, 1985; 2: 87-112.
32. Foss NT. Aspectos Imunológicos da Hanseníase. In: Simpósio: Hanseníase. *Medicina Ribeirão Preto*, 30:335-339. 1997.
33. Saunderson PR. Current challenges in leprosy research. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013 Sep;107(9):533-4.
34. Moet FJ, Pahan D, Schuring R, et al. Physical distance, genetic relationship, age and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis* 2006; 193: 346-353.
35. Truman RW, Singh P, Sharma R, et al. Probable zoonotic leprosy in the Southern United States. *New England J Med* 2011; 364: 1626-1633.
36. Sakamuri RM, Kimura M, Li W et al. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. *J Clin Microbiology* 2009; 47: 2844-2854.
37. Ridley DS, Jopling WH. Classification of Leprosy According to Immunity. A five- group system. *Int. J. Leprosy*. 1966; 34(3): 255-73.
38. Foss, NT. Aspectos Imunológicos da Hanseníase. In: Simpósio: Hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto*, 1997; 30: 335-339.

39. Modlin RL Th1-Th2 paradigm: Insights from Leprosy. *J. Invest. Dermatol.* 1994; 102(6): 828-32.
40. Ávila JL, Convit J. Studies on cellular immunity in leprosy. I Lysosomal enzymes. *Int. J. Leprosy.* 1970; 38(4): 359-364.
41. Mutis T, Kraakman EM, Cornelisse YE, Haanen JB, Spits H, De Vries RR, et al. Analysis of cytokine production by Mycobacterium- reactive T cell. Failure to explain Mycobacterium leprae- specific nonresponsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. *J. Immunol.* 1993; 150(10): 4641-51.
42. Convit J, Pinardi ME, Rojas FA Some considerations regarding the immunology of leprosy. *Int. J. Leprosy.* 1971;39(2):556-64.
43. Rea TH, Quismorio FP, Harding B, Nies KM, Di Saia PJ, Levan NE, et al. Immunologic responses in patients with lepromatous leprosy. *Arch. Dermatol.* 1976; 112(6):791-800.
44. Nogueira MES, Vilani-Moreno FR, Silva EA, Arruda MSP. Imunologia. In: *Noções de Hansenologia*. 2ed. Bauru: Centro de Estudos “Dr Reynaldo Quagliato”. Instituto Lauro de Souza Lima, p. 27-42. 2000.
45. Foss NT, Souza CS, Goulart IMB, Gonçalves HS, Virmond M. Hanseníase: Episódios Reacionais. *Sociedade Brasileira de Hansenologia & Sociedade Brasileira de Dermatologia*, 2003: 1-19.
46. Opromolla, D V A. Recidiva ou Reação Reversa? *Hansenologia Internationalis*, 1994. v.19 (1):10-16.
47. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Guia para utilização de medicamentos e imunobiológicos na área de hanseníase. Brasília, 2001.
48. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina*, Ribeirão Preto, 1997; 30: 325-334.
49. Teixeira AC, et al. Avaliação da concordância entre exames clínicos e laboratoriais no diagnóstico da hanseníase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41 (Suplemento II), 2008; 48-55.
50. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *The Lancet*. 2004; 363: 1209-1219.

51. Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J Am Dermatol.* 2004; 51: 417-426.
52. Kurabachew, M., A. Wondimu, and J. J. Ryon. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36:1352–1356.
53. Ramaprasad P, Fernando A, Madhale S, Rao JR, Edward VK, Samson PD, et al. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. *Lepr Rev.* 1997; 68: 301-315.
54. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos. Baciloscopia em Hanseníase. Série A Normas e Manuais técnicos. 2010. 54 pag.
55. International Leprosy Association Technical Forum (2002). The Diagnosis and classification of leprosy. *Int Jour Lepr Other Mycobac Dis*, 70: s3-s23.
56. Goulart IMB, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res* (2007) 299: 267-271.
57. Baumgart KW, Britton WJ, Mullins RJ, Basten A, Barnetson RS. Subclinical infection with *Mycobacterium leprae* - a problem for leprosy control strategies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87(4): 412-415.
58. Buhner 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*. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58 (2): 133-136.
59. Gupta UD, Katoch K, Katoch VM. Study of rifampicin resistance and comparison of dapson resistance of *M. leprae* in pre- and post-MDT era. *Indian J Lepr.* 2009 Jul-Sep; 81(3):131-4.
60. Sekar B, Elangeswaran N, Jayarama E, Rajendran M, Kumar SS, Vijayaraghavan R, Anandan D, Arunagiri K. Drug susceptibility of *Mycobacterium leprae*: a retrospective analysis of mouse footpad inoculation results from 1983 to 1997. *Lepr Rev.* 2002 Sep; 73(3):239-44.

61. Matsuoka M, Kashiwabara Y, Namisato M. A *Mycobacterium leprae* isolate resistant to dapsone, rifampin, ofloxacin and sparflloxacin. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2000 Dec;68(4):452-5.
62. Li HY, Ran SP, Weng XM, Li TG, Deng XH, Li FT. Relapses in leprosy patients treated with rifampicin plus dapsone after varying periods of dapsone monotherapy. *Indian J Lepr.* 2001 Jan-Mar;73(1):1-10.
63. Norman G, Joseph G, Ebenezer G, Job CK. Secondary rifampin resistance following multi-drug therapy - a case report. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2003 Mar;71(1):18-21.
64. Lavania M, Jadhav RS, Chaitanya VS, Turankar R, Selvasekhar A, Das L, Darlong F, Hambroom UK, Kumar S, Sengupta U. Drug resistance patterns in *Mycobacterium leprae* isolates from relapsed leprosy patients attending The Leprosy Mission (TLM) Hospitals in India. *Lepr Rev.* 2014 Sep;85(3):177-85.
65. Roche PW, Neupane KD, Failbus SS, Kamath A, Britton WJ. Vaccination with DNA of the *Mycobacterium tuberculosis* 85B antigen protects mouse foot pad against infection with *M. leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2001 Jun;69(2):93-8.
66. Katoch K, Katoch VM, Natrajan M, Sreevatsa, Gupta UD, Sharma VD, Shivanavar CT. 10-12 years follow-up of highly bacillated BL/LL leprosy patients on combined chemotherapy and immunotherapy. *Vaccine.* 2004 Sep 9;22(27-28):3649-57.
67. Hagge DA, Saunders BM, Ebenezer GJ, Ray NA, Marks VT, Britton WJ, Krahenbuhl JL, Adams LB. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1379-89. doi: 10.2353/ajpath.2009.080550. Epub 2009 Feb 26.
68. Williams DL, Torrero M, Wheeler PR, Truman RW, Yoder M, Morrison N, Bishai WR, Gillis TP. Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infection. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2004;8(1):58-72.
69. Avci P, Sadasivam M, Gupta A, De Melo WC, Huang YY, Yin R, Chandran R, Kumar R, Otufowora A, Nyame T, Hamblin MR. Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2013 Mar;8(3):331-55. doi: 10.1517/17460441.2013.761202. Epub 2013 Jan 8.

70. Lahiri R, Randhawa B, Franken KL, Duthie MS, Spencer JS, Geluk A, Krahenbuhl JL. Development of a mouse food pad model for detection of sub clinical leprosy. *Lepr Rev.* 2011 Dec;82(4):432-44.
71. Katoch VM, Lavania M, Chauhan DS, Sharma R, Hirawati, Katoch K. Recent advances in molecular biology of leprosy. *Indian J Lepr.* 2007 Apr-Sep;79(2-3):151-66.
72. Desikan KV. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev.* 1977 Dec;48(4):231-5.
73. Desikan KV. Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev.* 1995 Dec;66(4):287-95.
74. Wakade AV, Shetty VP. Isolation of *Mycobacterium leprae* from untreated borderline tuberculoid, mid-borderline and indeterminate cases using the mouse foot pad technique- a study of 209 cases. *Lepr Rev.* 2006 Dec;77(4):366-70.
75. Shetty VP, Wakade AV, Ghate S, Pai VV, Ganapati R, Antia NH. Viability and drug susceptibility testing of *M. leprae* using mouse footpad in 37 relapse cases of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2003 Sep;71(3):210-7.
76. Shetty VP, Wakade A, Antia NH. A high incidence of viable *Mycobacterium leprae* in post-MDT recurrent lesions in tuberculoid leprosy patients. *Lepr Rev.* 2001 Sep;72(3):337-44.
77. Katoch VM, Sharma VD. Recent advances in the microbiology of leprosy. *Indian J Lepr.* 2000 Jul-Sep;72(3):363-79.
78. Gupta UD, Katoch VM. Animal models in leprosy. *Ind J Med Microbiol,* 1995; 13: 57-64.
79. Jadhav RS, Kamble RR, Shinde VS, Edward S, Edward VK. Use of reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in the slit-skin smears of leprosy patients. *Indian J Lepr.* 2005 Apr-Jun;77(2):116-27.
80. Sharma R, Lavania M, Katoch K, Chauhan DS, Gupta AK, Gupta UD, Yadav VS, Katoch VM. Development and evaluation of real-time RT-PCR assay for quantitative estimation of viable *Mycobacterium leprae* in clinical samples. *Indian J Lepr.* 2008 Oct-Dec;80(4):315-21.

81. Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, Gandhi R, Chauhan V, Bansal G, Sachan P, Sachan S, Yadav VS, Jadhav R. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol.* 2008 Sep;8(5):627-31. doi: 10.1016/j.meegid.2008.05.007. Epub 2008 Jun 11.
82. Yoon KH, Cho SN, Lee MK, Abalos RM, Cellona RV, Fajardo TT, Guido LS, Dela Cruz EC, Walsh GP, Kim JD. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol* 1993, 31 (4): 895-899.
83. Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J Clin Microbiol* 1990, 28: 1913-1917;
84. Woods SA, Cole ST. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. *Mol. Microbiol.* 1990; 4: 1745-1751.
85. Hartskeerl RA, De Wit M Y, Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J. Gen. Microbiol.* 1989; 135: 2357-2364.
86. Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Llooker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J. Infect. Dis.* 1990; 162: 193-200.
87. De Wit MY, Faber WR, Krieg SR, Douglas JT, Lucas SB, Montreewasuwat N, Pattyn SR, Hussain R, Ponnighaus JM, Hartskeerl RA et al. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29: 906-910.
88. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. *J. Infect. Dis.* 2003; 188(7): 1024-1031.
89. Santos AR, Goes Filho JT, Nery JA, Duppre NC, Gallo ME, Suffys PN, Degraeve WM. Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1995; 11: 113-120.

90. Santos AR, Nery JA, Duppre NC, Gallo ME, Goes Filho JT, Suffys PN, Degrave WM. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. *J. Med. Microbiol.* 1997; 46: 170-172.
91. Kampirapap K, Singthan N, Klatser PR, Wiriyawipart S DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1998; 66: 16-21.
92. Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Am. J. Clin. Pathol.* 1998; 109: 642-646.
93. Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1913-1917.
94. Woods SA & Cole ST. A rapid method for detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 1989; 53: 305-309.
95. Phetsuksiri, B., J. Rudeeaneksin, P. Supapakul, S. Wachapong, K. Mahotarn, and P. J. Brennan. 2006. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006; 3:319–328.
96. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Apr 10;8(4):e2655. doi: 10.1371/journal.pntd.0002655. eCollection 2014.
97. Davis GL<sup>1</sup>, Ray NA, Lahiri R, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Williams DL, Adams LB. Molecular assays for determining *Mycobacterium leprae* viability in tissues of experimentally infected mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Aug 22;7(8):e2404. doi: 10.1371/journal.pntd.0002404. eCollection 2013.
98. Barbieri RR, Sales AM, Illarramendi X, Moraes MO, Nery JA, Moreira SJ, Sarno EN, Machado Ade M, Bozza FA. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Nov;109(7):944-7. Epub 2014 Oct 14.
99. WHO 1987. Laboratory Techniques for leprosy. World Health Organization, Geneva.

100. Levy, L. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in normal mice. Intern Jorunal Leprosy 1987, 55 (4) 814-818.
101. Cole ST, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature, Feb 2001. Vol 409, 1007-1011.
102. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. Journal of Medical Microbiology (2005), 54, 235–242.
103. Colston MJ, Hilson GR, Banerjee DK. The “proportional bactericidal test”: A method for assessing bactericidal activity in drugs against *Mycobacterium leprae* in mice. (1978) Lepr Rev 49: 7–15.
104. Welch TM, Gelber RH, Murray LP, Ng H, O’Neill SM, et al. Viability of *Mycobacterium leprae* after multiplication in mice. Infect Immun (1980) 30: 325–32.
105. Katoch VM. The contemporary relevance of the mouse foot pad model for cultivating *M. leprae*. Leprosy Review (2009) 80, 120-123.
106. Katoch VM, Lavania M, Chauhan DS et al. Recent advances in molecular biology of leprosy. Ind J Lepr, 2007; 79: 151–166.
107. Jadhav RS, Kamble RR, Shinde VS et al. Use of reverse transcription polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in slit skin smears of leprosy patients. Ind J Lepr, 2005; 77: 116–127.
108. Sharma R, Lavania M, Katoch K et al. Development and evaluation of Real-Time RT-PCR assay for quantitative estimation of viable *Mycobacterium leprae* in clinical samples. Ind J Lepr, 2008; 80: 315–321.
109. Lavania M, Katoch K, Katoch VM et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* from environmental soil samples: insights into possible sources for transmission of leprosy. Infect Genet Evol, 2008; 8: 627–631.
110. Davis GL, Nashone AR, Lahiri R, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Williams DL, Adams LB. Molecular Assays for Determining *Mycobacterium leprae* Viability in Tissues of

Experimentally Infected Mice. PLOS Neglected Tropical Diseases. August 2013 | Volume 7 | Issue 8.

111. Wakade AV, Shetty VP. Isolation of *Mycobacterium leprae* from untreated borderline tuberculoid, mid-borderline and indeterminate cases using the mouse footpad technique – a study of 209 cases. *Lepr Rev* (2006) 77, 366–370 In: Katoch VM. The contemporary relevance of the mouse foot padmodel for cultivating *M. leprae* *Lepr Rev* (2009) 80, 120–123.

112. McDermott-Lancaster RD, Ito T, Koshaka K, Guelpa-Lauras CC, Grosset JH. Multiplication of *M. leprae* in the nude mouse, and some applications of nude mice to experimental leprosy. *International Journal of Leprosy*, 1987, 55(4), 889-895.

113. Wakade AV, Shetty VP. Isolation of *Mycobacterium leprae* from untreated borderline tuberculoid, mid-borderline and indeterminate cases using the mouse footpad technique – a study of 209 cases. *Lepr Rev* (2006) 77, 366–370.

114. Martinez NA, Ribeiro-Alves M, Sarno EM, Moraes MO. Evaluation of qPCR-Based assays for leprosy diagnosis directly clinical specimens. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2011, 5 (10) e1354, 1-8.

115. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Instruções normativas: ações de controle da hanseníase. Portaria Conjunta nº 125, 26 de março de 2009.

116. Shetty VP, Wakade AV, Ghate S, Pai VV, Ganapati R, Antia NH. Viability and Drug Susceptibility Testing in Relapse Cases. *Internat Journ Leprosy* 71 (3), 210-217.

117. Gupta UD, Katoch K, Singh HB, Natrajan M, Katoch VM. Persistence Studies in Leprosy Patients after Multi-Drug Treatment *Inter Journ Leprosy*, 2005. 73 (2), 100-104.

118. Gupta UD, Katoch K, Singh HB, Natrajan M, Sharma VD, Katoch VM. Detection of viable organisms in leprosy patients treated with multidrug therapy. *Acta Leprologica*, 1999, 11 (3), 89-92.

119. Levy L. Studies of the mouse foot pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*: doubling time during logarithmic multiplication. *Lepr Review*, 1976, 47, 103;

120. Shepard CC, McRae DH. *Mycobacterium leprae* in mice: minimal infectious dose, relationship between staining quality and infectivity, and effect of cortisone. *Journ Bacteriological*, 1965 (89) 365;

121. Welch TM, Gelber RH, Murray LP, O'Neill N<sub>G</sub> H, Levy L. Viability of *Mycobacterium leprae* after multiplication in mice. *Infect Immun*, 1980 (30) 325.

*Anexos*

**Anexo 01. Dados complementares referentes aos pacientes do grupo virgem de tratamento.**

<b>PACIENTE</b>	<b>Etnia</b>	<b>Data Nasc.</b>	<b>Procedência</b>	<b>Tto atual</b>	<b>R &amp; J</b>	<b>Bacilosopia (IB)</b>	<b>Bacilosopia (IH)</b>	<b>(IM)</b>
1	Branca	09/03/1947	Buri	PQT-MB	BL	2,83 + (2% típico)	5+	Positivo
2	Branca	01/01/1969	Bauru	PQT-MB	BL		6+(ativa e em progressão)	Positivo
3	Branca	18/10/1964	Bauru	PQT-MB	LL		6+(ativo e em progressao)	Positivo
4	Branca	23/11/1948	Junqueirópolis	PQT-MB	BT	Negativo	negativo	Negativo
5	Branca	25/01/1977	Ibitinga	PQT-MB	TT	Negativo	negativo( em reação tp 1	Negativo
6	Branca	07/10/1967	Agudos	PQT-MB	BL		5+ (ativa e em progressao)	Positivo
7	Branca	19/09/1937	Bauru	PQT-MB	BB	3+ (1% típico)	3+ em reação tipo 1	Positivo
8	Branca	30/01/1950	Avanhandava	PQT-MB	BT		2+ em reacao tipo 1	Positivo
9 *			MT	PQT-MB				
10 **			MT	PQT-MB	BB		4+	
14	Branca	07/11/1961	Lucélia	PQT-MB	BT		1+	Positivo
15	Branca	23/03/1959	Cafelândia	PQT-MB	BL		5+	Positivo
16	Branca	10/01/1936	Castilho	PQT-MB	BB	2+ (3% típico)	4+	Positivo
17	Branca	03/12/1920	Pirajuí	PQT-MB	BB	neg	1+ em reacao tipo 1	Positivo
18	Branca	28/11/1977	Bauru	PQT-MB	BL	2,5+	5+	
20	Branca	24/03/1977	Bauru	PQT-MB	LL	4+ (2% típico)	6+ (ENH)	Positivo
21	Branca	29/11/1961	Birigui	PQT-MB	LL	3,5+ (2% típico)	6+	
28	Branca	15/05/1954	Bauru	PQT-MB	TT		Negativo	Negativo
29	Branca	23/06/1962	Bauru	PQT-MB	BT			
35	Branca	18/07/1979	Agudos	PQT-MB	BL	3,67 + 2%	5+	Positivo
37	Branca	15/10/1940	Pedemeiras	PQT-MB	BL	1,17 sem típico	4+	Positivo
38 ***				PQT-MB				
41					BL		5+	Positivo
46					BB	0,16 sem típicos	NEG- reação tipo 1	Negativo
49					LL		6+	

\* Paciente externo. Não tivemos acesso ao prontuário. \*\* Paciente externo. Não tivemos acesso ao prontuário. \*\*\* Paciente foi a óbito e não foi possível recuperar os dados do prontuário.

**Anexo 02.** Dados complementares referentes aos pacientes do grupo com suspeita de recidiva.

<b>Paciente</b>	<b>Etnia</b>	<b>Data Nasc.</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Tratamento anterior</b>	<b>Tratamento atual</b>	<b>R &amp; J</b>	<b>Bacilosopia (IB)</b>	<b>Bacilosopia (IH)</b>	<b>(IM)</b>
<b>11</b>	Branca	03/08/1969	Limeira-SP	PQT-MB	PQT-MB	BL	2,17+ (4% típico)	5+ ativo e em progressao	
<b>13</b>	Branca	19/11/1955	Pres. Venceslau-SP	PQT-MB	PQT-MB	BL	2,67+ (0% típico)	5+	Negativo
<b>19</b>	Branca	02/09/1930	Tupã-SP	PQT-MB	PQT-MB	BL + ENH	4,17+ (0% típico)	6+	
<b>22</b>	Branca	26/05/1956	Amparo-SP	PQT-MB	PQT-MB	BL + ENH	3+	3+	
<b>27</b>	Branca	27/01/1945	Olimpia-SP	PQT-MB 18 doses 2003	PQT-MB	BL recidiva	Negativo		
<b>32</b>	Branca	11/12/1987	Araçatuba-SP	PQT-MB 12 doses 2008-2009	PQT-MB	LL regressão + ENH	4,33+ 0%	Positiva - multifragmentados	Negativo
<b>39</b>	Branca	22/02/1960	Bauru-SP	PQT-MB 24 doses 2002-2004	PQT-MB	LL regressão + ENH	0,5+ 0%	Positiva - poeira bacilar	
<b>42</b>	Branca	30/03/1953	Belém-PA	PQT-MB 12 doses 2006-2007	PQT-MB	Neural Puro *	Negativo (17/7/13)	*	Negativo
<b>44</b>	Branca	05/06/1952	Leme-SP	PQT-MB 12 doses 2008-2009	PQT-MB	BB + reação tipo I	05+ 0%	Negativo	Negativo
<b>45</b>	Branca	22/09/1969	Sta Maria da Serra-SP	PQT-MB 24 doses 2004-2006	PQT-MB	BB ou BL	0,17 0%	3+	Negativo
<b>47</b>	Branca	07/11/1972	Praia Grande-SP	PQT-MB 28 doses 1991-1993	PQT-MB	BB			

**Anexo 03.** Dados complementares referentes aos pacientes do grupo em final de tratamento.

<b>Paciente</b>	<b>Data</b>	<b>Etnia</b>	<b>Data Nasc.</b>	<b>Procedência</b>	<b>Tto atual</b>	<b>R &amp; J</b>	<b>Bacilosopia (IB e IM)</b>	<b>Bacilosopia (IH) IB e IM</b>
<b>12</b>	13/06/2012	Mulata	11/10/1965	Ilha Bela	PQT-MB-12	BL + ENH		2+ em regressão
<b>23</b>	13/11/2012	Branca	28/11/1979	Pirassununga	PQT-MB-12	BL + ENH		2+ em regressão
<b>24</b>	22/11/2012	Branca	01/07/1981	Gavião Peixoto	PQT-MB-12	BL	Orelha esq.6+	5+
<b>25</b>	26/11/2012	Mulat o	13/06/1962	Pres. Venceslau	PQT-MB-12	BB REAC. T1	1+	2+
<b>26</b>	30/11/2012	Branca	17/07/1948	Vargem Grande do Sul	PQT-MB-12	BL + ENH		4+
<b>30</b>	02/04/2013	Branca	31/12/1944	Iacanga	PQT-MB-12	LL regressão	2,17 + 0%	3+ multifragmentados
<b>31</b>	05/04/2013	Branca	21/10/1951	Rosana/SP	PQT-MB-24	LL regressão	2,33 0%	5+ sem típicos
<b>33</b>	17/04/2013	Branca	20/07/1938	Lucélia/SP	PQT-MB-24	BL	3,5+ 2% (out11)	5+ sem típicos reação tipo I
<b>34</b>	18/04/2013	Mulata	01/05/1974	Ouro Verde/SP	PQT-MB-12	LL+ENH	2+ 2% (agos13)	6+ com típicos
<b>36</b>	24/04/2013	Branca	20/01/1939	Amadeu Amaral/SP	PQT-MB-12	LL regressão	-	6+ raros íntegros
<b>40</b>	05/07/2013	Branca	06/06/1962	Águas da Prata/SP	PQT-MB-24	LL regressão reacional misto	3,5 0% (fev. 12)	4+ granulosos
<b>43</b>						LL regressão + ENH	1,83 sem típicos	6+ sem típicos

**Anexo 4** – Inoculação em coxim plantar de camundongo da linhagem BALB/c (A) e (B).



Fonte: Laboratório de Hanseníase Experimental do Instituto Lauro de Souza Lima

**A**



Fonte: Laboratório de Hanseníase Experimental do Instituto Lauro de Souza Lima

**B**

*Anexo 5* – Estante de ventilação para manutenção de animais.



Fonte: Laboratório de Hanseníase Experimental do Instituto Lauro de Souza Lima

*Apêndice*

## Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu \_\_\_\_\_ recebi, dos pesquisadores responsáveis, esclarecimentos quanto ao projeto de pesquisa “**Determinação molecular da viabilidade do *Mycobacterium leprae*: uma comparação com outras abordagens metodológicas**”, que se fará sob a coordenação da pesquisadora Ida Maria Foschiani Dias Baptista.

Fui informado que o projeto pretende estudar o comportamento da bactéria causadora da hanseníase, antes do tratamento, nos casos onde ocorram reações na minha pele e após o tratamento. Para esta participação, me submeterei a coleta de biópsias (antes, na presença de reações e após o tratamento), que será feita por profissional médico habilitado utilizando material descartável. Essas biópsias serão utilizadas visando separar o material genético e as proteínas da bactéria para o estudo.

Compreendi que posso livremente interromper minha participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar minha decisão e que isso não trará qualquer consequência ao meu atendimento e tratamento. Compreendi também, que será preservado o sigilo de minha identidade, bem como que não terei despesas e não receberei qualquer benefício material por participar do estudo.

Fui informado ainda que posso receber explicações adicionais dos pesquisadores assim que queira solicitar, além disso terei acesso aos resultados se assim o desejar.

Devidamente informado e esclarecido, **manifesto aqui meu consentimento em participar do estudo.**

Declaro, adicionalmente, que não tenho qualquer restrição ao armazenamento do material coletado, uma vez que serei convidado a consentir novamente caso seja objeto de nova pesquisa.

Assinatura do participante (ou responsável legal): \_\_\_\_\_

Nº de Prontuário:

Telefone do participante para contato: (    )

Bauru, ...../...../.....

Assinatura do Pesquisador Responsável: \_\_\_\_\_

Telefone do Pesquisador Responsável para contato: ( 14 ) 3103 -5946