

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu

LETICIA ROSSIGNOLLI DE LAMANO

**Estudo da diversidade genética do *Mycobacterium leprae*
em pacientes com hanseníase no município de
Rondonópolis (MT): uma contribuição para o melhor
entendimento da sua transmissão.**

Botucatu-SP
2013

LETICIA ROSSIGNOLLI DE LAMANO

Estudo da diversidade genética do *Mycobacterium leprae* em pacientes com hanseníase no município de Rondonópolis (MT): uma contribuição para o melhor entendimento da sua transmissão.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Botucatu-SP
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

De Lamano, Leticia Rossignolli.

Estudo da diversidade genética do *Mycobacterium leprae* em pacientes com hanseníase no município de Rondonópolis: uma contribuição para o melhor entendimento da sua transmissão / Leticia Rossignolli De Lamano. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ida Maria Foschiani Dias Baptista

Capes: 20202008

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Hanseníase – Epidemiologia.
3. Epidemiologia molecular – Pesquisa. 4. Saúde pública.

Palavras-chave: Epidemiologia molecular; Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; SNP; STRs.

“A gratidão desbloqueia a abundância da vida. Ela torna o que temos em suficiente, e mais.

Ela torna a negação em aceitação, caos em ordem, confusão em clareza. Ela pode transformar uma refeição em um banquete, uma casa em um lar, um estranho em um amigo. A gratidão dá sentido ao nosso passado, traz paz para o hoje, e cria uma visão para o amanhã”.

Melody Beattie

Dedicatória

*Agradeço a meus pais, **Rosangela e Valdir**, por sempre acreditar que educação é o melhor caminho, por confiar nas minhas escolhas e torcer pelas minhas vitórias. Pela compreensão, carinho e amor incondicional em todas minhas decisões. Grata por terem me ajudado a chegar até aqui, sem vocês nada disso seria possível.*

*A minha orientadora, **Dra. Ida Maria**, por acreditar no meu trabalho, pela sua participação e auxílio ao longo de toda a caminhada e, principalmente, pelos conhecimentos compartilhados, pela sua amizade, paciência e compreensão durante todos os momentos. Este trabalho é fruto da sua dedicação como grande pesquisadora, que durante esses quatro anos mostrou-se uma verdadeira amiga e professora em todos os projetos compartilhados. Com você aprendi a ser mais forte e sua presença foi essencial nessa jornada. “Os amigos são irmãos que Deus nos permite escolher”.*

Agradecimientos

A Deus, pela tua grandeza, pelo teu amor incondicional e carinho, por nunca desistir de mim e por me amparar em todos os meus momentos;

Ao meu querido irmão, Rafael, que sempre esteve presente. Agradeço pelo amor, carinho, companheirismo e por tornar meus dias mais felizes;

Ao Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond pela sua atenção e apoio que diretamente me auxiliou na realização deste trabalho. Sua postura ética e sua carreira profissional são de minha imensa admiração e respeito;

Ao Instituto Lauro de Souza Lima-ILSL, onde me proporcionou todas as ferramentas para que eu pudesse desenvolver meu trabalho;

A Dra. Vara Vissa (Colorado State University - Fort Collins) pela valiosa contribuição nos ensaios moleculares, pelas ricas sugestões durante a discussão dos resultados e auxílios durante todo o trabalho. Grata pelo seu exemplo de profissionalismo e dedicação à ciência;

Ao Dr. Philip Suffys (FIOCRUZ-RJ), pelas contribuições dadas e por toda ajuda que me proporcionou com seu vasto conhecimento e por ter me acolhido em seu laboratório;

Ao Marcelo Emanuel Ivens de Araujo (FIOCRUZ-RJ), por toda paciência e explicação no funcionamento de software;

A Luciana Fachin, por ter contribuído e me auxiliado nas análises realizadas no laboratório.

Ao grupo de estudos da Dra. Ida Maria, onde aprendemos a compartilhar informações e saber que a caminhada é longa, mas que se mantendo juntos se torna mais leve.

Amanda e Eloíse que ao longo do tempo além de companheiras de estudos e laboratório se tornaram grandes amigas, nas quais sempre pude confiar;

A Priscila, Patrícia e Weber pela amizade que foi construída ao longo dos anos, por entenderem os momentos de estresses, pelo apoio e pelas risadas;

Ao programa de pós-graduação em Doenças Tropicais, parte responsável pelo meu crescimento profissional;

A Muitas pessoas que passaram pela minha vida nesse momento de crescimento e puderam contribuir um pouco com gesto de carinho, admiração e confiança;

Resumo

Resumo

O município de Rondonópolis, no Mato Grosso é altamente endêmico para a hanseníase, apesar da existência de serviços qualificados para o diagnóstico e acompanhamento dos casos e a implementação da poliquimioterapia. Para resolver este paradoxo, um estudo completo de epidemiologia molecular foi iniciado. Questionários estruturados, incluindo detalhes clínicos, residencial, demográficas e ocupacionais, amostras biópsias de pele e outros exames laboratoriais para diagnóstico foram coletadas para 260 pacientes diagnosticados no período de 2007-2010. Genótipos de *Mycobacterium leprae* foram determinados pela análise por STRs e tipagem de SNP utilizando DNA extraído de biópsias de pele antes de iniciar o tratamento. GoogleMaps foi utilizado para localizar os pacientes. A média de idade dos pacientes variou na faixa dos 11 aos 90 anos e incluiu a 137 homens e 123 mulheres. De acordo com a classificação Ridley & Jopling observamos um predomínio das formas TT (39%) e BT (33%), seguido por BB (19%), BL (5%), LL (3%) e I (1%). A cidade é essencialmente urbana, com 200.000 habitantes e os pacientes estavam distribuídos em 106 bairros. Bairros de alta endemicidade englobando bairros vizinhos puderam ser detectados. Das 260 amostras de DNA de biópsias foram analisadas por meio de 17 loci STRs, 15 loci foram polimórficos (2-23 alelos), enquanto que os loci de 6-3A e 21-3 foram invariáveis. Quando foram analisados os genótipos do SNP observou-se que 77% (n = 200) foram genótipo 3, 16% (n = 41), o genótipo 4, 1,5% (n = 4), o genótipo 1 e 3, 8% (n = 10) genótipo 2. Duas amostras (0,76%) para diferenciar o genótipo 1 do 2 na análise de seqüenciamento foi inconclusivo e em outras três amostras (1,15%) não obtivemos amplificação. Por meio da análise filogenética, observou-se uma estrutura populacional composta por alguns subgrupos. Vários isolados tipados por STRs foram encontrados em cada um dos bairros. Diversidade genética dentro e entre os bairros não revelou uma estrutura de população distinta. A concentração espacial dos pacientes é provavelmente uma consequência do status sócio-econômico. A manutenção de um estado de alta endemicidade ao lado de uma microevolução de STRs é interessante e apresenta oportunidades para abordar a dinâmica de transmissão.

Palavras-chave: Epidemiologia Molecular; Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; SNPs; STRs.

Abstract

The municipality of Rondonópolis, in Mato Grosso is highly endemic for leprosy despite the existence of qualified services for diagnosis and monitoring of cases and the implementation of multidrug therapy. To address this paradox, a comprehensive molecular epidemiology study was initiated. Structured questionnaires including clinical, residential, demographic, and occupational details and skin samples for diagnosis and laboratory tests were collected for 260 patients diagnosed during the period of 2007-2010. Genotypes of *Mycobacterium leprae* were determined using STR analysis and SNP typing using DNA extracts from skin biopsies taken before starting treatment. GoogleMaps was used to localize patients. The patients ranging in age from 11 to 90 years included 137 males and 123 females. According to the classification of Ridley & Jopling observed a predominance of forms TT (39%) and BT (33%), followed by BB (19%), BL (5%), LL (3%) and I (1%). The city is primarily urban with 200,000 inhabitants and the patients could be assigned to 106 smaller units (villages). Neighborhoods of high endemicity encompassing adjoining villages could be detected. Of the 260 biopsy DNA samples analyzed across 17 STR loci, 15 loci were polymorphic (2-23 alleles), while the loci 6-3a and 21-3 were not. When we analyzed the genotypes of the SNP we observed that 77% (n = 200) were genotype 3: 16% (n = 41) genotype 4, 1.5% (n = 4) genotype 1 and 3, 8% (n = 10) 2 genotype. Two samples (0.76%) to differentiate genotype 1 and 2 the sequencing analysis was inconclusive and the other three samples (1.15%) did not amplify. Through phylogenetic analysis, we observed a particular population structure composed of some subgroups. Multiple STR strain types are found in each of the neighborhoods. Genetic diversity within and among the neighborhoods does not reveal a distinct population structure. Spatial clustering of patients is likely a consequence of socio-economic status. The maintenance of a highly endemic state alongside microevolution in STRs is interesting and presents opportunities for addressing the dynamics of transmission.

Key-words: Molecular epidemiology; Leprosy; *Mycobacterium leprae*; SNPs; STRs.

Sumário

1.0. Introdução	
1.1. Origem da Hanseníase.....	1
1.2. Características biológicas do <i>Mycobacterium leprae</i>	3
1.3. Transmissão da hanseníase.....	4
1.4. Aspectos clínicos e resposta imunológica do hospedeiro.....	5
1.5. Diagnóstico clínico e laboratorial da Hanseníase.....	7
1.6. Distribuição Global da Hanseníase.....	9
1.7. Variação Genômica do <i>Mycobacterium leprae</i>	11
2.0. Objetivos	
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3.0. Casuística e Métodos	
3.1. Casuística.....	19
3.2. Coleta de biópsias.....	19
3.3. Extração de DNA de biópsia de pele.....	19
3.4. <i>Multiple-locus VNTR Analysis</i> (MLVA).....	19
3.5. Amplificação STRs utilizando PCR <i>multiplex</i>	20
3.6. <i>Fragment Length Analysis</i> (FLA).....	21
3.7. Análises de resultados.....	21
3.8. Método de Georeferenciamento.....	22
3.9. Genotipagem dos <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP).....	22
4.0. Resultados	
4.1. População estudada.....	25
4.2. MLVA: diversidade genética e estrutura populacional.....	29
4.3. Agrupamento dos genótipos e Filogenia.....	34
4.4. Famílias multicascos.....	40
5.0. Discussão	44
6.0. Conclusões	53
7.0. Referências	55
8.0. Anexos	63
8.1. Anexo 1.....	63
8.2. Anexo 2.....	69

1.0. Introdução

1.1. Origem da hanseníase

A hanseníase é considerada uma das primeiras doenças infecciosas descritas, sendo relatada na Índia em 1500 aC. Existem referências à doença na literatura chinesa, na época da dinastia Chou em 600 aC, assim como nos livros bíblicos do antigo e novo testamento, sendo uma das poucas doenças que pode ser reconhecida em escrituras ocidentais desde pelo menos o segundo século aC^{1,2}. Outro registro mais antigo ocorreu no Egito, cerca de 200 a 300 aC, como evidenciado por resultados consistentes com marcas da doença em esqueletos. Acredita-se que tenha chegado ao Egito por meio da invasão Persa durante o século VI aC, ou pelas tropas de Alexandre, o Grande, no século IV aC³

Nas Américas acredita-se que a hanseníase tenha sido introduzida por colonizadores entre os séculos XVI e XVII, pois não havia evidências da doença entre as tribos indígenas. Nos Estados Unidos, os franceses que deram origem ao estado da Louisiana, foram os que provavelmente trouxeram a doença, enquanto que na América do sul, por colonos espanhóis e portugueses^{1,4}. A hanseníase chegou ao Brasil por vários pontos do litoral, com os primeiros colonizadores portugueses, principalmente açorianos, e os escravos africanos contribuíram para a disseminação da doença. Os primeiros casos da doença foram registrados no Rio de Janeiro no ano de 1600⁵.

Em 2005, Monot et al⁶ publicaram um estudos cuja a finalidade foi rastrear a história da disseminação da hanseníase no mundo, por meio da análise de pequenas diferenças nas sequências de DNA de *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), conhecidas como polimorfismo de base única ("*single nucleotide polymorphisms*", *SNPs*). Neste estudo, um total de 175 espécimes clínicos provenientes de 21 países dos cinco continentes foram analisados e enquadrados em quatro diferentes genótipos⁶ (figura 1):

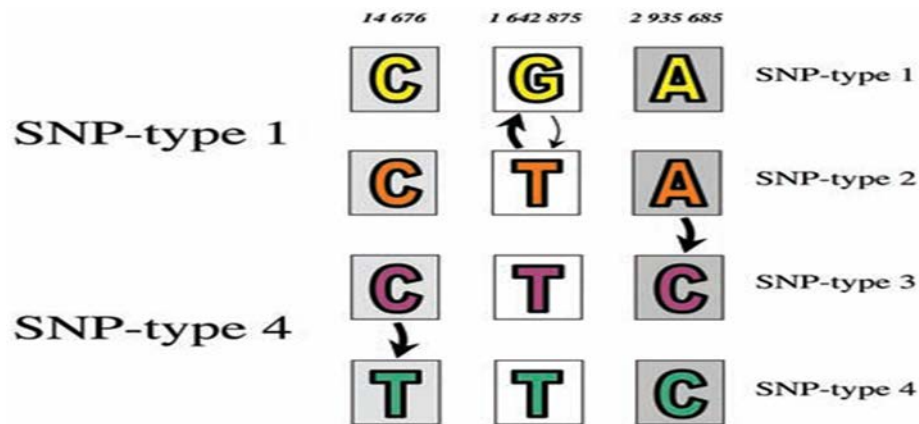


Figura 1: Esquema para exemplificar os 4 tipos de SNPs. Fonte: Monot, 2005⁶.

As amostras provenientes da Ásia Central em sua grande maioria apresentaram genótipo tipo 1, enquanto que o tipo 2 foi predominante na Etiópia, o tipo 3 na Europa, África do Norte e nas Américas e o tipo 4 é mais frequentemente encontrado no Oeste da África e Caribe. A distribuição dos isolados com estes genótipos sugere que a hanseníase teve a sua origem na Ásia Central ou Leste da África. No entanto, esta última localidade parece ser realmente o berço da doença por apresentar o tipo 2, mais raro e provavelmente mais antigo genótipo de *M. leprae*⁶ (figura 2).

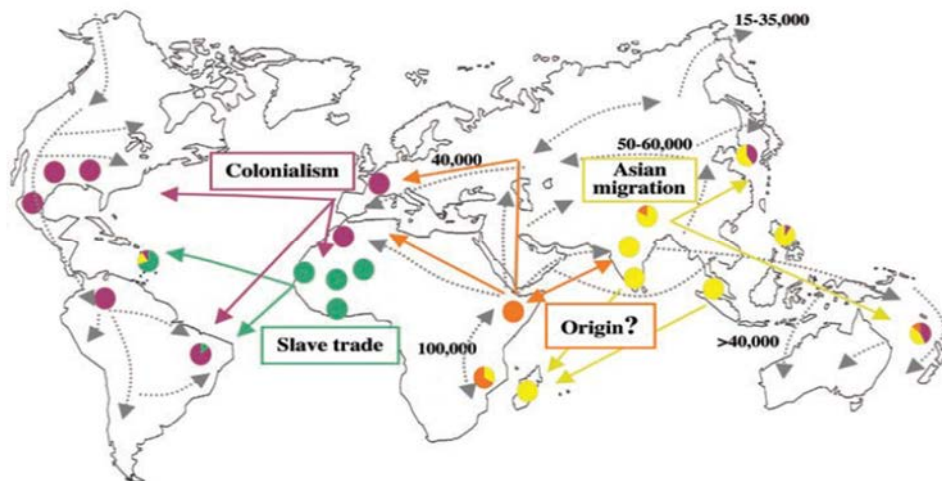


Figura 2: Disseminação da hanseníase pelo mundo: Círculos indicam a origem das amostras analisadas e os quatro diferentes genótipos identificados (genótipo 1: amarelo, 2: laranja, 3: roxo e 4: verde). As setas coloridas indicam a direção das migrações humanas determinadas pela análise dos SNPs. As setas em cinza correspondem às rotas de migração humana determinadas por estudos genéticos, arqueológicos e antropológicos, com estimativa de tempo de migração em anos. Fonte: Monot, 2005⁶.

Recentemente, em continuidade ao estudo anterior o mesmo grupo, analisou amostras do Iran, Turquia, China, Coréia e Japão em busca de novos SNPs, visando assim uma maior compreensão dos mecanismos de disseminação da hanseníase entre pessoas e países. Um total de 400 amostras de 28 regiões foram analisadas e os quatro genótipos anteriormente descritos⁶ foram subdivididos em 16 subtipos. A distribuição global desses novos SNPs demonstrou uma estreita relação entre o genótipo de *M. leprae*, o país de origem e o padrão de migração humana. Os resultados confirmaram a hipótese anterior de que a hanseníase teria se originado no leste da África, e se disseminado para Ásia, Meio Oeste, Europa e posteriormente para países da África central através do comércio de escravos⁷.

1.2. Características biológicas do *Mycobacterium leprae*

Pertencente à ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae*, o *M. leprae*, apresenta-se sob a forma de bacilo reto ou levemente encurvado, com extremidades arredondadas, medindo aproximadamente de 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro. É um parasita intracelular obrigatório, predominante em macrófagos onde podem ser observados formando aglomerados ou globias. Como outras espécies de micobactérias, o *M. leprae* divide-se por fissão binária, é gram-positivo e fortemente álcool-ácido resistente quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen, apresentando-se em sua grande maioria, corados de forma irregular ou granular⁸.

Na microscopia eletrônica observa-se um envoltório celular do *M. leprae* com uma estrutura tripartida composta pela membrana plasmática, parede celular e uma camada mais externa, sendo esta organização rica em lipídios complexos, distintos dos normalmente observados 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. Muitas das propriedades relativas à virulência e a sobrevivência do *M. leprae* dentro da célula hospedeira parecem estar associadas à estrutura característica do seu envelope. Além disso, este envoltório é responsável pela baixa permeabilidade e, consequentemente, grande resistência a agentes terapêuticos normalmente eficazes contra outras bactérias⁹.

O envoltório celular do *M. leprae* consiste de 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)¹⁰.

Outras características marcantes do *M. leprae* estão relacionadas à sua incapacidade de crescimento *in vitro*, e ao seu tempo de duplicação no tecido que é lento, sendo de aproximadamente 11 a 13 dias, durante a fase logarítmica de multiplicação bacilar em coxim plantar de camundongos imunocompetentes⁸. A temperatura ideal para sua multiplicação é de 27 a 30°C, o que explica sua predileção para áreas superficiais do corpo humano e também a sua capacidade de sobreviver em tatus e porções distais do corpo de camundongos¹¹.

1.3. Transmissão da Hanseníase

O mecanismo exato de transmissão da hanseníase não é claro. O portal de entrada de *M. leprae* no corpo humano, não é definitivamente conhecido. No entanto, duas portas de entrada são seriamente consideradas: a pele e o trato respiratório superior. No que diz respeito à via respiratória de entrada de *M. leprae*, as evidências a seu favor é significativo, apesar da crença de que a pele seja a porta de entrada exclusiva¹².

Rees & McDougall¹³ tiveram sucesso na transmissão experimental da hanseníase por meio de aerossóis contendo *M. leprae* em camundongos imunossuprimidos, sugerindo uma possibilidade semelhante em humanos. Bons resultados foram relatados em experiências com camundongos nude quando *M. leprae* foram introduzidos na cavidade nasal por meio de aplicação tópica¹⁴. Em resumo, embora nenhuma conclusão segura possa ser alcançada no que diz respeito à porta de entrada, a via respiratória parece a mais provável, embora outras vias, particularmente a da pele lesionada, não podem ser excluídas.

A hanseníase é uma doença da pobreza e 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 tem aumentado o risco de transmissão de doenças

infectocontagiosa, como a hanseníase, em áreas onde já tinham sido eliminadas como problema de saúde pública¹⁵.

Em populações endêmicas a maioria das pessoas são expostas ao *M. leprae*, mas poucos desenvolvem a doença. Estudos com a finalidade de avaliar a transmissão da hanseníase utilizando amostras de swab nasal e sangue de contatos domiciliares sadios ligados ao caso índice tem demonstrado que 2,5 e 0,8% dos indivíduos que apresentavam positividade, estavam relacionadas à pacientes com a forma multibacilar e paucibacilar da doença respectivamente¹⁶.

Outros estudos confirmaram que pessoas sadias vivendo em contato domiciliar com casos multibacilares apresentam um risco aumentado de cinco a oito vezes para desenvolver a hanseníase. Os casos multibacilares são responsáveis pela maior parte da transmissão de *M. leprae* em comunidades endêmicas¹⁷.

1.4. Aspectos clínicos e resposta imunológica do hospedeiro

A hanseníase acomete principalmente a pele e os nervos periféricos, manifestando-se por uma gama muito ampla de características clínicas em diferentes pessoas e acredita-se que isto seja devido a diferenças na resposta imunitária do organismo à infecção¹⁸.

Outro aspecto é o tropismo de *M. leprae* pelas células de Schwann que leva à desmielinização, fibrose e degeneração dos nervos periféricos, processos esses que se mostram pouco reversíveis e que continuam com o tempo a despeito do tratamento dos pacientes¹⁹.

Apenas uma minoria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* (cerca de 5 a 10% das pessoas) desenvolve a doença, o que pode estar ligado a fatores genéticos, condicionando susceptibilidade à infecção por este patógeno²⁰. Na população susceptível, os padrões de resposta imune do hospedeiro ao bacilo estão associados ao espectro de formas clínicas observadas na hanseníase, também caracterizadas por diferentes cargas bacilares e número de lesões observadas na pele²¹.

Em 1966, Ridley e Jopling 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 pelos dimorfos, subdivididos em

borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatoso (BL)²² (figura 3).

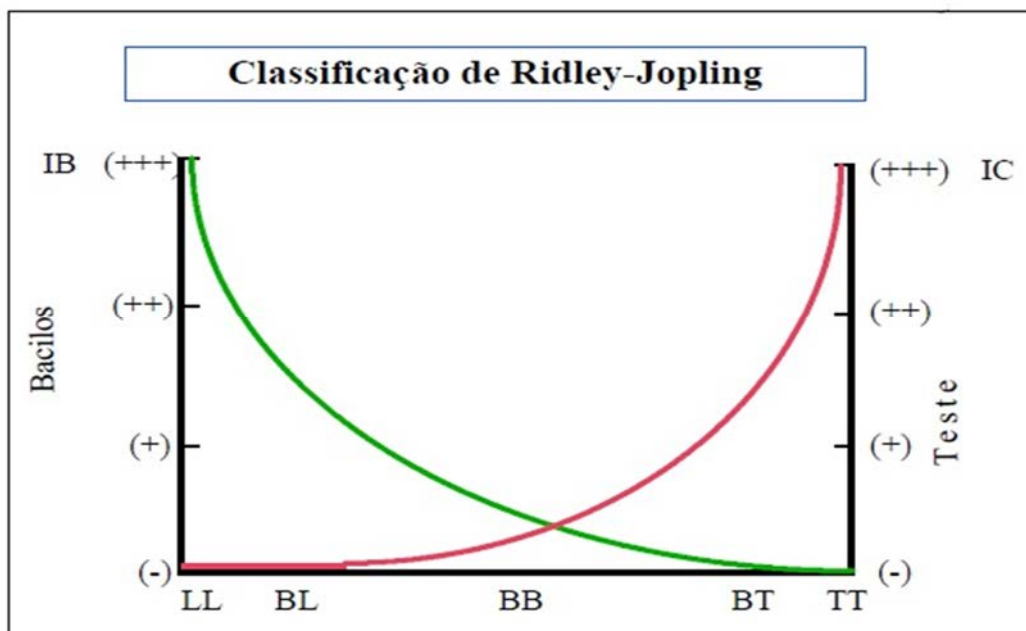


Figura 3: Espectro clínico da hanseníase: a imunidade celular (IC) medida pelo teste de Mitsuda é inversamente proporcional à carga bacilar, medida pelo índice baciloscópico (IB). (Goulart, 1995¹⁶. Adaptado de Harboe, 1985²¹). TT - forma polar Tuberculóide (estável); LL - forma polar Virchowiana ou Lepromatosa (estável); BT, BB e BL - Grupo Borderline (Instável). Fonte: Goulart, 2002²³.

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*²³. Os pacientes com hanseníase tuberculóide possuem uma resistência 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 frequente²⁴.

Já em relação aos pacientes com hanseníase lepromatosa, apresenta-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^{23,24}.

Em 1981, a OMS (Organização Mundial de Saúde) para efeito de tratamento da doença, principalmente em países com sistema de saúde precário, alocou todos os pacientes em dois grandes grupos de acordo com o número de lesões de pele: os multibacilares (MB) com mais de cinco lesões, que inclui o polo lepromatoso (LL), borderline-lepromatoso (BL) e borderline-boderline (BB), e os paucibacilares (PB) com menos de cinco lesões de pele, incluindo as formas indeterminada (I), tuberculóide (TT) e borderline-tuberculoide (BT)²⁵.

1.5. Diagnóstico clínico e laboratorial da hanseníase

O diagnóstico da hanseníase é clínico-epidemiológico e laboratorial. Em regiões de alta endemicidade cujos recursos laboratoriais são escassos e ou inexistentes, o diagnóstico passa a ser essencialmente clínico baseado nos sinais e sintomas, no exame da pele, dos nervos periféricos e na história epidemiológica. Sendo assim, os sinais cardinais da hanseníase são as áreas anestésicas, os nervos espessados e as lesões cutâneas^{26,27}.

Em muitos serviços, o exame baciloscópico para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) é utilizado para confirmação diagnóstica e auxílio na classificação. 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 requerer pelo menos 10^4 organismos por grama de tecido para detecção confiável, o que torna sua sensibilidade baixa, particularmente nos pacientes com forma tuberculóide da doença, nas quais os bacilos são raros ou ausentes²⁸.

Outras abordagens diagnósticas alternativas vêm sendo utilizadas por meio de alguns antígenos exclusivos do *M. leprae*, como o PGL-1, presente no envoltório da bactéria 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 (*“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 crianças²⁹.

Bührer e Col.³⁰ descreveram um teste capaz de detectar anticorpos anti-PGL-1 no sangue de pacientes hansênicos 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.

A impossibilidade de cultivo do *M. leprae* em meio de cultura axênico complica muito o desenvolvimento de ensaios laboratoriais que visam 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 clínicas³¹.

No final da década de 80 a tecnologia da hibridação por *Southern Blotting*, utilizando sondas de DNA específicas do *M. leprae*, permitiu a detecção do bacilo em material de pacientes multibacilares (MB)³². Apesar da alta especificidade, a técnica não se mostrou sensível o suficiente para detectar o bacilo em amostras de tecido de pacientes paucibacilares (PB). Dessa forma, a técnica de PCR passou a ser utilizada como método de suporte alternativo às metodologias tradicionais de diagnóstico da doença uma vez que possui alta especificidade e sensibilidade³³.

Nos últimos anos, vários pesquisadores têm utilizado a PCR para o desenvolvimento de diferentes sistemas de amplificação de várias sequências genômicas de *M. leprae*, visando aumentar o limite de detecção, principalmente quando um número baixo de bactérias estão presentes^{34,35,36,37,38,39,40}. Desse modo, inúmeras metodologias para a detecção de *M. leprae* em amostras clínicas foram descritas^{41,42} e muitos estudos envolvendo sistemas simples e específicos foram padronizados para amplificação de regiões gênicas que codificam para o antígeno de 36-kDa⁴³, de 18-kDa⁴⁴ ou de 65-kDa³⁴, assim como para outras sequências repetitivas⁴⁵ do *M. leprae*.

1.6. Distribuição Global da Hanseníase

A OMS desde 1991 busca atingir a meta de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, estipulada como a prevalência de um doente para cada 10.000 habitantes⁴⁶. Em 2007 a prevalência global de hanseníase registrada foi de 224.717 casos, número 13,2% menor que o registrado em 2006. A queda significativa da prevalência deu-se com a implementação da poliquimioterapia (PQT) como tratamento padronizado e com a alta por cura, em contraste com o tratamento com dapsona (DDS) por toda a vida do paciente como era feito até 1982⁴⁷.

Em 2011, foram detectados 219.075 novos casos com uma prevalência registrada de 181.941 casos no início de 2012, sendo as Américas o segundo território com o maior número de casos notificados⁴⁸.

A estratégia para o controle da hanseníase no Brasil é baseada em duas atividades principais: o tratamento precoce e o tratamento de todos os casos com a poliquimioterapia (PQT)⁴⁹.

Leprosy prevalence rates, data reported to WHO as of January 2012

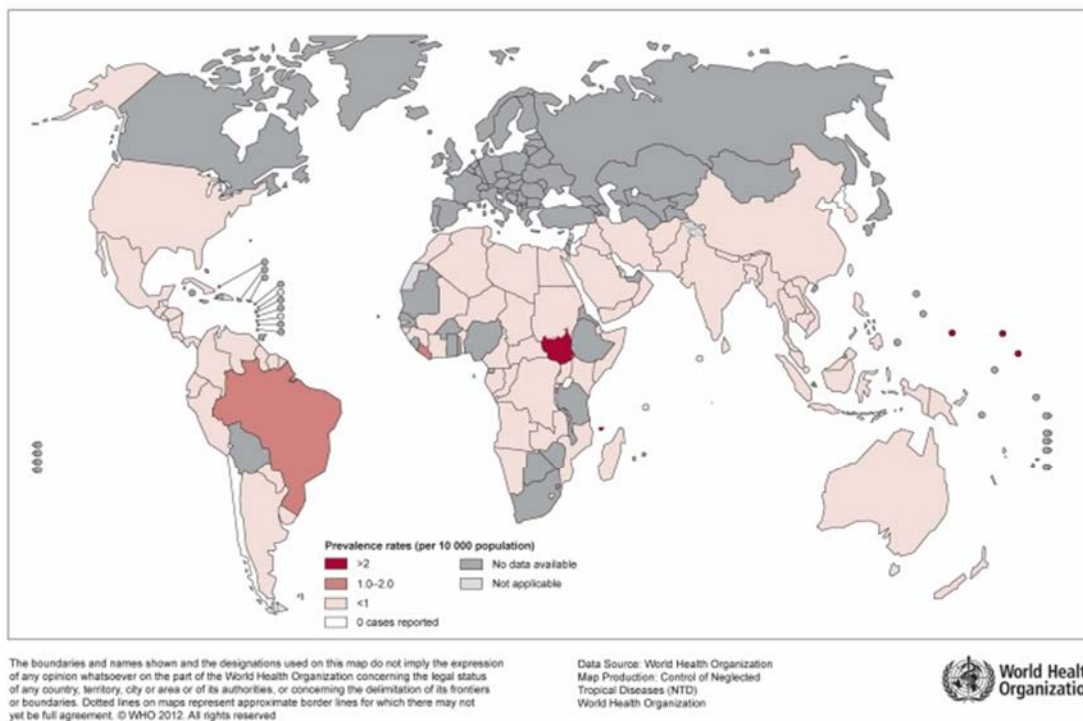


Figura 4: Números de novos casos detectados no mundo em 2012. Fonte: World Health Organization, 2012⁵⁰.

O Brasil tem 5.560 municípios, 26 Estados e um Distrito Federal com uma população estimada de 190.732.694 habitantes em 2010 e uma área de 8.514.876 Km². É dividido em cinco regiões geográficas com base nos aspectos climáticos e históricos: norte, nordeste, sudeste, sul e centro-oeste⁵¹.

No Brasil, a Hanseníase apresenta uma tendência de estabilização nos coeficientes de detecção, mas ainda em níveis muito altos nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste, principalmente nos estados que compreendem a Amazônia Legal. Nessas regiões de extensa área geográfica encontram-se apenas 17,5% da população brasileira concentrando 53,5% dos novos casos detectados. Determinantes sociais e históricos, associados à ocupação da Amazônia Legal e à manutenção de iniquidades sociais na região Nordeste ajudam a explicar o acúmulo de pessoas infectadas, em se tratando de doença de longo período de incubação^{52,53}.

Por volta do século XIX, a hanseníase no Brasil, foi considerada endêmica em várias regiões, como Minas Gerais, Espírito Santo, Maranhão, São Paulo e Mato Grosso⁵⁴, mas atualmente, os Estados que apresentam as mais altas taxas de detecção e evolução desfavorável da endemia, localizam-se nas regiões Norte e Centro Oeste, o que evidencia uma desigual evolução regional, sugerindo a existência de contextos geográficos de diferentes vulnerabilidades à produção social da hanseníase⁵⁵.

Um dos estados com maior número de casos de hanseníase encontra-se no estado do Mato Grosso, sendo a primeira identificação de casos relatada poucos anos após a criação da sua Capitania. No ano de 1773 o *Anal* de Vila Bela da Santíssima Trindade – capital de Mato Grosso naquele período – relata um caso de hanseníase⁵⁴.

Enquanto alguns estados da Região Sudeste, exceto Espírito Santo, alcançaram a meta de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, o estado do Mato Grosso apresenta um alto coeficiente de prevalência, sendo classificado como o estado mais endêmico, com 81,6 casos novos por 100 mil habitantes em 2010⁵⁶.

Em 2011, o Mato Grosso apresentou a maior taxa de incidência de hanseníase no Brasil. Segundo dados do Ministério da Saúde foram contabilizados 77,89 casos/ 100 mil habitantes⁵⁷.

Localizada no Estado do Mato Grosso, Rondonópolis é considerado um dos municípios altamente endêmico, com uma média de 11,1 casos a cada 10 mil habitantes, registrados pela Secretaria Municipal de Saúde, sendo 186 casos novos em 2006 e 164 casos novos em 2011^{58,59}.

O município de Rondonópolis está posicionado junto ao entroncamento da BR-163 com a BR 364, a 210 km da capital do Mato Grosso. É considerada cidade-pólo do agronegócio para o sul do estado, atendendo 19 municípios. Com quase duzentos mil habitantes, a cidade tem crescido graças ao grande fluxo de migrantes vindos de outras partes do país, principalmente do sul e sudeste, em decorrência das atividades de pecuária, agricultura e indústria⁵⁹.

O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) é maior que a média estadual (0,79), mas a desigualdade econômica ainda é muito alta (Índice de Gini=0,45)⁶¹.

Em relação aos serviços de saúde, Rondonópolis está entre os 100 municípios com maior cobertura do Programa de Saúde da Família (PSF), sendo o primeiro colocado na cobertura percentual do PSF e no Programa de Saúde Bucal no estado. O suporte para o serviço de Saúde da Família é realizado por cinco Centros de Saúde, uma Policlínica, um Laboratório de Análises Clínicas, um Laboratório de Manipulação de Medicamentos, três Centros Odontológicos, uma Clínica do Bebê, uma Clínica de Fisioterapia, um Centro de Regulação Municipal/Regional, uma Unidade de Terapia Renal Substitutiva, um Centro de Oncologia, três Centros de Atenção Psico-Social, um Pronto Atendimento de Baixa e Média Complexidade, um Centro Regional de Especialidades e Serviço de Apoio Móvel de Urgência⁶².

1.7. Variação Genômica do *Mycobacterium leprae*

O genoma do *M. leprae* compreende 3.268.203 pares de base (pb), com um conteúdo de G+C de 57,8%, quando comparado com o genoma do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que possui 4.411.532 pares de bases e um conteúdo de G+C de 65,61% (tabela 1)⁶⁴. Seu genoma é o menor e também o mais rico em conteúdo A+T do que qualquer outra micobactéria conhecida. Outro aspecto importante, é que somente 165 genes aparentemente funcionais não possuem ortólogo com o *M. tuberculosis* e podem estar envolvidos na patogenicidade espécie-específica do agente etiológico da hanseníase⁶⁵.

Tabela 1: Comparação das características dos genomas

Características	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tamanho do genoma (pb)	3,268,203	4,411,532
G+C (%)	57,79	65,61
Proteínas codificadas (%)	49,5	90,8
Genes de proteínas codificadas (no.)	1,604	3,959
Pseudogenes (no.)	1,116	6*
Densidade do gene (pb por gene)	2,037	1,114
Comprimento médio do gene (pb)	1,011	1,012
Comprimento médio de gene desconhecido (pb)	338	653

*Excluindo elementos IS - Fonte: Cole et.al, 2001⁶⁴.

Somente após o sequenciamento do genoma, foi observado que o *M. leprae* sofreu extensa evolução redutiva e muitos genes e funções associadas foram perdidos por meio do encolhimento do genoma e de genes decadentes, possivelmente devido a uma mudança drástica no estilo de vida livre, como observado na maioria das micobactérias, em relação ao hospedeiro associado⁶⁵.

Dessa forma, a dificuldade de crescimento *in vitro* do *M. leprae* pode estar relacionada aos efeitos combinados de mutações e redução dos genes em várias vias metabólicas. Essas mutações são encontradas nos genes envolvidos na regulação, detoxificação, reparo do DNA e no transporte ou fluxo de metabolitos. Por sua vez, a redução de genes pode ser observada em todas as categorias, sendo mais notáveis em sequências de inserções e em proteínas que conferem a variação antigênica¹⁰.

Importante destacar que evolução redutiva foi também relatada em outros patógenos intracelulares obrigatórios, tais como *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Rickettsia spp.* e em *Mycobacterium ulcerans*, um parente próximo do *M. leprae* presente em ecossistemas aquáticos, causador da úlcera de Buruli em humanos⁶⁶.

Com 50% do genoma aparentemente desprovido de função, o *M. leprae* tem a maior proporção de pseudogenes, em torno de 1.116, quando comparado com outras bactérias patogênicas e não patogênicas^{63,67}.

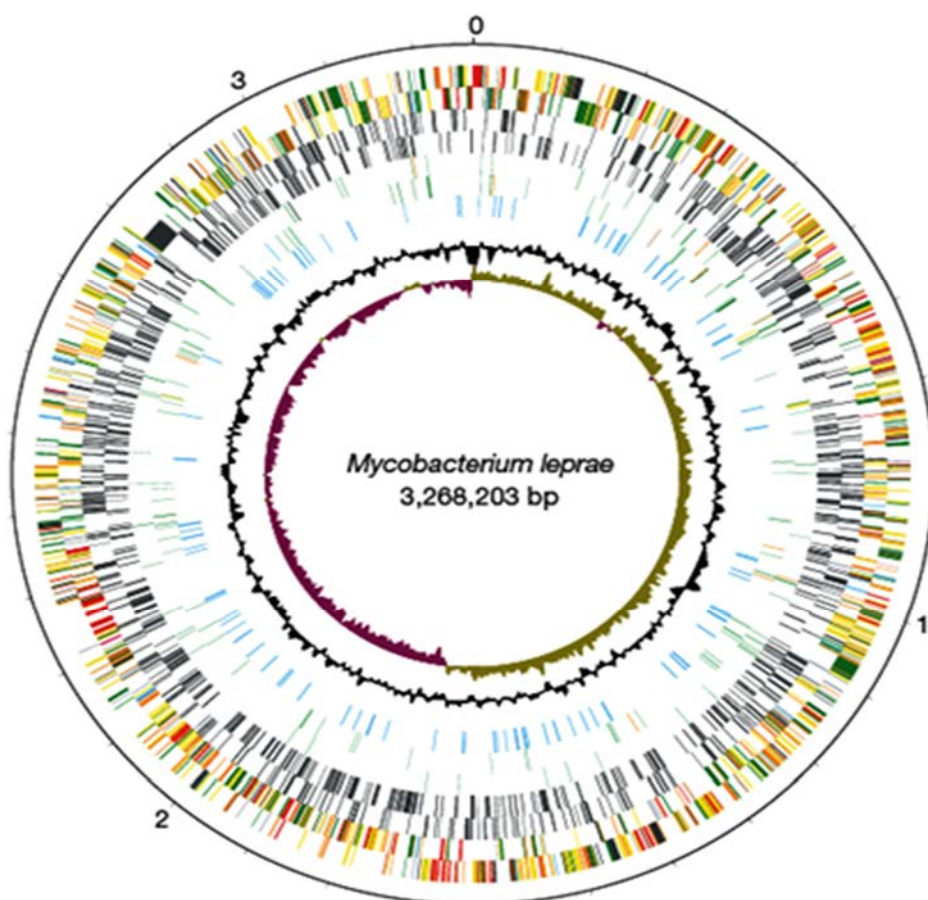


Figura 5: Genoma circular de *M. leprae*.. De fora para dentro: círculos 1 e 2 (sentido horário e anti-horário) genes das fitas – e +, respectivamente; círculos 3 e 4 pseudogenes; 5 e 6 genes específicos de *M. leprae*; 7 sequências repetitivas; 8 conteúdo G+C; 9 (G+C)/(G-C) desvio do conteúdo G/C. Ver http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae ou <http://genolist.pasteur.fr/Leproma/> para informações adicionais. Fonte: Cole e Col, 2001⁶³.

Na década de 1990, as estratégias baseadas em DNA haviam sido introduzidas com a finalidade de detectar variação genotípica. Estes métodos incluíam o *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), a tipagem de loci como os operons de rRNA⁶⁸, genotipagem por *Randomly primed PCR*⁶⁹, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE)⁷⁰ e *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST)⁷¹. Com a finalidade de compreender melhor a transmissão e epidemiologia da hanseníase, vários investigadores têm procurado marcadores polimórficos dentro do genoma de *M. leprae*, com o objetivo de desenvolver sistema sólido de tipagem molecular⁷².

Dessa forma, vários estudos têm impulsionado pesquisas por métodos de diferenciação entre isolados de *M. leprae* utilizando repetições em *tandem* de número variável⁷³. A duplicação em tandem de segmentos cromossômicos foi

reconhecida como um mecanismo frequente de mutações em vários sistemas de modelos genéticos. Em bactérias, moscas de fruta e humanos, essas formas de duplicação por semelhantes mecanismos moleculares parecem ser importantes na evolução do genoma⁷⁴.

As bactérias podem constituir modelos poderosos para abordar aspectos evolutivos e seus mecanismos de variabilidade por meio das repetições em *tandem* em escala genômica, sendo intercalados pequenos elementos repetitivos. Estas sequências são normalmente curtas, menos de 200 pb de comprimento, muitas vezes, distribuídas por todo o cromossoma bacteriano^{75,76}.

Recentes avanços na genotipagem de bactérias, baseados na inserção e deleção de DNA, SNP e outras estruturas polimórficas de DNA, tais como *Short Tandem Repeat* (STR), revolucionaram a compreensão das origens da doença e migração, assim como a resistência às drogas e sua propagação⁷⁷.

Neste contexto, os microsatélites (2 a 5pb) e os minissatélites (6 a 100pb), atualmente encontrados no genoma de muitas bactérias vêm sendo utilizados para melhor compreensão da transmissão de muitas doenças, pois em virtude de seu excelente polimorfismo, são responsáveis pela definição da diversidade genética entre as cepas^{78,79}.

A exemplo disto, a descrição de pequenas repetições de 6 nucleotídeos no gene *rpoT*, em diferentes isolados de *M. leprae* permitiu a identificação de 3 repetições desse gene em cepas provenientes do Japão, Coréia e Brasil, e em isolados do Haiti e Okinawa 4 repetições. Essas repetições foram inicialmente consideradas úteis para demonstrar relações entre populações e sua origem⁸⁰.

Esforços para identificação de repetições mais variáveis foram realizados em um estudo conduzido por Shin e Col.⁸¹, que descreveram uma sequência de 3 nucleotídeos, denominada TTC, altamente polimórfica, localizada em regiões intergênicas do *M. leprae* e apresentando uma variação de 10 a 37 repetições em diferentes cepas estudadas⁸¹.

Groathouse e Col.⁷⁸ em 2004 descreveram 9 loci polimórficos em regiões intergênicas ou em pseudogenes, que foram identificados pelo *Multiple-locus VNTR Analysis* (MVLA) como potenciais marcadores para o desenvolvimento de uma metodologia de tipagem molecular para *M. leprae*.

A importância da realização de estudos epidemiológicos que levassem a uma maior compreensão da dinâmica de transmissão da hanseníase ampliou a busca

pela identificação de outros elementos polimórficos, visando à elaboração de uma metodologia de tipagem mais informativa, reprodutível, de fácil interpretação e ainda com a possibilidade de aplicação em grande escala para caracterização da distribuição global dos diferentes genótipos^{82,83}.

Dessa forma, a evidente constatação de estudos anteriores de que um painel de 5 loci STRs ainda seriam insuficientes para discernir parentesco entre as cepas⁷², levou a realização de estudos com a análise de 44 loci pela metodologia de MLVA visando a identificação de um número maior de marcadores polimórficos^{83,84}.

Neste contexto, Kimura e Col. definiram 15 loci STRs (micro e minissatélites) mais promissores para estudos em regiões endêmicas, dos quais foram distribuídos em quatro combinações para realização de PCR multiplex. A amplificação de diferentes STRs ocorreu por meio de oligonucleotídeos marcados com fluoróforos, permitindo que o número de cada repetição fosse determinado pelo *Fragment Length Analysis* (FLA)⁸³.

Assim, estudos foram realizados na Tailândia, China e Filipinas, utilizando a metodologia de MLVA com a finalidade de comprovar a utilidade desta ferramenta para tipagem de cepas com a função de traçar rotas de transmissão da doença, investigar a distribuição dos genótipos circulantes em cada área estudada e constatar sua adequação para estudos epidemiológicos^{85,86}.

2.0. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Caracterizar a diversidade genética entre os isolados de *M. leprae* de pacientes com hanseníase do Município de Rondonópolis (MT).

2.2. Objetivos específicos

- Implantar a técnica de MLVA para caracterização dos diferentes STRs em isolados de *M. leprae* no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Lauro de Souza Lima.
- Identificar os marcadores genéticos mais apropriados para diferenciação dos isolados de *M. leprae* na população de Rondonópolis.
- Comparar os perfis da população de Rondonópolis (MT) com os perfis oriundos de diferentes regiões do país.
- Estabelecer possíveis relações epidemiológicas entre os pacientes estudados.

3.0. Casuísticas e Métodos

3.1. Casuística: Estudo de base populacional incluindo todos os casos novos de hanseníase sem tratamento e casos confirmados de recidiva atendidos por demanda espontânea no Centro de Saúde Jardim Guanabara ou referenciados pelas unidades de saúde locais do Município de Rondonópolis (MT) no período de julho de 2007 a julho de 2010. Todos os casos suspeitos foram submetidos à avaliação dermatoneurológica e a classificação clínica dos casos de acordo com os critérios Ridley & Jopling¹⁹. Um formulário clínico-epidemiológico foi preenchido visando a construção do banco de dados de casos novos de hanseníase. (Anexo 1)

Critérios de inclusão: (1) pacientes que receberam o diagnóstico clínico e bacteriológico de hanseníase e (2) que aceitaram o convite para a participação no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Critérios de exclusão: (1) pacientes que não tenham sido submetidos aos exames do protocolo de rotina de investigação diagnóstica ou (2) que se recusaram a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2. Coleta das biópsias: Um total de 260 biópsias de pele foram coletadas e armazenadas em microtubos de 2 ml com 500 µl de RNAlater e transportadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Lauro de Souza Lima. As biópsias foram estocadas a -20°C, até o momento do seu processamento.

3.3. Extração de DNA de biópsias de pele: As biópsias de pele foram submetidas a extração de DNA utilizando o *kit* DNeasy Tissue - QIAGEN que proporciona um rápido isolamento do DNA genômico. Para maior conveniência e menor tempo de manipulação, as células foram lisadas diretamente com a proteinase K do *kit*, sem a necessidade de uma extração orgânica ou precipitação com etanol. Após a lise, o DNA foi purificado em apenas 20 minutos. O protocolo de extração seguiu as orientações do fabricante (QIAGEN).

3.4. Multiple-locus VNTR Analysis (MLVA): Repetições em *tandem* de número variável, presentes em pseudogenes ou segmentos intergênicos do genoma de *M. leprae*, foram separadas em 4 diferentes combinações para análise por PCR

multiplex: **Combinação 1** (AC8b, GTA9, GGT5, AT17, 6-3a), **Combinação 2** (21-3, AC9, AT15, AC8a), **Combinação 3** (27-5, 6-7, TA18, TTC21) e **Combinação 4** (18-8, 12-5, 23-3, TA10). Os *primers* marcados com diferentes fluoróforos (NED, PET, VIC e FAM) e não marcados foram reconstituídos em tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) para uma concentração de 100 µM. Foram feitas alíquotas estoque com 50 µl de cada *primer* e armazenadas a 20 °C. Alíquotas de trabalho foram preparadas de acordo com as combinações indicadas na Tabela 2 e ajustadas para um volume final de 200 µl com tampão TE, de modo que cada um dos *primers* ficasse na concentração de 2 µM.

Tabela 2: Combinações de *primers* utilizados na PCR *multiplex* dos 17 loci STRs.

Combinações PCR <i>multiplex</i>	Loci	Primer senso	Primer Antisenso	Tamanho do fragmento (pb)
1	(AC)8b	VIC-GCCCACTTACCTCAACCAAC	CCTATAACGGCACTCAGTCCA	390
	(GTA)9	NED-AGCCTTAGTCGCGCAGATG	TCCGCTGTCCGTCCGCTGA	307
	(GGT)5	6FAM-GCAGCGGTGTAACAGCATAGC	TGTCTGCCTTGCGAAACGGTC	242
	(AT)17	PET-TCTCCAACATGCTGCGACA	GTACAGCGGCCTGATCGAA	181
	6-3 ^a (rpoT)	VIC-ATGCCGAACCGGACCTCGACGTTGA	TCGTCTTCGAGGTCGTCGAGA	91
2	21-3	6FAM-GAATCTGACCTTTCGAAATG	CGATGCAGCTTCCTACGG	312
	(AC)9	NED-AGCGCCCGTTGTGCGATAGA	GACTGGATGTCGGCACCCC	236
	(AT)15	PET-CAATATGCGGGTTGGCGCTTCTG	CCGTCTGGCTCGATGGCTGGATTC	168
	(AC)8a	VIC-GTGTTACGCGGAACCAGGCA	CCATCTGTTGGTACTACTGA	124
3	27-5	6FAM-ATTGAGCAGATGGCCGGTC	AGCAGTCGGCACGCCCTT	327
	6-7	VIC-GCCATCGTTGTCGGTTCATC	CGGAGGAGGTGGGTACGGT	268
	(TA)18	NED-CGTGCGTCGTGTGTAGGC	GACGTGGCAACATCGAAGTT	230
	(TTC)21	PET-CTACAGGGGGCACTTAGCTC	GGACCTAAACCATCCCGTTTT	201
4	18-8	PET-GCCCGTCTATCCGCATCAA	GCAAAGATCAGCACGCCAAT	348
	12-5	VIC-CTGGTCCACTTGCGGTACGAC	GGAGAAGGAGGCCGAATACA	289
	23-3	6FAM-CCGAAGCCCTGGACGAAG	GCCGTAAATCCGCTCCC	243
	(TA)10	PET-TAGATTCAAACGACCATGCA	CGCCTTTGTGCACTAATAGT	185

Fonte: Kimura, 2009⁸³.

3.5. Amplificação STRs utilizando PCR *multiplex*: A PCR *multiplex* foi realizada utilizando o “*Multiplex PCR Kit*” (Qiagen). Cada reação tinha um volume final de 25 µl, compreendendo 12,5 µL de *Máster Mix* na concentração (2X), 2,5 µL de *mix* dos *primers* na concentração de 2 µM de cada, 2,5 µL de Q-solution 5x e Água RNase free q.s.p. (QIAGEN *Multiplex PCR kit*) finalizando com 1, 2 ou 3 µL do DNA alvo conforme o índice baciloscópio da amostra. A PCR foi realizada em um termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*) nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 95°C por 15 minutos, seguida por 40

ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos, 72°C por 90 segundos e uma extensão final de 30 minutos a 72°C. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose 3%.

3.6. Fragment Length Analysis (FLA): Após a amplificação, 1 µl do produto da PCR foi diluído nas concentrações de 1:30 para amostras paucibacilares e 1:60 para as multibacilares. A seguir 1 µl do produto diluído foi misturado com 12 µl de formamida Hi-Di e 0,3 µl do marcador *GeneScan LIZ-500*. Todas as amostras foram então desnaturada a 94° C por 5 minutos e submetidas à eletroforese de capilar. As amostras foram submetidas ao sequenciador automático ABI 3130 quando injetadas nos capilares de 36 cm com polímero POP-7 em voltagem de 1kV por 22s. A corrida eletroforese de capilar foi realizada em voltagem de 15 kV a 60°C por 45min. Após a separação, os eletroferogramas foram visualizados e analisados no software *Peak Scanner (Applied Biosystems)*, conforme figura ?.

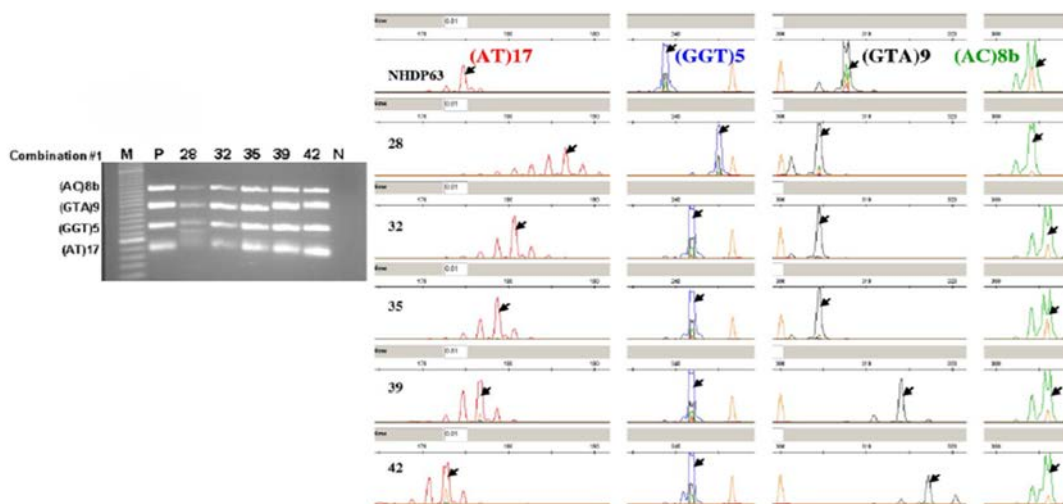


Figura 6: Representação do gel de agarose e análise por FLA de 15 loci STRs amplificados de isolados clínicos usando o conjunto de *primers* da combinação 01. Fonte: Kimura, 2009⁸³.

3.7. Análise de resultados: O número de repetições encontrado em cada locus, em formato de tabela excel, foi introduzido no programa de computador *Bionumerics (Applied Mathematics, Bélgica)* por meio de um protocolo chamado de “*Open Database Connectivity*” (OBDC). Posteriormente, foram criados matrizes de similaridade, dendogramas e árvores filogenéticas utilizando índice de similaridade calculado pelo coeficiente categórico e os algoritmos “*Unweighted Pair Group*

Arithmetic Averages” (UPGMA), “*Neighbor-Joining*” (N-J) e “*Maximum parcimony Tree*”.

3.8. Método de Georeferenciamento: As coordenadas (latitude e longitude) exata dos endereços de residência dos pacientes no município de Rondonópolis (MT), foram plotadas no *Software Google Earth* (earth.google.com) de livre acesso. Essas informações foram transferidas para um programa chamado “Conversor DICAM/DNPM”, que transforma todos os dados em números para serem transferidos para o *Geographic module* no *Software Bionumerics* (*Applied Mathematics*, Bélgica). Em seguida as coordenadas foram novamente plotadas *Software Google Earth* e visualizadas no *Google Maps* (maps.google.com), onde utilizamos cores para identificar e visualizar a distribuição e localização das variáveis (setores administrativos, classificação operacional, sexo, genótipos de SNP e STRs versus genótipos de SNP) no município.

3.9. Genotipagem dos *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP): Para a diferenciação de tipos de SNP 1/2 de 3/4 e caracterização dos tipos 3 e 4, foi utilizado a técnica de PCR-RFLP como descrito por Sakamuri e Col⁷⁶. Resumidamente, foi realizada a amplificação das amostras utilizando o *Multiplex PCR Kit* (Qiagen) sendo que cada reação tinha um volume final de 20µL: 10µL de *Máster Mix Qiagen Multiplex* na concentração (2X), 0,5 µL do *primer forward*, 0,5µL do *primer reverse*, 2,0 µL de Q-solution (5X), 4,0 µL de Água RNase free e 3 µL do DNA alvo. A PCR foi realizada em um termociclador *T-Gradient Thermoblock* (Biometra) nas seguintes condições de temperatura: temperatura inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos de 45 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minuto e 72°C por 2 minutos, finalizando com a temperatura de extensão de 72°C por 10 minutos.

Tabela 3: Conjunto de *primers* dos SNPs

SNP (posição)	<i>Primers</i>
SNP2935685	(senso) 5'ATC TGG TCC GGG TAG GAA TC 3' (anti-senso) 5' ACC GGT GAG CGC ACT AAG
SNP15676	(senso) 5' AAT GGA ATG CTG GTG AGA GC 3' (anti-senso) 5' CAA TGC ATG CTA GCC TTA ATG A 3'
SNP1642875	(senso) 5' TGC TAG TTT AAC CGA GTA CTG CTA 3' (anti-senso) 5' GTA GTA GTC TTC CAA GTT GTG GTG 3'

Digestão Enzimática: a diferenciação entre os tipos 1/2 de 3/4 foi obtida pela análise de restrição da posição 2.935.685, por meio da incubação de 5 µl de produto de PCR com 5 unidades de enzima BstUI (New England Biolabs, Beverly, MA) a 60°C, durante 1 hora. Após a análise em gel de agarose a 3%, a digestão gerando um fragmento de 153 pb indica genótipo 3 ou 4, enquanto que a não digestão (fragmento de 194 pb) significa a presença do genótipo 1 ou 2. Para uma maior diferenciação dos genótipos 3 e 4, uma análise de restrição na posição 14676 com 5 ul do produto de PCR, foi realizada incubando com 5 unidades de enzima Sml I durante 1 hora a 55° C, sendo que a digestão gerando um fragmento de 150 pb indica genótipo tipo 4, enquanto a não digestão para o tipo 3 (fragmento de 180 pb). Finalmente, o produto amplificado para detecção de polimorfismo na posição 1.642.875, sendo SNP tipo 1 ou 2 foi purificado utilizando o *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, o material foi submetido à reação de sequenciamento, precipitado e sequenciado no sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). A mudança de nucleotídeos foi analisada através do programa *Sequencing Analysis* V5.3.1 (Applied Biosystems), onde genótipo 1 é definido quando o mononucleotídeo G estiver presente na posição 16422875 pb; genótipo 2 é definido quando há a presença do mononucleotídeo T.

4. 0. Resultados

4.1. População estudada

No período de 2007 a 2010 foram diagnósticos um total de 810 pacientes com hanseníase no município de Rondonópolis (MT).

Para o estudo em questão, recebemos um total de 260 biópsias de pacientes com hanseníase diagnosticados no Centro de Saúde Jardim Guanabara, representando 32% do número total de pacientes diagnosticados com hanseníase no período.

Utilizando-se dos critérios de proximidade entre bairros e das unidades de saúde, o município foi dividido em 12 setores pela Secretária do Meio Ambiente (Anexo 2).

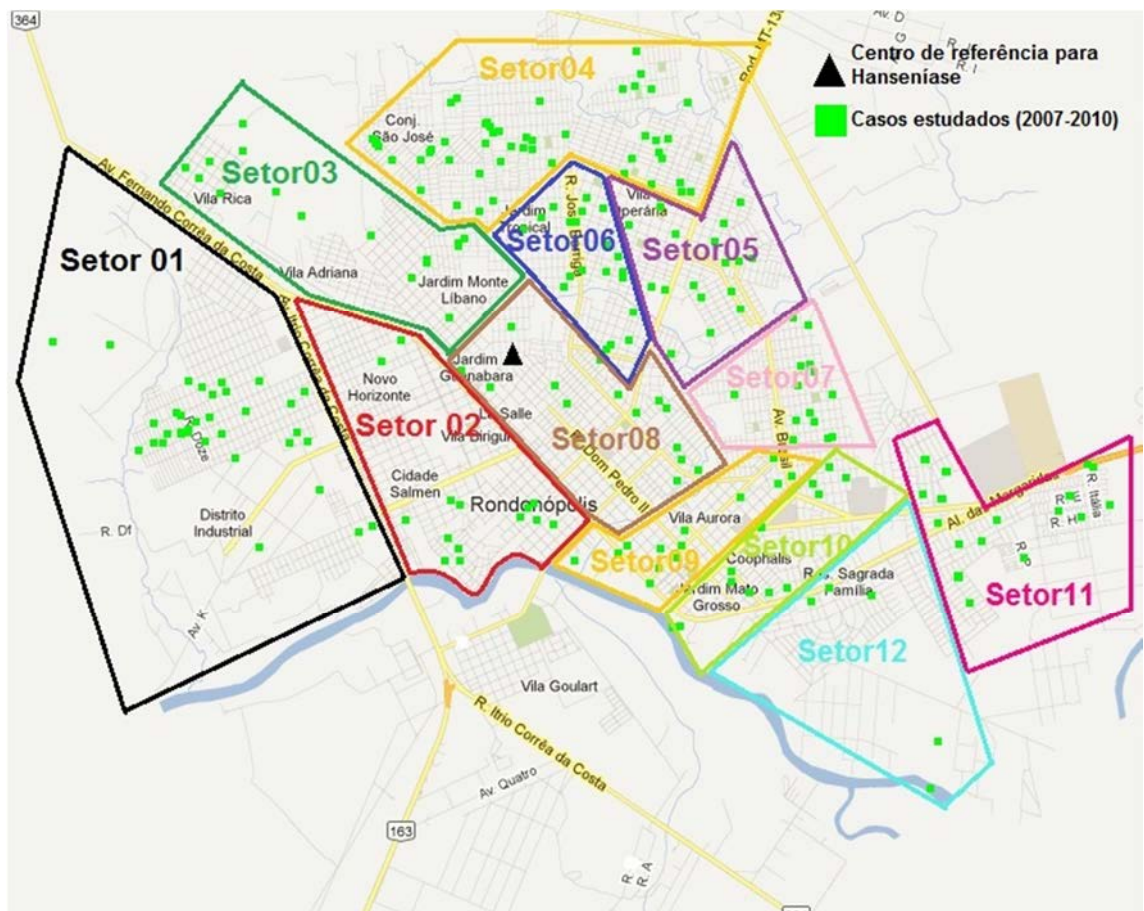


Figura 7: Mapa da divisão político-administrativa do Município de Rondonópolis(MT)

Os 260 pacientes avaliados neste estudo, estavam distribuídos em 106 bairros do município de Rondonópolis (MT). Desses, 12 casos foram identificados como área rural no formulário clínico-epidemiológico, dificultando portanto sua

identificação no mapa. A tabela 4 mostra a distribuição do número de casos analisados neste estudo por setores.

Tabela 4 : Distribuição dos número de bairros e de casos por setores.

Setores	Nº de bairros	Nº de casos
Setor 01	13	46
Setor 02	06	12
Setor 03	12	32
Setor 04	15	28
Setor 05	11	26
Setor 06	12	24
Setor 07	09	16
Setor 08	03	05
Setor 09	05	13
Setor 10	07	27
Setor 11	09	15
Setor 12	02	04
TOTAL	104	248

12 casos identificados como zona rural foram excluídos da tabelas

Na população estudada 137 (53%) pacientes eram do sexo masculino e 123 (47%) do sexo feminino, sendo sua distribuição melhor visualizada na figura 8. A média da idade dos pacientes no sexo feminino foi de 41,5 anos e no sexo masculino 40,7 anos.

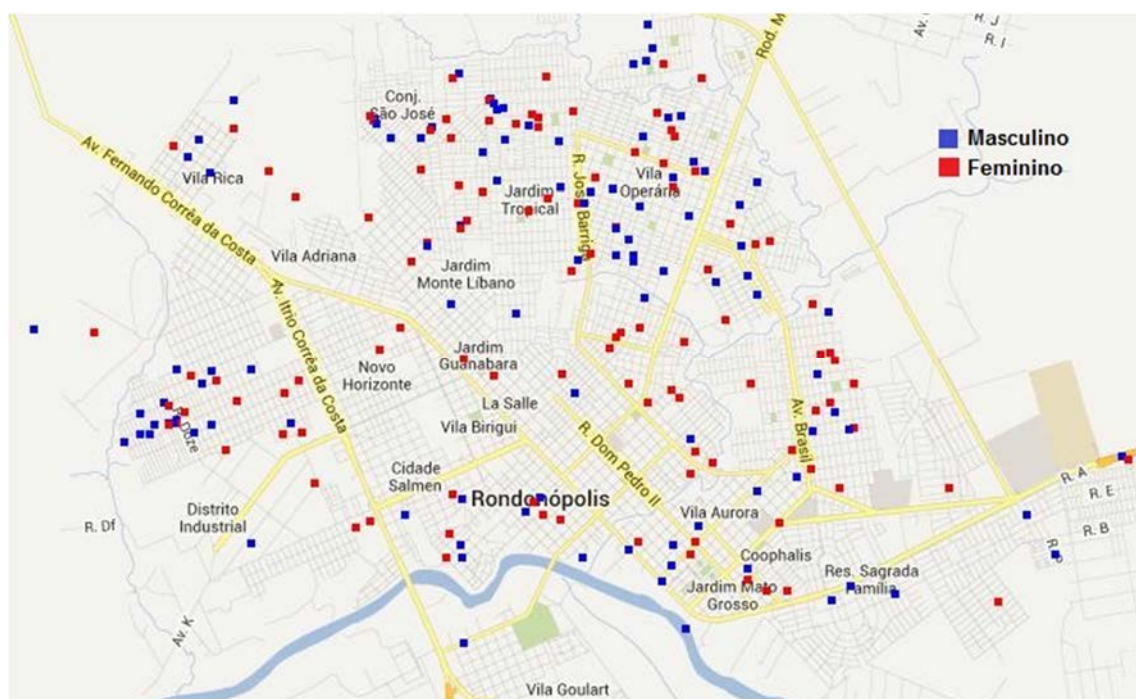


Figura 8: Distribuição do por sexo dos casos diagnosticados com hanseníase no município de Rondonópolis.

Em relação à forma clínica da doença, observamos de acordo com a classificação de Ridley & Jopling¹⁹ um predomínio das formas TT (39%) e BT(33%), seguido de BB (19%), BL (5%), LL (3%) e I(1%) (tabela 5).

Tabela 5: Casos de hanseníase diagnosticados no período de 2007 a 2010

Classificação	Jul/2007	Jul/2008	Jul/2009	Jul/2010	TOTAL
I	0	0	01	02	03
TT	41	11	29	21	102
BT	12	15	29	29	85
BB	17	04	15	12	48
BL	04	02	02	04	12
LL	03	0	03	03	09
Sem classificação	0	0	01	0	01
TOTAL	77	32	80	71	260

Classificação Ridley & Jopling¹⁹. I (indeterminado); TT (tuberculóide-tuberculóide); BT (borderline-tuberculóide); BB (borderline-borderline); BL (borderline-lepromatoso); LL (lepromatoso-lepromatoso).

Na tabela 6, é possível observar um discreto predomínio da forma TT (58%) para o sexo feminino. Observamos ainda um equilíbrio na forma BT para os dois sexos e predomínio da forma BB (25%) para o sexo masculino.

Tabela 6: Relação entre forma clínica e sexo no período de 2007 a 2010.

SEXO	FORMA CLÍNICA						
	I	TT	BT	BB	BL	LL	SC*
FEMININO	03 (2%)	58 (47%)	41 (34%)	14 (12%)	03 (2%)	03 (2%)	01 (1%)
MASCULINO	0	44 (32%)	44 (32%)	34 (25%)	09 (7%)	06 (4%)	0

Classificação Ridley & Jopling²². I (indeterminado); TT (tuberculóide-tuberculóide); BT (borderline-tuberculóide); BB (borderline-borderline); BL (borderline-lepromatoso); LL (lepromatoso-lepromatoso); SC (sem classificação)

A distribuição dos pacientes e sua localização, segundo a classificação operacional PB e MB, pode ser observada na figura 9.

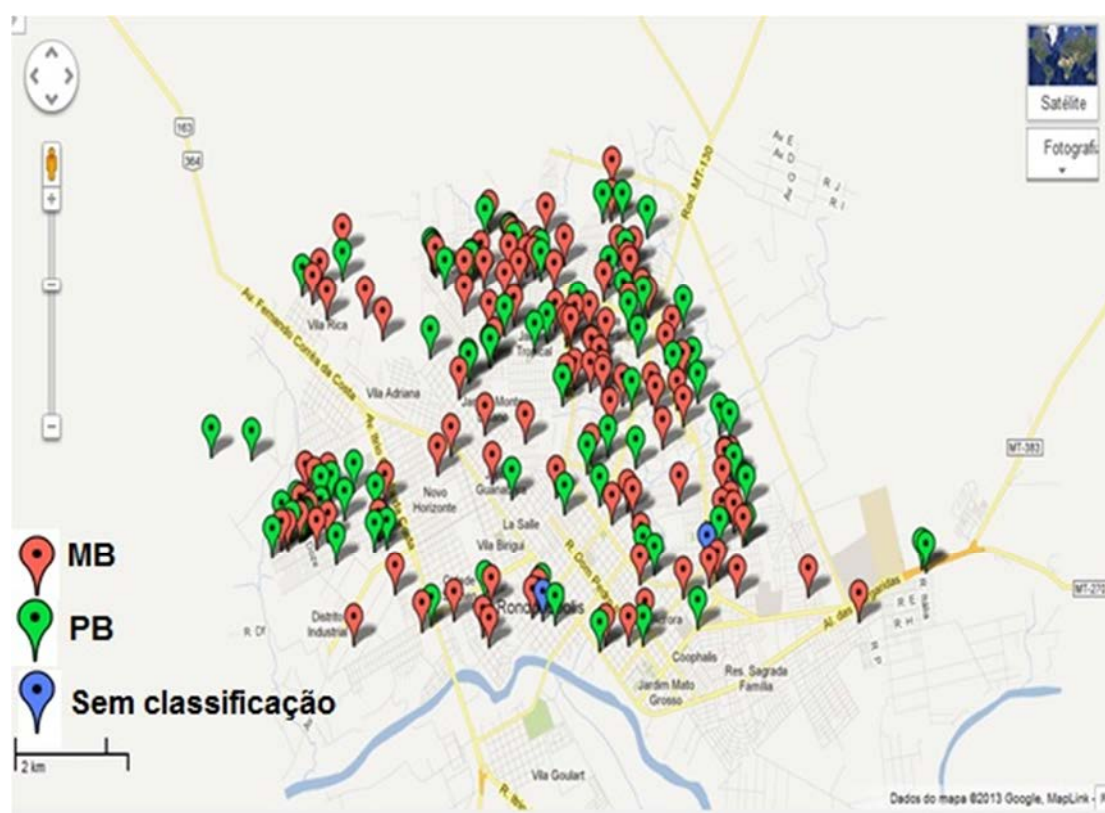


Figura 9: Distribuição de pacientes, segundo a classificação operacional da hanseníase.

Com base na divisão político-administrativa do município de Rondonópolis, observamos o predomínio das formas multibacilares nos setores 02, 03, 04, 06, 09 e 10 com discreto equilíbrio das formas multibacilar e paucibacilar nos setores 01, 05, 07, 09, 11 e 12 (tabela 7).

Tabela 7 : Distribuição por classificação operacional nos 12 setores

SETORES	PAUCIBACILAR	MULTIBACILAR
Setor 01	23	23
Setor 02	02	10
Setor 03	12	20
Setor 04	12	16
Setor 05	12	14
Setor 06	07	17
Setor 07*	07	08
Setor 08	01	04
Setor 09	04	09
Setor 10*	09	17
Setor 11	07	08
Setor 12	02	02

* Um caso sem classificação operacional.

4.2. MLVA: diversidade genética e estrutura populacional

Das 260 amostras submetidas ao sequenciamento, obtivemos um total de 150 amostras com perfil completo para os 17 STRs, sendo 4 sem classificação operacional, 93 de casos MB e 53 de casos PB com média de 2,73 e 0,39 + respectivamente no exame histopatológico do tecido. Em um total de 110 amostras não foram obtidos resultados na PCR multiplex e/ ou sequenciamento para 1 ou mais STRs, sendo que 69 amostras para 1 locus STR, 24 amostras para 2 loci STR, 11 para 3 loci STR e para 4 ou mais loci STR 6 amostras.

Os marcadores com número maior de amostras sem sinal no PCR *multiplex* e/ ou sequenciamento foram os loci (AT)15 e (AT)17, sendo que a grande maioria dessas amostras eram aquelas cuja classificação clínica foi TT ou BT variando de 0 a 2+ no exame histopatológico do tecido.

Na análise geral das 260 amostras para os 17 loci STRs avaliados pela técnica de MLVA, observamos que 15 STRs foram mais polimórficos, enquanto os loci 6-3a (1 alelo) e 21-3 (1 alelo) apresentaram-se invariáveis.

Quando observado o poder discriminatório dos diferentes STRs, uma alta diversidade alélica foi observada para os loci 6-7 que apresentou 6 (5 a 10 repetições), (AC)8a que apresentou 8 (6 a 13 repetições), (GTA)9 que apresentou 9 (7 a 17 repetições), TTC(21), AT(15), TA(18), (TA)10 e AT(17) que apresentaram 10 (8 a 23 repetições), 18 (7 a 25 repetições), 14 (10 a 23 repetições), 8 (6 a 13 repetições) e 12 (9 a 21 repetições) alelos diferentes respectivamente. Os STRs menos variáveis foram 27-5, (AC)8b, (GGT)5, (AC)9 e 12-5 com 4, 7, 4, 7 e 5 alelos respectivamente. O poder discriminatório foi determinado por *Simpson's Discriminatory Index*⁸⁷, e variou de 0,90 para AT(17) e 0 para 21-3 e 6-3^a (tabela 8).

Tabela 8: Tipos de alelos, frequência e diversidade alélica dos loci STRs de *M. leprae* em pacientes com hanseníase no município de Rondonópolis.

Locus	(GTA)9	(AT)17	(AT)15	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	(AC)8a
População	Rondonópolis (MT)						
Diversidade Alélica	0.67	0.90	0.85	0.86	0.75	0.72	0.67
Tipo de Alelo	7 03	9 06	7 02	10 2	8 1	6 02	6 03
(frequência)	8 13	10 63	8 02	11 2	9 1	7 05	7 03
	9 37	11 50	9 03	12 3	10 105	8 51	8 48
	10 136	12 40	11 04	13 17	11 28	9 37	9 131
	11 27	13 16	12 05	14 18	12 42	10 114	10 46
	12 16	14 39	13 04	15 36	13 16	11 36	11 16
	13 11	15 16	14 31	16 58	14 50	12 06	12 06
	14 07	16 02	15 57	17 48	15 07	13 01	13 03
	17 02	17 04	16 20	18 25	17 02	NA 08	NA 04
	NA 08	18 01	17 08	19 24	23 02		
		19 03	18 03	20 6	NA 06		
		21 01	19 08	21 5			
		NA 01	20 04	22 3			
			21 05	23 3			
			22 08	NA 10			
			23 06				
			24 05				
			25 01				
			NA 84				

Locus	(AC)8b	(GGT)5	(AC)9	27-5	6-7	12-5	18-8	23-3	SNP
População	Rondonópolis (MT)								
Diversidade Alélica	0.18	0.10	0.25	0.28	0.56	0.64	0.22	0.02	0.37
Tipo de Alelo	6 16	3 01	6 22	3 07	5 06	3 01	3 220	2 257	1 04
(frequência)	7 233	4 246	7 215	4 217	6 129	4 48	4 01	3 03	2 10
	8 09	5 12	8 12	5 34	7 104	5 115	8 31	NA 0	3 200
	NA 02	NA 01	NA 11	NA 02	8 03	4-5 86	NA 08		4 41
					9 01	NA 10		1ou2	02
					10 06			NA	03
					NA 11				

Loci 6-3 (3 alelos) e 21-3 (2 alelos) invariáveis. NA – não amplificadas
*Simpson's Discriminatory Index*⁸⁰

Dos 15 loci STRs, os mais polimórficos são os (AT)17, (TA)15, (TA)18, (TA)10 e o (TTC)21. O locus (AT)17 possui de 9 a 21 repetições, o (AT)15 com 7 a 25 repetições, o (TA)18 com 10 a 23 repetições, no locus (TA)10 de 6 a 13 repetições e no locus (TTC)21 com 8 a 23 repetições, sendo 10, 15, 16, 10 e 10 as repetições mais frequentes, respectivamente.

Utilizando-se da divisão por setores, quando analisamos somente os marcadores polimórficos, mais estáveis, como por exemplo (AC)8a, (GTA)9, (GGT)5, (AC)8b, (AC)9, 6-7, 27-5 e 12-5, observamos repetições mais predominantes em cada setor. No entanto o locus 6-7 foi o que apresentou pequenas variações em alguns setores com o predomínio em equilíbrio de 6 ou 7 repetições.

Dois loci mais conservados, apresentaram pequenas diferenças em alguns setores. O setor 8 apresentou uma variação no locus (AC)8a, diferindo em apenas uma repetição em relação aos demais setores e o locus (GTA)9 apresentou diferença de uma repetição nos setores 9, 10 e 12 (tabela 9).

Tabela 9: Repetições predominantes por setores.

Setores	Nº de repetições predominantes							
	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AC)8a	(AC)9	6-7	27-5	12-5
1	7	10	4	9	7	6	4	5
2	7	10	4	9	7	6/7	4	5
3	7	10	4	9	7	6/7	4	5
4	7	10	4	9	7	6	4	4-5
5	7	10	4	9	7	6/7	4	5
6	7	10	4	9	7	6	4	5
7	7	10	4	9	7	6/7	4	4-5
8	7	10	4	10	7	6	4	4-5
9	7	9	4	9	7	7	4	4-5
10	7	9	4	9	7	6/7	4	4-5
11	7	10	4	9	7	6/7	4	4-5
12	7	9	4	9	7	6/7	4	4

Uma particularidade foi observada no locus 12-5 com o encontro de 86 amostras (34%) que apresentaram perfis duplos, ou seja, com repetições 4 e 5 para a mesma amostra. Essas amostras foram avaliadas no Laboratório da Dra. Vara Vissa, na Colorado University (EUA) e o perfil foi confirmado. Ainda assim enviamos alíquotas de DNA dessas amostras, a partir de um lote não utilizado para quaisquer análises, ao laboratório de Biologia Molecular aplicada a Micobactérias coordenado pelo Dr Philip Suffys. O mesmo perfil de 4 e 5 repetições se repetiu, sugerindo uma duplicação que pode ter ocorrido há muito tempo e que encontra-se distribuído pelos 12 setores.

Quando avaliamos os loci 27-7 e 12-5 observamos um predomínio de repetições 4 e 5 e das repetições 4 e 4-5 (perfis duplos) respectivamente (figura 11).

Outra aspecto observado, foi a predominância do perfil de 3 repetições para o locus 18-8 em 220 amostras, seguido de 4 e 8 repetições com 1 e 31 amostras respectivamente.

Ao analisarmos os genótipos de SNP das 260 amostras nesta população, observamos que 77% (n=200) da população apresentou o genótipo 3, 16% (n=41) o genótipo 4, 1,5% (n=4) o genótipo 1 e 3,8% (n=10) o genótipo 2. Em 2 (0,76%) amostras para diferenciação do genótipo 1 do 2 o sequenciamento foi inconclusivo e em outras 3 amostras (1,15%) não obtivemos resultado na PCR.

Na figura 10 podemos observar a distribuição dos genótipos de SNP pelo município.

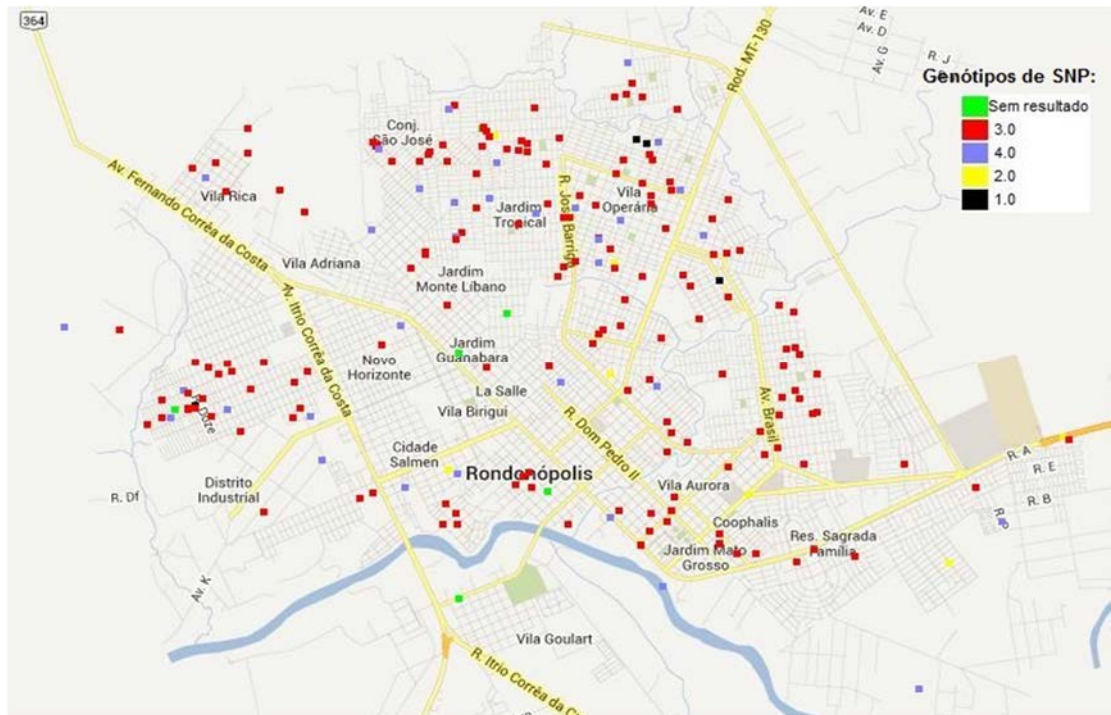


Figura 10: Distribuição dos genótipos de SNP no município de Rondonópolis.

Ao comparamos as 200 amostras com genótipo 3 em análise conjunto com os loci STRs 27-5 e 12-5, observamos uma predominância das repetições 4 e 5 respectivamente, conforme apresentado na figura 11.

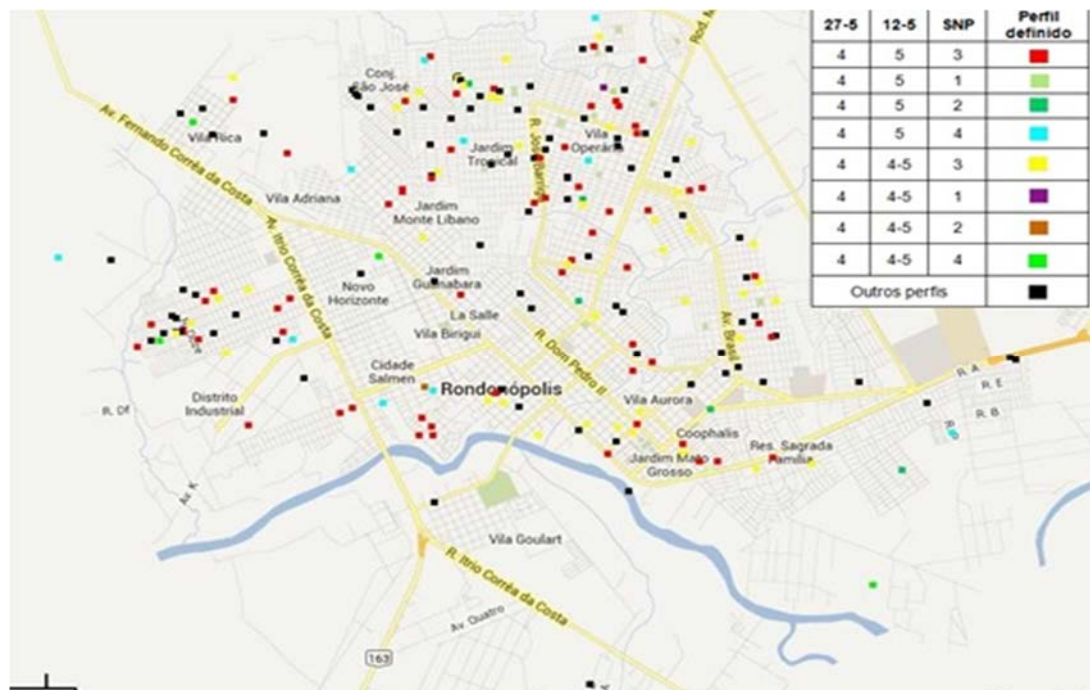


Figura 11: Distribuição dos loci 27-5 e 12-5 e genótipos de SNP no município de Rondonópolis.

4.3. Agrupamentos dos genótipos e Filogenia

Os resultados a seguir serão apresentados visando um olhar mais detalhado, por meio de análises filogenéticas. Foi considerado, a organização dos pacientes por setores, para o entendimento da distribuição dos genótipos de *M. leprae* pelo município de Rondonópolis. A figura 12 foi construída com base nos genótipos de 248 isolados de *M. leprae* definidos por meio de 17 STRs. Excluímos as amostras que pertenciam as áreas rurais, num total de 12 amostras, pois não possuímos informações corretas de sua localização dentro dos 12 setores estabelecidos pelo município. A análise dos agrupamento dos genótipos foi essencialmente o mesmo quando observamos o *Neighbor Joining*. No geral verificamos uma alta similaridade em cada grupo, mas com genótipos de pacientes de vários setores distribuídos por todo o município.

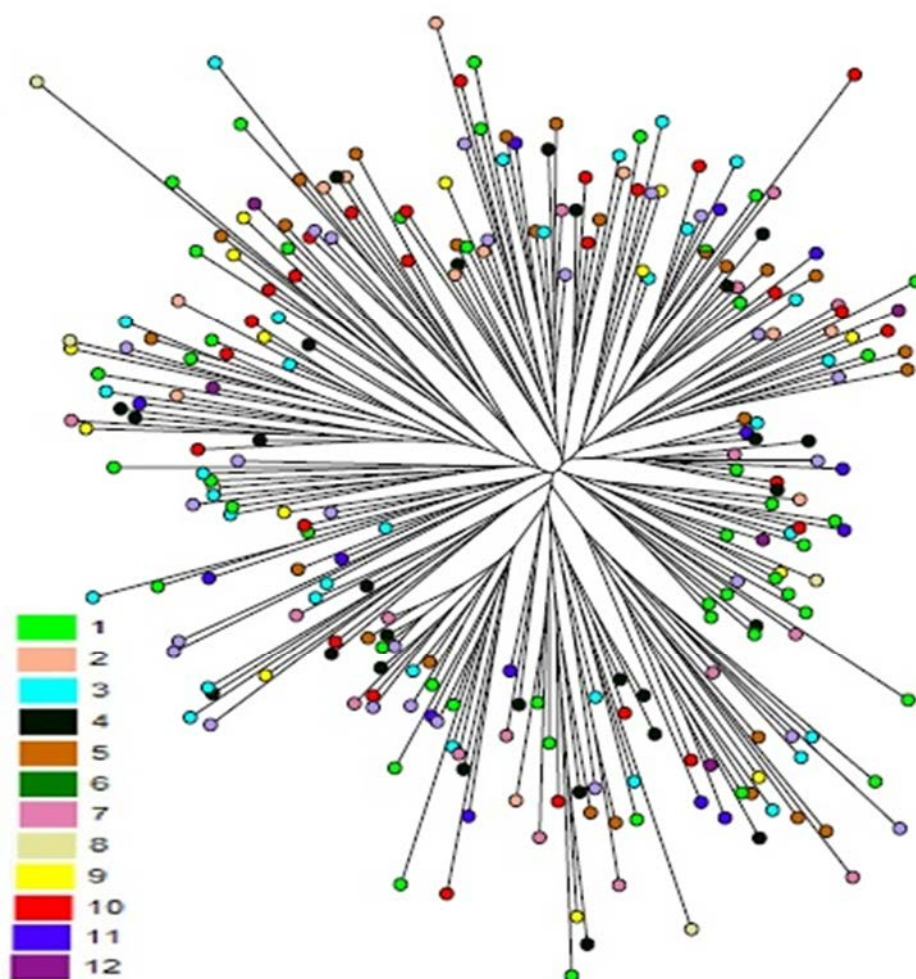


Figura 12: Árvore Neighbor Joining construída com base nos genótipos de *M. leprae* distribuídos pelos 12 setores em Rondonópolis utilizando 17 STRs.

Árvores de máxima parcimônia foram construídas a seguir, utilizando inicialmente todos os 17 STRs. Quatro grandes grupos foram observados com uma distribuição uniforme dos perfis em todos os setores da divisão-político administrativa do município (figura 13).

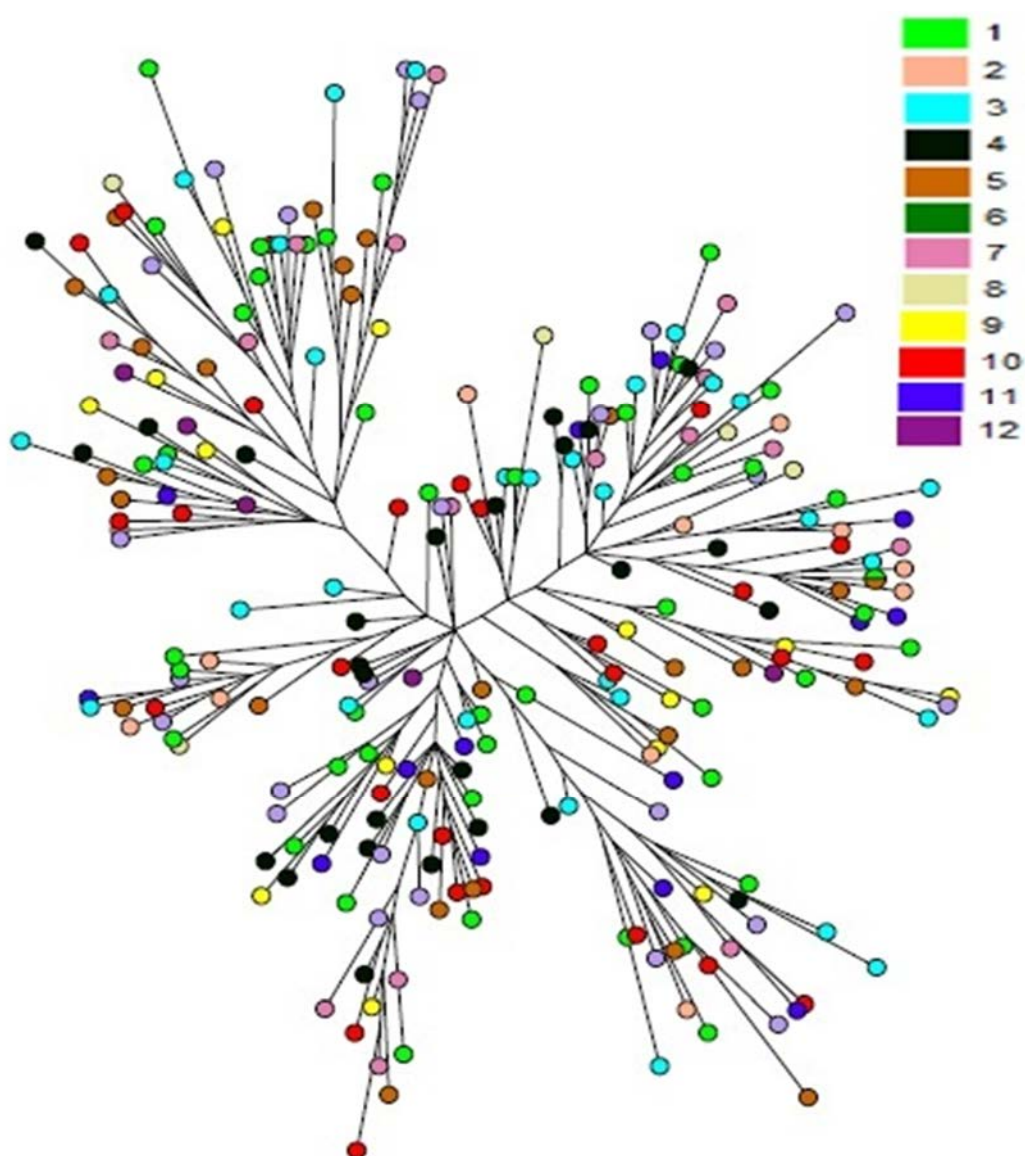


Figura 13: Árvore de máxima parcimônia construída com base nos genótipos de *M. leprae* distribuídos pelos 12 setores em Rondonópolis utilizando 17 STRs.

Em seguida, a mesma análise foi realizada excluindo os STRs mais polimórficos (ATs, TAs e TTC). Observamos então a formação de 2 grandes grupos, com a formação de amostras em *cluster*, mas sem evidências de agrupamentos predominantes para um determinado setor (figura 14).

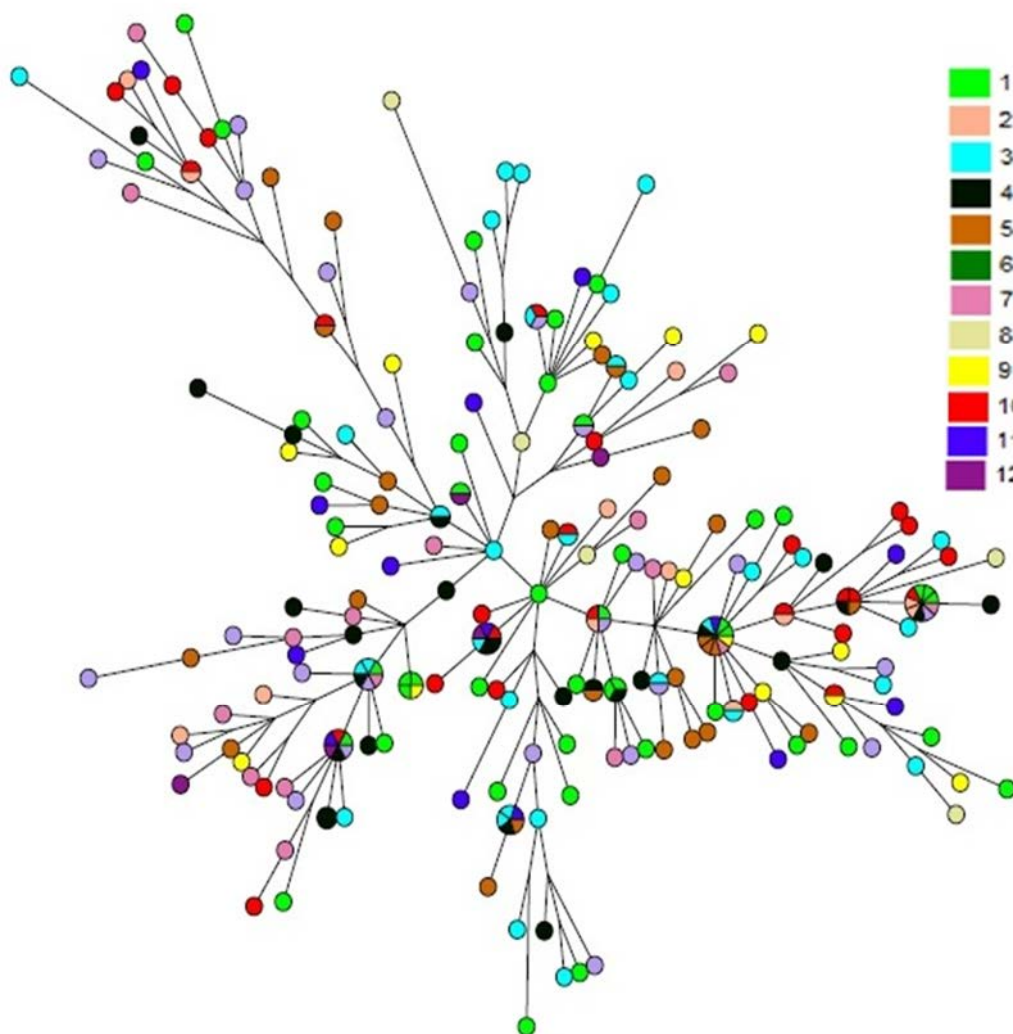


Figura 14: Árvore de máxima parcimônia construída sem ATs, TAs e TTC com base nos genótipos de *M. leprae* distribuídos pelos 12 setores em Rondonópolis utilizando 17 STRs.

Com relação ao locus 12-5, construímos uma árvore com a finalidade de avaliar a dispersão do perfil duplo, ou seja, de 4-5 repetições em relação aos demais perfis. Observamos que este perfil encontra-se espalhado por todo o município. No entanto, na área B, observamos um maior agrupamento desse perfil, com a formação de 4 *clusters* (figura 15).

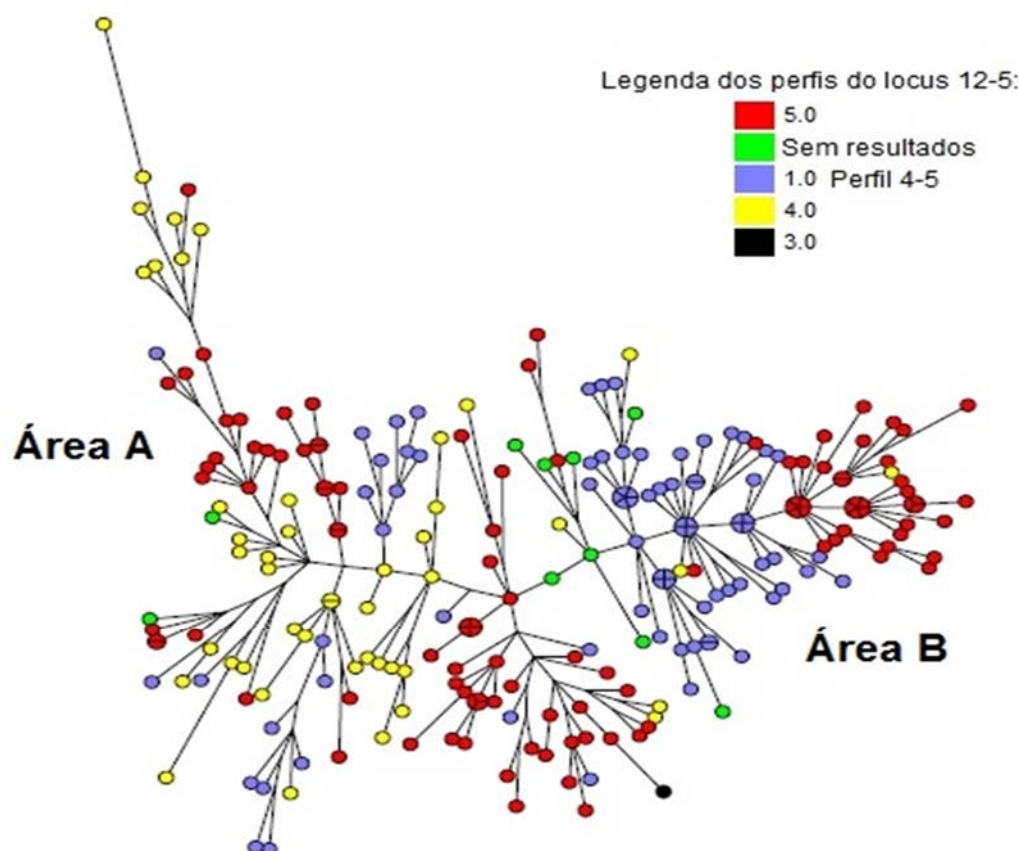


Figura 15: Árvore de máxima parcimônia construída com os perfis 4, 5 e 4-5 do locus 12-5 com base nos genótipos de *M. leprae* distribuídos pelos 12 setores em Rondonópolis.

As figuras 16 e 17 representam árvores de máxima parcimônia de 189 amostras com perfis completos, ou seja, aqueles que obtivemos sinal no sequenciamento para 16 STRs analisados. Para esta análise excluimos das figuras 16 e 17 o locus AT15, por se tratar do marcador que menos obtivemos resultados na amplificação por PCR Multiplex.

Neste contexto, observamos grupos distintos com a formação de *clusters*, mas não evidenciamos o predomínio de um perfil específico. Os *clusters* observados são compostos por pacientes de vários setores do município.

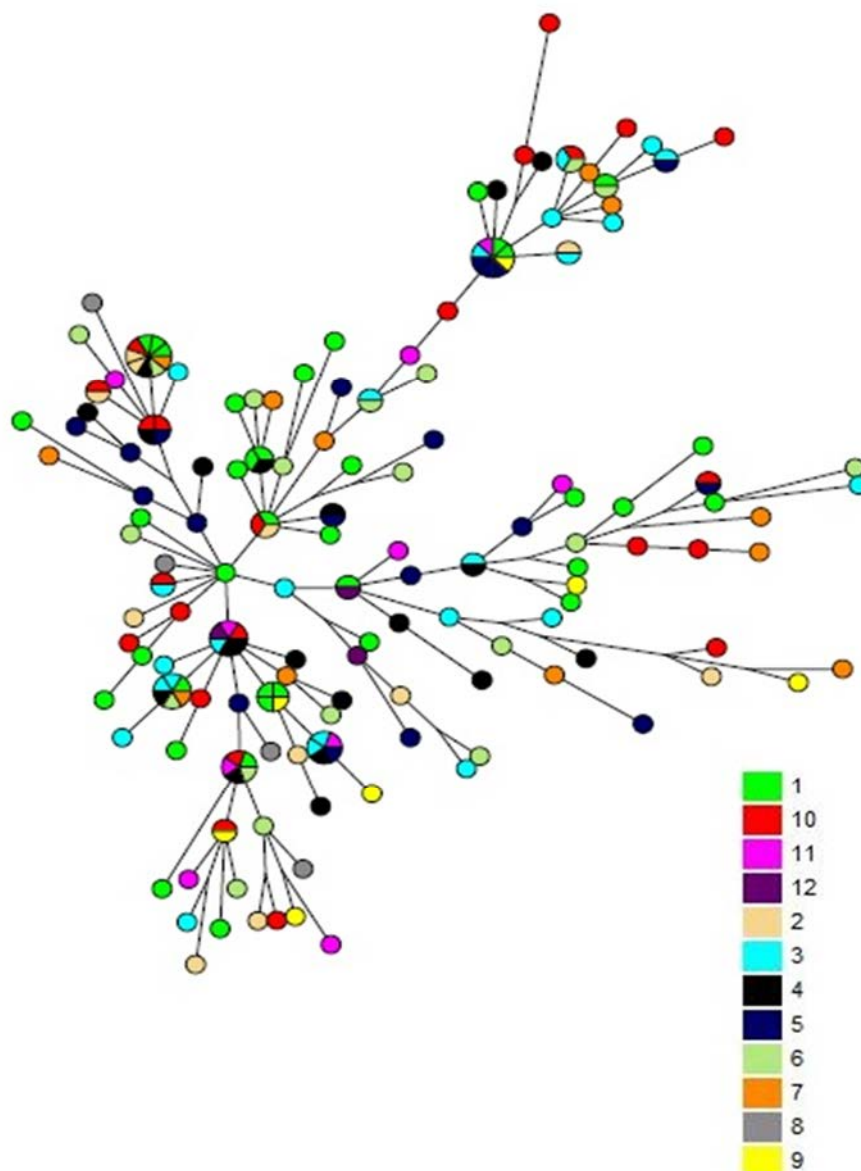


Figura 16: Árvore de máxima parcimônia construída a partir dos 16STRs (sem AT15) com base nos perfis completo de *M. leprae* distribuídos pelos 12 setores em Rondonópolis.

Já na figura 17 diminuámos ainda mais a estringência, excluindo da análise os loci mais variáveis (ATs, TAs e TTC). Nesta análise, observamos o mesmo número de *clusters*, mas ainda sem o predomínio de um perfil particular em um ou outro setor, sendo os agrupamentos compostos por pacientes de vários setores do município.

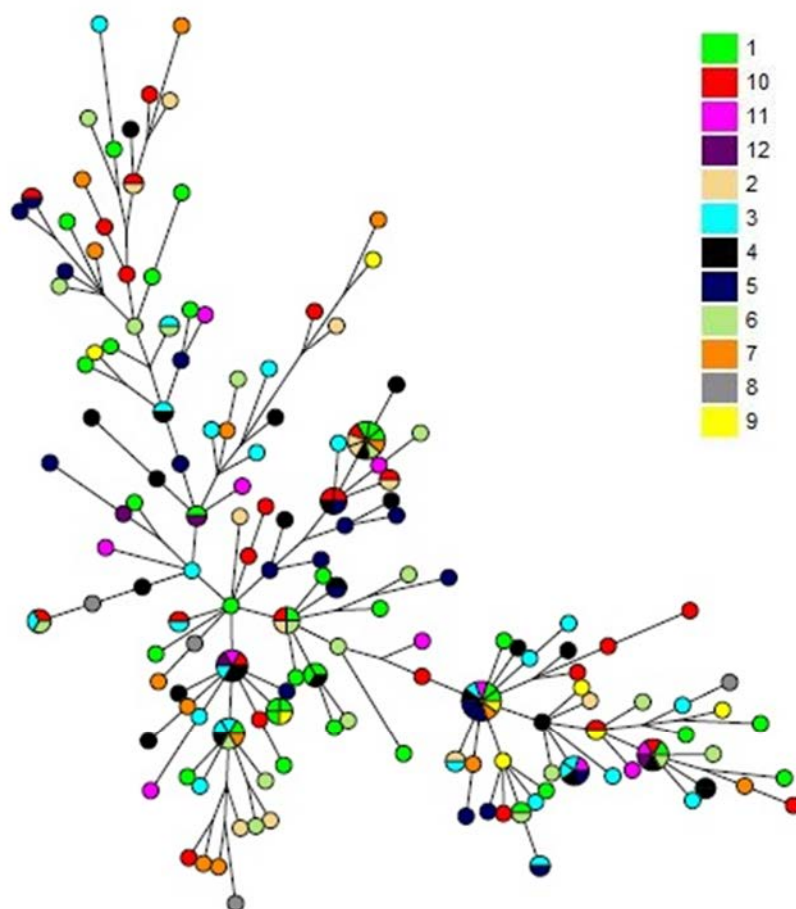


Figura 17: Árvore de máxima parcimônia construída sem ATs, Tas e TTC com base nos perfis completos de *M. leprae* distribuídos pelos 12 setores em Rondonópolis.

Quando comparamos o perfil das cepas circulantes em Rondonópolis, com as definidas em outras regiões do Brasil, por meio de estudos já publicados em Ceará, Pernambuco, Rondônia, Rio de Janeiro e São Paulo, verificamos na árvore de máxima parcimônia (figura 18), uma grande variabilidade genética do *M. leprae*. Podemos observar também a formação de 2 braços principais, sendo que na área 1, concentram-se a maioria dos isolados do Ceará, Rio de Janeiro, Rondônia, Pernambuco, e São Paulo que compartilham similaridade com poucos isolados de Rondonópolis. Já na área 2, observamos 93% dos isolados de Rondonópolis, compartilhando pouca ou nenhuma similaridade com os outros Estados, sugerindo que essas cepas são características do município.

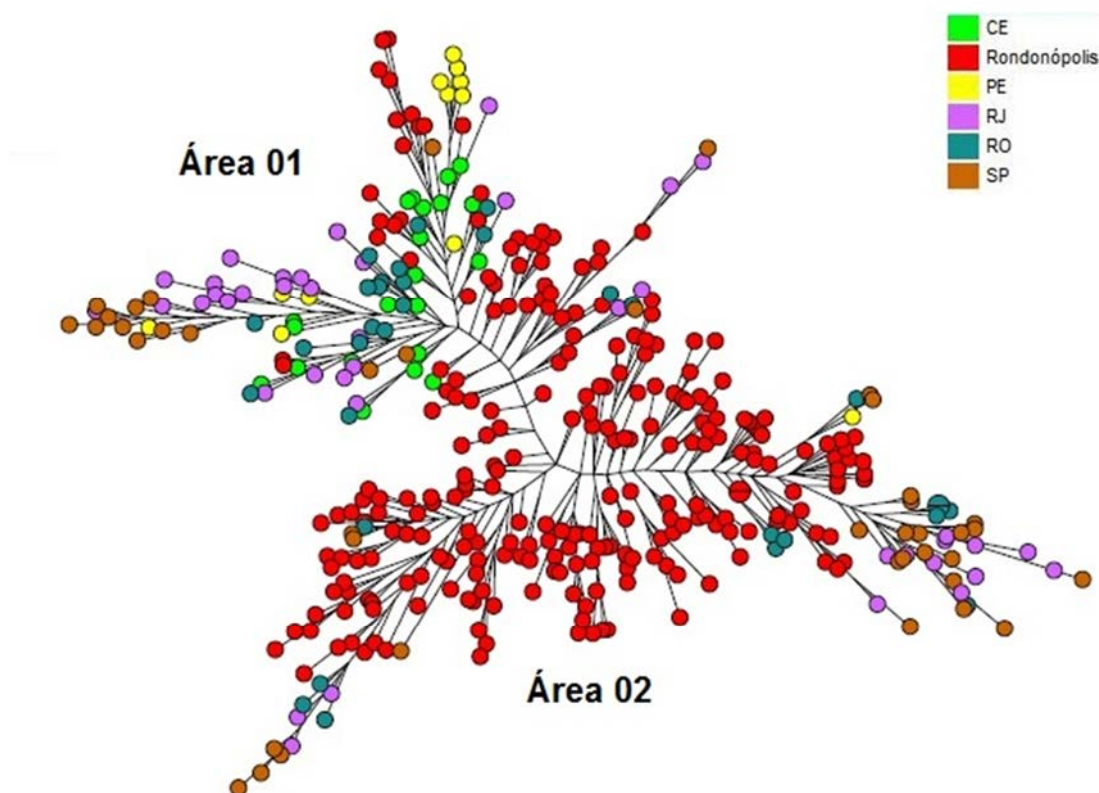


Figura 18: Árvore de máxima parcimônia com a comparação dos isolados de *M. leprae* de vários estados do Brasil com os do município de Rondonópolis.

4.4. Famílias Multicasos

Na população de Rondonópolis, observamos e analisamos 4 possíveis famílias multicasos, que foram denominadas como família 1 (F1), família 2 (F2), família 3 (F3) e família 4 (F4) (tabela 10).

Tabela 10- Perfil genético entre as famílias multicasos dos 17 STRs

ID	Família	Bairros	(AC)8b	(GTA)9	(GGT)5	(AT)17	6-3a	21-3	(AC)9	(AT)15	(AC)8a	27-5	6-7	(TA)18	(TTC)21	(TA)10	23-3	12-5	18-8	
MT00336	F1	Jd. Liberdade	7	9	4	12	3	2	7	21	9	5	6	19	12	7	2	4	5	3
MT01389	F1	Jd. Liberdade	7	9	4	13	3	2	7		9	4	6	16	12	10	2	4		3
MT00383	F2	Jd. Liberdade	7	10	5	11	3	2		15	9	4	7	16	12	9	2	4	5	3
MT01409	F2	Jd. Nova Era	7	10	4	11	3	2	7	14	9	4	6	16	12	10	2	4	5	3
MT01410	F2	Jd. Nova Era	7	10	4	11	3	2	7	15	10	4	7	15	10	10	2	4	5	3
MT01542	F3	Jd. Paraíso	7	10	4	14	3	2	7	15	11	3	8	19	10	10	2	4	5	3
MT01593	F3	Jd. Paraíso	7	10	4	10	3	2	7	15	11	4	7	16	10	9	2	4	5	3
MT01660	F4	Pq. Universitário	7	10	4	15	3	2	7	15	8	4	6	18	10	10	2	4	5	3
MT01669	F4	Pq. Universitário	6	14	4	15	3	2	7	15	8	4	6	18	10	11	2	5		3

As famílias foram plotadas em um mapa para melhor visualização de sua distribuição no município (figura 19).

Os pacientes pertencentes à família F1 residem na mesma casa, são casados e foram diagnosticados em anos diferentes. O esposo foi diagnosticado como recidiva em 2009 e a esposa em 2010 como caso novo.

A família F2, é composta por 3 pessoas, das quais duas delas moram na mesma casa e uma em outra residência, sendo a distância entre as casas de 500m. O paciente que reside em outra casa é pai de uma das pacientes e ex-marido da outra. Os três foram diagnosticados no ano de 2010.

A família F3 reside na mesma casa, sendo a relação de parentesco entre eles de marido e mulher, com diagnóstico de caso novo em 2010.

Na família F4, residindo também na mesma casa, os pacientes são avô e neto, com diagnóstico no ano de 2010.

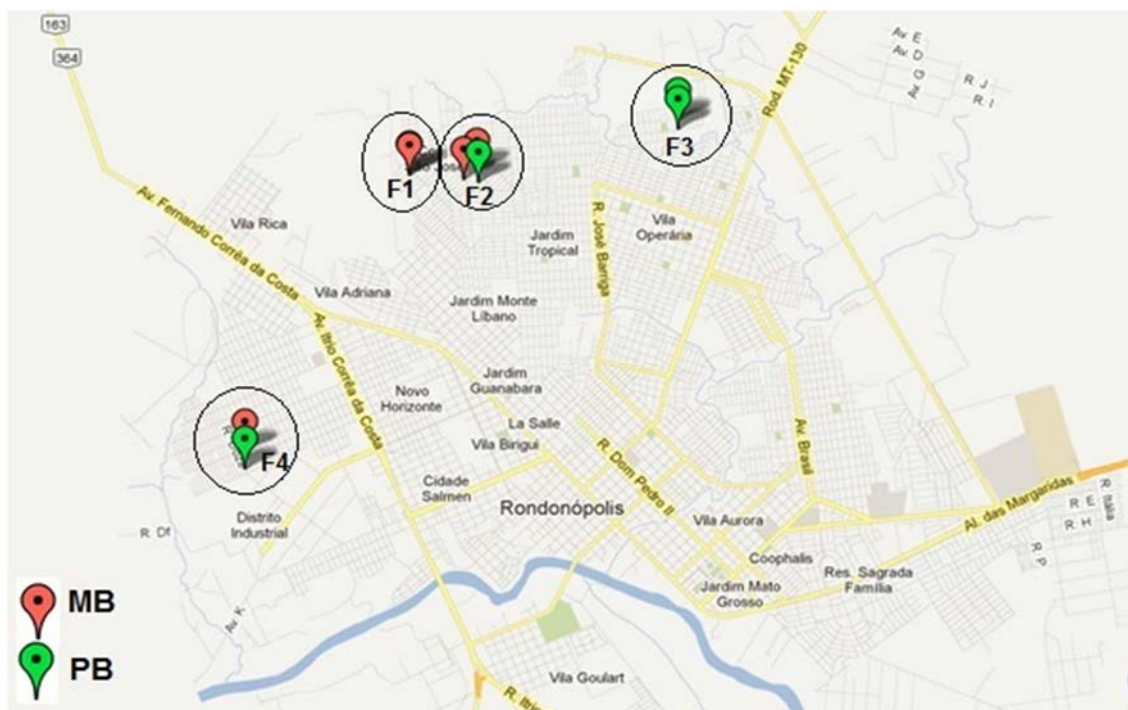


Figura 19: Distribuição das famílias multicasos no município de Rondonópolis.

Quando observamos a tabela 10 encontramos uma alta similaridade dos genótipos das famílias, pois identificamos repetições idênticas para a maioria dos STRs. Diferenças alélicas de 1 a 4 repetições foram verificadas em cada família, quando observadas nos loci ATs e TAs que para esta população são extremamente variáveis.

No entanto, quando visualizamos estes perfis em uma árvore de máxima parcimônia (figura 20), observamos que existe mais similaridade desses membros que compõe as famílias com outros pacientes distribuídos por outras áreas do município do que entre eles mesmos.

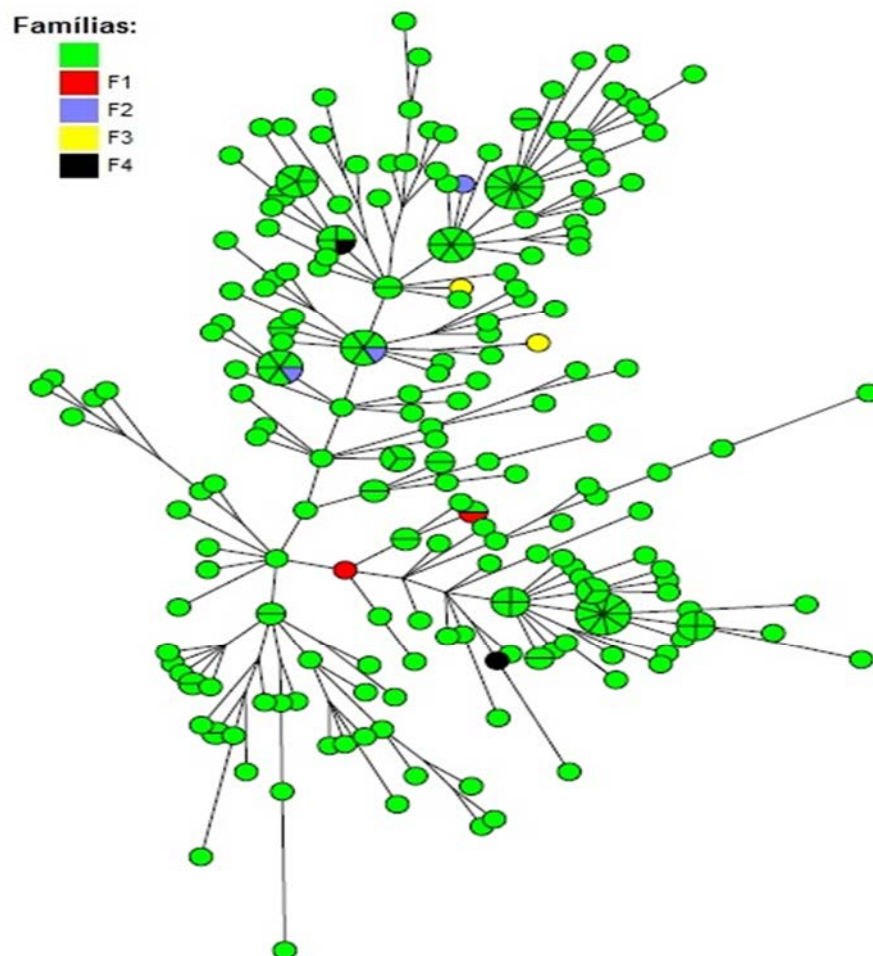


Figura 20: Árvore de máxima parcimônia das famílias multicasos em relação aos perfis da população geral do município de Rondonópolis.

5.0. Discussão

O município de Rondonópolis, no Mato Grosso é altamente endêmico para a hanseníase, apesar da existência de serviços qualificados para o diagnóstico e acompanhamento dos casos e da implementação da poliquimioterapia para o tratamento e controle da doença.

A ausência de estudos para resolver este paradoxo resultou na criação de um projeto de epidemiologia abrangente para coleta de dados e análise de múltiplas variáveis. O projeto incluiu pacientes que se apresentaram espontaneamente e foram diagnosticados no Centro de Saúde local do Jardim Guanabara. Questionários foram estruturados e incluíram dados demográficos, epidemiológicos e avaliação clínica dos pacientes com hanseníase, assim como a coleta de biópsias de pele e outras amostras para diagnóstico e exames laboratoriais adicionais.

Neste estudo, são apresentados de forma descritiva os dados de genotipagem e filogenia definidos pela análise de STRs e SNP do *M. leprae* de 260 amostras recebidas referentes ao período de julho de 2007 a julho de 2010.

Inicialmente, observamos em nosso estudo, que 53% dos pacientes eram do sexo masculino e 47% feminino, validando os dados da literatura, de que a hanseníase incide em maior proporção em homens, embora nos últimos anos a diferença entre sexos tenha diminuído; mulheres têm sido acometidas em plena capacidade de reprodução e produção laborativa⁸⁸.

Utilizando-se da divisão-político administrativa do município de Rondonópolis, organizada em 12 setores, verificamos com base na classificação operacional um predomínio de casos MB em relação aos PB, sugerindo que a transmissão da doença no município é mantida pelos casos multibacilares. Assim, como relatado correntemente há anos na literatura, que os pacientes MB são considerados responsáveis pela maior parte da transmissão¹⁷.

O maior obstáculo aos estudos com hanseníase, visando um melhor entendimento da dinâmica de transmissão, das fontes de infecção e da relação dos genótipos entre os pacientes é a dificuldade na obtenção do DNA, pois o bacilo não pode ser cultivado *in vitro*.

O conhecimento disponível no genoma de *M. leprae*, revelou um grau elevado de conservação, mas com um número limitado de marcadores genéticos identificados até então, e que poderiam realmente contribuir na identificação dos genótipos desses isolados⁶.

A partir de 2009, quando os trabalhos de pesquisa se intensificaram, descobriu-se que os métodos de tipagem de *M. leprae* seriam de grande valor na identificação da origem da infecção e também para melhor entender os padrões de transmissão do organismo. Outro aspecto observado foi o de que em áreas de alta endemicidade são encontrados múltiplos genótipos ao invés de um dominante, necessitando de marcadores adicionais para tipagem dos isolados⁸³. Isto permitiu que mais de 50 STRs fossem testados como potenciais candidatos de genotipagem na diferenciação de cepas e de isolados em áreas com alta prevalência da hanseníase⁷⁷.

Os STRs classificados como microssatélites ou minissatélites são fontes excelentes de polimorfismo, pois os números de unidades de repetições podem aumentar ou diminuir em cada cepa, caracterizando-a. O avanço mais recente é pela tipagem molecular dos STRs por PCR *multiplex* combinado com a técnica de FLA para mapeamento dos alelos^{78,83}.

A sequência repetitiva de 6pb do gene *rpoT* (6-3a) localizada em uma região intergênica foi o primeiro STR descrito por Matsuoka e Col., cuja repetição apresentou 3 cópias nos isolados provenientes do Japão, Coréia e Brasil, enquanto isolados de Haiti e Okinawa (Japão) apresentaram 4 cópias⁸⁰. Nosso painel de amostras quando analisado para este marcador valida o achado de 3 repetições para a população brasileira.

Um detalhe importante é que a pouca variabilidade desta sequência, favorece seu uso como um marcador filogenético capaz de avaliar mudanças mais lentas de genótipo e assim acompanhar a possível propagação mundial da hanseníase^{7, 84}.

Outro marcador descrito isoladamente foi à sequência TTC, localizada em pseudogenes. Esse STR é considerado extremamente polimórfico, pois foram observadas cepas que variavam de 14 a 28 repetições. Em nosso estudo observamos cepas com variação de 8 a 23 repetições⁸¹. Outro aspecto importante em nosso estudo em relação aos dados publicados por Shin e Col., quando se referem a não amplificação de amostras PB, é que obtivemos 80% de resultados para este locus, com índice baciloscópico variando de 0 a 2 +.

Com a dificuldade de detecção do bacilo em casos PB, estudos realizados até o momento excluíram esses casos em virtude dos resultados incompletos, como por exemplo, em um estudo realizado nas Filipinas, onde 21 amostras com índice baciloscópico menor que 1,5 + foram excluídas por não produzirem dados para

todos os loci⁸⁹ e em estudos na Colômbia onde a maioria dos pacientes não produziram dados adequados devido ao índice baciloscópico menor que dois⁹⁰. Em nosso estudo, a obtenção de bons resultados para os casos com índice baciloscópico variando de 0 a 2 +, esta relacionada com ajustes necessários que fizemos nas concentrações DNA de cada amostra, sempre tomando como base o índice baciloscópico do tecido.

Ainda com relação ao loci TTC, em nossos dados observamos 75% de diversidade alélica com predomínio de cepas com 10 repetições. Em um estudo conduzido com amostras do estado de São Paulo e no Rio de Janeiro, foram observadas o predomínio de 10 e 11 repetições⁹¹.

Com a finalidade de aumentar a sensibilidade e principalmente a reprodutibilidade das análises Kimura e Col.⁸³, desenvolveram um PCR *Multiplex* usando 17 STRs em 4 combinações possíveis. Nesse contexto, muitos trabalhos foram desenvolvidos em várias partes do mundo com a finalidade de avaliar esses marcadores em diferentes populações e melhor caracterizar a distribuição das cepas de *M. leprae* em cada região.

No presente estudo, amostras de DNA de pacientes com hanseníase do município de Rondonópolis (Mato Grosso) foram analisadas utilizando 17 STRs. O poder de discriminação observado com os 17 STRs utilizados variou de 0.90 para o locus (AT)17 a 0 para os locis 21-3 e 6-3a e essa abordagem experimental permitiu-nos determinar alelos para todos ou a maioria dos 17 STRs em uma grande fração da nossa amostra.

Na população de Rondonópolis, dos 17 STRs avaliados, somente o 6-3a (*rpoT*) e 21-3 não foram polimórficos, com 3 e 2 repetições respectivamente, sendo que o 6-3a reforça os achados de Matsuoka⁸⁰ já anteriormente mencionado. O locus 21-3 apresenta-se com 2 repetições, sendo a mesma encontrada no Brasil nas populações do Rio de Janeiro, São Paulo, Ceará e Pernambuco^{91,92} e em populações da China⁸⁵, Tailândia⁸⁶, Colômbia⁹⁰ e Índia⁹³, divergindo das populações da Filipinas onde o predomínio é de 3 repetições⁸⁹.

Alguns loci quando analisados em conjuntos ajudam na definição dos perfis das cepas de uma determinada região, como por exemplo, o locus (GGT)5 associado ao locus 21-3, são considerados pouco polimórficos e foram observados 5 e 3 repetições respectivamente na população das Filipinas⁸⁹ e da Tailândia⁸⁶, mas quando avaliados na nossa população e em outras populações como China⁸⁵,

Colômbia⁹⁰ e mesmo outras regiões do Brasil⁹¹ observa-se o predomínio de 4 repetições para o (GGT)5 associado com 2 repetições do locus 21-3. Esta observação é considerada padrão para a maioria da população global de *M.leprae*⁸⁶.

Em nosso estudo, quando comparamos os loci 6-7, 27-5, (GGT)5, (AC)8a, (AT)15 e (GTA)9 com os achados das populações do Rio de Janeiro e São Paulo⁹¹, e também com a população da Colômbia⁹⁰, verificamos o mesmo número de repetições mais predominantes, ou seja, 6, 4, 4, 9, 15 e 10 respectivamente. Sugerindo que apesar do polimorfismo mais intermediário, na população brasileira e na Colômbia eles são mais conservados do que nas populações da Índia e Filipinas⁸³.

Na população de Rondonópolis observamos loci que foram divergentes em relação a outras populações. Observamos um predomínio de 7 repetições para o locus (AC)9 na população de Rondonópolis, o mesmo encontrado no estado de Pernambuco, que quando comparado com os estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Rondônia e Ceará apresentaram 8 repetições. Este perfil de 8 repetições foi também observado na Colômbia^{90,91,92}.

Em relação ao locus 18-8, Rondonópolis apresentou em 85% das amostras com repetição 3, característica também encontrada nos estados de Rondônia e Ceará⁹². Em amostras do estado de São Paulo, o mesmo número de repetições para este locus foi observado em apenas 3 amostras das 89 analisadas, tendo os demais 8 repetições, o mesmo observado na população do Rio de Janeiro⁹¹. Já o estado de Pernambuco, mostrou-se diferente do restante da população brasileira, com predomínio de 4 repetições⁹². Nas populações da Colômbia, Filipinas, China e Tailândia foram encontradas 7 ou 8 repetições para este locus^{85,86,89,90}. Esse marcador foi considerado por Gillis e Col., como difícil de analisar quando testados em concentrações mais elevadas de bactérias devido à presença bandas múltiplas de *stutter*⁷⁷. Característica esta, não observada em nossa análise.

Quando observamos os loci considerados mais polimórficos em nossa população e em outros estudos, notamos em Rondonópolis e nas populações de Rondônia e Ceará um predomínio de 16 repetições para o locus (TA)18, divergindo dos achados do Rio de Janeiro, São Paulo e Pernambuco que apresentaram 14 e 17 repetições respectivamente^{91, 92}. Com relação ao locus (TA)10 a grande maioria das amostras de Rondonópolis e São Paulo apresentaram 10 repetições, mostrando

comportamento diferente nos estados de Rondônia, Ceará e Pernambuco e para o Rio de Janeiro com 8 e 6 repetições respectivamente^{91,92}.

Encontramos dificuldades com a amplificação de 32 % amostras para o locus (AT)15, um dos mais variáveis na população brasileira, sendo a mesma dificuldade encontrada na população de Rondônia⁹². Monot e Col. frente à mesma dificuldade, para o locus AT15, clonaram algumas amostras antes do sequenciamento e mesmo assim, em alguns casos, não foi possível estabelecer o número exato de repetições. Especula-se que isso aconteça com amostras com mais de 25 repetições⁷².

Em uma análise mais particularizada, na tentativa de encontrar cepas mais prevalentes, excluimos os loci ATs, TAs e (TTC)21, pois devido a alta variabilidade não favoreceu o reconhecimento de cepas relacionadas. Quando olhamos para marcadores mais estáveis, mas não menos polimórficos, como por exemplo, os loci (AC)8b, (GTA)9, (GGT)5, (AC)8a, (AC)9, 6-7, 27-5, 12-5 e 18-8 nos 12 setores, observamos considerável similaridade entre eles e sugerimos que o polimorfismo intermediário encontrado possa contribuir para a definição de cepas mais prevalentes em Rondonópolis. Esse mesmo direcionamento foi proposto por Weng e Col. para caracterização de cepas prevalentes na China⁹⁴.

Outro tipo de polimorfismo genético observado no genoma de *M. leprae*, são os polimorfismos de base única ou SNPs, que têm proporcionado evidências essenciais na formulação de teorias sobre a rota de disseminação da hanseníase pelo mundo. Sua descrição do método de PCR-RFLP⁸⁹ favoreceu a análise de isolados de várias partes do mundo, principalmente em diferentes regiões geográficas do Brasil para distinção dos quatro genótipos de *M. leprae*⁷.

Em Rondonópolis, verificamos o predomínio do genótipo 3 distribuído uniformemente por todo o município, sendo o mesmo genótipo predominante em estudos realizados com amostras de São Paulo, Rio de Janeiro e Rondônia^{91,92} e também observado em 2005 por Monot e Col. como o esperado para as Américas⁶. Uma pequena porcentagem de genótipos 4 e 1 também foram observadas, corroborando com informações sobre a colonização do Brasil, que apresenta em sua composição étnica atual 49,7% de brancos, 49,5% de afro-descendentes, 0,8% amarelos ou índios⁹⁶.

Assim como em Rondonópolis, estudos realizados no estado de São Paulo e Rio de Janeiro⁹¹ e também na Colômbia⁹⁰ encontramos genótipo 3 correlacionado com os loci 27-5 e 12-5 que possuíam 4 e 5 repetições respectivamente. Na

população de Rondonópolis isso foi observado apenas em 88 amostras, devido à presença de repetições duplas do loci 12-5 em 86 amostras. Isto é sugestivo de existência de genótipos de *M. leprae* geograficamente relacionados.

Com a finalidade de definir a similaridade entre os genótipos definidos em Rondonópolis, avaliar a relação entre os genótipos definidos por STRs e SNPs visando uma melhor compreensão da relação entre os genótipos e sua origem geográfica, árvores de *Neighbor Joining* e Máxima Parsomônia foram construídas.

Neste contexto, podemos observar uma alta diversidade genética nos isolados de *M. leprae*, pois quando analisados pelos 17 STRs, observamos uma distribuição uniforme de diferentes perfis espalhados por todo o município. Quando a estringência foi diminuída retirando-se os loci mais polimórficos como ATs, TAs e TTC verificamos que os loci (AC)8b, (GTA)9, (GGT)5, (AC)8^a, (AC)9, 6-7, 27-5, 12-5 e 18-8 nos apresentam um polimorfismo intermediário muito satisfatório com a possibilidade de definição das cepas mais prevalentes em Rondonópolis e com a formação de vários *clusters*, compartilhando similaridades de genótipos. No entanto observamos que esses *clusters* são formados por pacientes de vários setores, sugerindo ampla contaminação e impossibilitando a visualização de um foco principal da doença.

Em seguida, realizamos a mesma análise, mas utilizando somente amostras com perfis completos para 16 STRs. O número de perfis completos foi de 189 amostras para 16 STRs, excluindo-se o AT15. Observamos então, a mesma formação de *clusters* inicial quando da análise com e sem os loci mais polimórficos (AT17, TA18, TA10 e TTC), a ausência de perfil predominante e o distribuição dessas cepas por todo município.

Dessa forma, enfatizamos a importância de se trabalhar com várias estringências de análise para uma melhor definição da estrutura populacional de genótipos similares, como em Rondonópolis. Essa observação foi validada em um estudo realizado com quatro microssatélites e seis minissatélites em 50 isolados de *M. leprae* da China, mostrando que dois dos microssatélites ((AC)8b e (GGT)5) e cinco minissatélites (12-5, 18-8, 21-3, 23-3, e 27-5) não apresentam nenhum polimorfismos⁹⁶. Em outro estudo os microssatélites (AC)9 e (GTA)9 quando combinados com o minissatélite (6-7) e outros cinco loci candidatos caracterizaram cepas prevalentes⁹⁴. Portanto, entendemos que realizar uma análise combinada com

outros marcadores poderá fortalecer o encontro de perfis mais predominantes em Rondonópolis.

Outra observação marcante em nosso estudo foi o encontro de alelos duplos (repetições 4 e 5) para o locus 12-5 em 34 % das amostras analisadas. Por meio da análise em uma árvore de máxima parcimônia, visualizamos a distribuição homogênea desses perfis em todo município de Rondonópolis. Essas amostras foram enviadas para outros dois centros de pesquisa (um no Brasil e outro nos Estados Unidos), que confirmaram o perfil. Assim descartamos a possibilidade de infecção mista ou mesmo contaminação e sugerimos que trata-se de um evento de duplicação de que vem ocorrendo há longo tempo, mas que deverá ser confirmado em breve com sequenciamento total do genoma destas amostras.

Com a finalidade de visualizar a similaridade entre os genótipos definidos no Brasil com aqueles encontrados no município de Rondonópolis, comparamos estes com os perfis dos isolados publicados por Fonte e Col em 2012⁹² para os estados de Pernambuco, Ceará, Rondônia, São Paulo e Rio de Janeiro. Nesta análise, foi possível verificar a grande diversidade genética de *M. leprae*. Podemos observar na figura 18 a formação de 2 braços principais: na área A estão as amostras oriundas em sua grande maioria do Ceará, Rondônia, Rio de Janeiro, Pernambuco e São Paulo que apresentam similaridade genética com poucas amostras de Rondonópolis. Já na área B, observamos um braço composto em sua grande maioria por amostras de Rondonópolis que apresentam similaridade genética com amostras dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rondônia e poucas de Pernambuco.

Sugerimos que o compartilhamento com amostras dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rondônia possa estar diretamente relacionado com o SNP genótipo 3, que é o mais frequente entre isolados de *M. leprae* no Sudeste do Brasil^{91,92}, e mais frequentemente observado em Rondônia. No entanto, ainda observamos uma alta proporção de genótipos sugestivos de pertencerem somente ao município de Rondonópolis. Isso pode ser explicado, pela existência de um padrão similar nos minissatélites com uma pequena variação em microsatélites com alta variabilidade alélica^{85, 92}.

Neste estudo também foram observadas as características dos genótipos do *M. leprae* em pacientes de quatro famílias, e verificamos o compartilhamento de alelos idênticos para os loci (AC)8b, (AC) 8a, (GTA)9, (GGT)5, 6-3a, 21-3, (AC)9 27-

5, 12-5, 6-7 e 18-8 ou com uma ou duas repetições de diferença nos loci ATs, TAs e TTC que são mais propensos a altas taxas de mutação, devido ao longo período de incubação e do número desconhecido de ciclos durante a transmissão⁹⁴.

Em alguns estudos onde famílias foram avaliadas os autores sugerem que as famílias multicasos podem representar focos epidêmicos e fonte de *M. leprae* nos bairros que vivem^{89, 94}. No entanto, quando analisamos os genótipos das famílias em relação aos perfis da população geral de Rondonópolis, verificamos que eles compartilham genótipos idênticos e ou similares, não permitindo estabelecer ligação para transmissão intrafamiliar (figura 20).

O estudo em Rondonópolis está associado com a transmissão da doença em um município que possui altas taxas de detecção de novos casos por ano. Assim, observamos que cepas estreitamente relacionadas podem ser percebidas dentro de uma estrutura maior ao nível da população e composta por poucos subgrupos. A observação de que este município possui genótipos idênticos e ou muito similares de *M. leprae*, indica que o uso de STRs para genotipagem é extremamente importante em estudo que visam avaliar a dinâmica de transmissão da hanseníase em conjunto com as informações epidemiológicas da população.

Este é o maior estudo no Brasil, analisando pacientes ao longo de 4 anos e com a coleta de informações geográficas, demográficas, clínicas e dados de genótipo de *M. leprae* bem definidas. No entanto, outras investigações para formalmente analisar a variação genética bacteriana quando sobreposta com os atributos espaciais, étnicos, clínicos e sócio-econômicos estão em fase final de análise para publicação.

Portanto, ensaja-se que a epidemiologia molecular venha a ser reconhecida como um importante componente nos programas de controle da hanseníase na população, com a finalidade de melhor compreender a origem de novos casos e reconstruir as rotas de transmissão da doença neste País.

6.0. Conclusões

1. A relevante endemicidade observada no município de Rondonópolis, frente à existência de serviços qualificados para diagnóstico e acompanhamento de casos e a pouca repercussão destas atividades na realidade epidemiológica, pressupõe-se a manutenção de importante grau de transmissão da doença;
2. Após muitos anos da introdução da PQT, não existe qualquer evidência do seu impacto na redução da transmissão;
3. A grande diversidade genética observada entre as amostras analisadas confere aos STR avaliados potencial para diferenciar isolados de *M. leprae*;
4. O grau de polimorfismo observado entre os STRs e sua relação com os SNPs avaliados neste estudo, comprovam que estas ferramentas podem ser aplicadas aos estudos de filogenia do *M. leprae* e no entendimento da dinâmica de transmissão da hanseníase;
5. Um melhor conhecimento dos mecanismos de transmissão por meio de estudo populacionais que integrem a epidemiologia molecular são necessários para apoiar as estratégias de controle da hanseníase visando à interrupção da transmissão e consequentemente a diminuição do número de casos novos.

7. 0. Referências

1. Opromolla DVA. Noções de Hansenologia. 1 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima 2000; p.1-5;
2. Ell SR. Leprosy in history. Hastings RC. Leprosy, 1985; 2: 3-5;
3. Trautman JR. The history of leprosy. Hasting RC. Leprosy 1985; 2: 11-23;
4. Serviço Nacional de Lepra. Manual de leprologia. Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Saúde, 1960;
5. 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 e Sociedade, 2004; 13:76-88;
6. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C et al. On the origin of leprosy. Science 2005; 308: 1040-1042;
7. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. Nature America 2009; 41(12):1282-1289;
8. Madeira, S. Aspectos Microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. In: Opromolla DVA, editor. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima 2000; 13-18;
9. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem 1995;64:29-63;
10. Vissa VD & Brenan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene. Genome Biol 2001; 2(8):reviews1023.1–1023.8;
11. Shepard, C. C. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. J. bacteriol., v.90, p.1271-75, 1965;
12. <http://www.ilep.org.uk/facts-about-leprosy/transmission-and-control-of-leprosy/>;
13. Ress RJ, McDougall AC. Airbone infection with *Mycobaterium leprae* in mice. J. Clin. Microbiol 1997; V.10;
14. Chehl S, Job CK, Hastings RC. Transmission of leprosy in nude mice *J. Trop Med Hyg* 1985; 34(6), p1161-116;
15. Salgado CG & Barreto JG. Leprosy Transmission: Still a Challenge. Journal Compilation. 2012;
16. Almeida EC et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood and Nasal Secretion of Brazilian Household Contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(5): 509-512;

17. Fine PEM, et al. Household and Dwelling Contact as Risk Factors for Leprosy in Northern Malawi. *American Journal of Epidemiology* 1997; 146 (1);
18. Fine PEM. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. *Epidemiol*, 1982; 4: 161-188;
19. NOORDEEN SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings RC, ed. *Leprosy*, 2nd edn. Edinburg: Churchill-Livingstone, 1994:29-48;
20. SEHGAL VN, JOGINDER MD, SHARMA VK. Immunology of leprosy- Comprehensive survey. *Int. J. Dermatol* 1989; 28: 574-584;
21. Harboe, M. Leprosy in history. Hasting RC. *Leprosy*, 1985; 2: 87-112;
22. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five groups system. *Int J Lepr* 1966; 34: 255-273;
23. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002; 35(4): 365-375;
24. Foss NT. Aspectos Imunológicos da hanseníase. *Medicina*, Ribeirão Preto, 1997; 30: 335-339;
25. WHO Health Organization. WHO EXPERT COMMITTEE ON LEPROSY, 1998;
26. Souza C S. Hanseníase: Formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina*, Ribeirão Preto, 1997; 30: 325-334;
27. Teixeira A C, 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;
28. 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;
29. 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;
30. Buhrer 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;

31. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Trumand RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS 2006; p. 338–381;
32. Clark-Curtiss JE, Docherty MA. A species-specific repetitive sequence in *Mycobacterium leprae* DNA. J Infect Dis 1989; 159: 7-15;
33. Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN et al. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. J Med Microbiol 1993; 39: 298-304;
34. 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;
35. 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.;
36. Woods SA, Cole ST. A family of dispersed repeats in *Mycobacterium leprae*. Mol. Microbiol 1990; 4: 1745-175;
37. Hartskeerl RA, De Wit M Y, Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. J. Gen. Microbiol 1989; 135: 2357-2364.;
38. 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;
39. 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;
40. 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;
41. 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;
42. Santos AR, Nery JA, Duppre NC, Gallo ME, Goes Filho JT, Suffys PN, Degraeve WM. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. J. Med. Microbiol 1997; 46: 170-172;

43. Kampirapap K, Singthan N, Klatser PR, Wiriawipart S DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1998; 66: 16-21;
44. 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;
45. 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;
46. Brasil. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_hansen-2007.pdf;
47. Bryceson A, Pfaltzgraff RE – Leprosy. Churchill Livingstone Inc., London, 1990;
48. World Health Organization. Global leprosy situation. *Weekly Epidemiol Rec* 2012; 87, 317–328;
49. Cunha SS, Rodrigues LC, Duppre NC. Current strategy for leprosy control in Brazil: time to pursue alternative preventive strategies?. *Rev Panam Salud Publica* 2004; 16:362-365;
50. http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2011.pdf;
51. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>;
52. Ministério da Saúde, Vigilância em Saúde: Situação Epidemiológica da Hanseníase, 1 ed. 2008;
53. Hussain, T. Leprosy and Tuberculosis: An insight-review. *Critical Reviews in Microbiology* 2007;33:17-66;
54. Nascimento HB. A Lepra em Mato Grosso: caminhos da segregação social e do isolamento hospitalar (1924 -1941) [dissertação de mestrado] Cuiabá: Instituto de Ciências Humanas e Sociais. Departamento de História. Universidade Federal de Mato Grosso, 2001;
55. Magalhães MCC, et. al. Migração e hanseníase em Mato Grosso. *Rev Bras Epidemiol* 2011; 14(3): 386-97;
56. Ignotti E, Cardoso de Paula R. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: Análise de indicadores selecionados no período de 2001 a 2010. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cap_9_saude_brasil_2010.pdf.
57. [http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/15/clipping-270112-\[15-300112-SES-MT\].pdf](http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/15/clipping-270112-[15-300112-SES-MT].pdf).

58. [http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/432/informacoes-regionais-de-saude-rondonopolis-\[432-271011-SES-MT\].pdf](http://www.saude.mt.gov.br/upload/documento/432/informacoes-regionais-de-saude-rondonopolis-[432-271011-SES-MT].pdf)
59. <http://www.agoramt.com.br/2012/01/secretaria-de-saude-registra-164-casos-de-hanseniose-em-rondonopolis/>
60. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>
61. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>
62. SINAN. www.saude.mt.gov.br/arquivo/2414
63. Cole S, Eiglmeier K, Parkhill J, James K, Thomson N, Wheeler P, Honoré N, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus *Nature* 2001; 409: 1007-1011;
64. Singh, P; Cole, S. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. Future Medicina, 2011;
65. Gomez-Valero L, Rocha EP, Latorre A, Silva FJ. Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: the dynamics of gene loss and genome reduction. *Genome Res* 2007; 17(8):1178–1185;
66. Stinear TP, Seemann T, Pidot S, et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res* 2007; 17(2):192–200;
67. Liu Y, Harrison PM, Kunin V, Gerstein M: Comprehensive analysis of pseudogenes in prokaryotes: widespread gene decay and failure of putative horizontally transferred genes. *Genome Biol* 2004; 5(9):R64;
68. Low, D.A., Braaten, B.A., Ling, G.V., Johnson, D.L., Ruby, A.L. Isolation and comparison of *Escherichia coli* strains from canine and human patients with urinary tract infections. *Infect. Immun*; 1988; 56, 2601–2609;
69. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990; Vol. 18, No. 24;
70. Arbeit, R.D., Arthur, M., Dunn, R., Kim, C., Selander, R.K., Goldstein, R. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Dis*, 1990; 161, 230–235;
71. Meiden MCJ, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Microbiology*, 1998; Vol. 95, pp. 3140–3145;
72. Monot M, et. al. Are Variable-Number Tandem Repeats Appropriate for Genotyping *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (7): 2291-2297;

73. Brum-Fontes AN. Genotipagem de isolados de *Mycobacterium leprae* de pacientes hansenianos no Brasil [tese de doutorado]. Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Maio de 2011;
74. Lupski JR, Roth JR, Weinstock GM. Chromosomal duplication in Bacteria, Fruit Flies, and Humans. *Am. J. Hum. Genet* 1996; 58:21-27;
75. Supply P, Magdalena J, Himpens S, Locht C. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular Microbiology* 1997, 26(5), 991-1003;
76. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vicent V, Gicquel B, Locht C. Variable number minisatellite-like regions in *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Molecular Microbiology* 2000; 36(3), 762±771;
77. Gillis T, et. al. Characterisation of Short tandem repeats for genotyping *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 2009; 80: 250–260;
78. Groathouse NA, Rivoire B, Kim H et al. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1666–72;
79. Young SK, et. al. Microsatellite Mapping of *Mycobacterium leprae* Populations in Infected Humans. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4931-4936;
80. Matsuoka M, Maeda S, KaiMet al. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *Int J Leprosy* 2000; 68: 121–28;
81. Shin YC, Lee H, Lee H et al. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4535–38;
82. Matsuoka M. Recent advances in the molecular epidemiology of leprosy. *Jpn. J. Leprosy* 2008; 78: 67-73;
83. Kimura M, Sakamuri RM, Groathouse NA, Rivoire BL, Gingrich D, Krueger-Koplin S. et al. Rapid Variable-Number Tandem-Repeat Genotyping for *Mycobacterium leprae* Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 2009,p 47: 1757–1766;
84. Zhang L, Budiawan T, Matsuoka M. Diversity of Potential Short Tandem Repeats in *Mycobacterium leprae* and application for Molecular typing. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43: 5221–5229;
85. Xing Y, et.al. VNTR typing studies of *Mycobacterium leprae* in China: Assessment of methods and stability of markers during treatment. *Lepr Ver* 2009; 80: 261–271.
86. Srisungram S, et.al. Molecular epidemiology of leprosy based on VNTR typing in Thailand. *Lepr Rev* 2009; 80: 280–289.

87. Hunter PR, Gaston MA. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. J. CLIN MICROBIOL 1988; p. 2465-2466;
88. Lana FCF, Lanza FM, Velásquez-Meléndez G, Branco AC, Teixeira S, Malaquias LCC. Distribuição da hanseníase segundo o sexo no Município de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. Hansen. Int 2003.; 28(2): 131-137;
89. Sakamuri RM, et.al. Population-Based Molecular Epidemiology of Leprosy in Cebu, Philippines. J. CLIN MICROBIOL 2009, p. 2844–2854;
90. Cardona-Castro N, et.al. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. Lepr Rev 2009; 80: 316–321;
91. Brum Fontes AN, Sakamuri RM, Dias Baptista IM, Ura S, Moraes MO, Martinez NA, et al. Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates. Lepr Rev 2009; 80, 302–315;
92. Brum Fontes AN, Gomes HM, Araujo MI, Albuquerque ECA, Dias Baptista IM, Moura MMF, et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* presente on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in diferente geographic regions of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2012, Vol. 107(Suppl. I): 143-149;
93. Shinde VA, et.al. VNTR typing of *Mycobacterium leprae* in South Indian leprosy patients. Lepr Rev 80, 290–301, 2009;
94. Weng X, Wang Z, Liu J, Kimura M, Black WC, Brennan P, et al. Identification and Distribution of *Mycobacterium leprae* genotypes in a Region of High Leprosy Prevalence in China: a 3-Year Molecular Epidemiological Study. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2007; p. 1728–1734;
95. IBGE, 2010. <http://censo2010.ibge.gov.br/>
96. Weng, X. M., Y. Wen, X. J. Tian, H. B. Wang, X. J. Tan, and H. Y. Li. Preliminary VNTR genotyping on 50 *M. leprae* isolates in China. J. Chin.Epidemiol 2006; 27:402–405;

Anexo 1

Nº Identificação indivíduo

(Etiqueta)

Nº Prontuário _____

FORMULÁRIO II – ENTREVISTA CASO NOVO de Hanseníase**1. Data (entrevista):** ____ / ____ / ____**2. Há quanto tempo mora neste endereço:** Anos: ____ Meses: ____ **88. Não se aplica****3. Nos últimos 10 anos já morou em outro endereço que não o atual?**1. Sim 2. Não **88. Não se aplica** 99. Não sabe informar**4. Em Rondonópolis/Igarapé-Açu/ Colônia do Prata?**

1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

4.1 Anos: ____ Bairro 1: _____

4.2 Anos: ____ Bairro 2: _____

5. Em outra cidade?

1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

5.1 Anos: ____ Cidade 1: _____ Estado: _____

5.2 Anos: ____ Cidade 2: _____ Estado: _____

6. Qual o curso mais elevado que o(a) senhor(a) concluiu?

1. Alfabetização

2. Fundamental incompleto

3. Fundamental completo (8ª série concluída)

4. Ensino Médio incompleto

5. Ensino Médio completo

6. Universidade concluída

7. Pós-graduação concluída

8. Analfabeto

88. Não se aplica

99. Não sabe informar

7. Qual sua situação trabalhista no momento?

7.1. Desempregado 1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

7.2. Empregado 1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

7.3. Autônomo 1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

7.4. Afastado/Licença Saúde 1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

7.5. Estudante 1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

7.6. Empregador 1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

7.7. Aposentado/Pensionista 1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

7.8. Outros 1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar

Especificar: _____

8. A renda familiar é aproximadamente:											
1. Menos que um salário mínimo 2. De 1 a 2 salários (inclusive) 3. De 2 a 4 salários (inclusive)	4. De 4 a 6 salários (inclusive) 5. Mais que 6 salários 6. Não tem renda 99. Não sabe informar										
9. Qual a situação do local onde você mora?											
1. Alugado 2. Casa própria 3. Abrigo	4. Sem teto 5. Cedida 99. Não sabe informar										
10. Sua residência tem água encanada:											
1. Sim 2. Não 99. Não sabe informar											
11. O esgoto da sua casa é tipo:											
1. Fossa 2. Céu aberto 3. Rede pública 99. Não sabe informar											
12. A casa do(a) senhor(a) tem quantos cômodos (considerar apenas quarto e sala):											
88. Não se aplica 99. Não sabe informar											
13. Na sua residência alguém teve ou tem a mesma doença que o (a) senhor(a)?											
1. Sim 2. Não 99. Não sabe informar											
13.1 Quando foi diagnosticado e tratado?											
Ano ____ ____ ____ ____ 8888. Não se aplica 9999. Não sabe informar											
13.2 Fez o tratamento completo?											
1.Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar											
13.3 E qual o esquema terapêutico?											
1. PQT/PB 2. PQT/MB 88. Não se aplica 99. Não sabe informar 3. Outros Especificar _____											
14. Nos últimos 10 anos conviveu com alguém fora da sua casa com a mesma doença?											
1. Sim 2. Não 99. Não sabe informar											
14.1 <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">1. Filho(a) </td> <td style="width: 33%;">4. Avô (ó) </td> <td style="width: 33%;">7. Mãe </td> </tr> <tr> <td>2. Esposo (a) </td> <td>5. Tio(a) </td> <td>8. Cunhado(a) </td> </tr> <tr> <td>3. Irmão (ã) </td> <td>6. Pai </td> <td>9. Outro </td> </tr> </table> Outro: especifique: _____		1. Filho(a)	4. Avô (ó)	7. Mãe	2. Esposo (a)	5. Tio(a)	8. Cunhado(a)	3. Irmão (ã)	6. Pai	9. Outro	Legenda 1. Sim 2. Não 88. Não se aplica 99. Não sabe informar
1. Filho(a)	4. Avô (ó)	7. Mãe									
2. Esposo (a)	5. Tio(a)	8. Cunhado(a)									
3. Irmão (ã)	6. Pai	9. Outro									

ENTREVISTA – CASO DE HANSENÍASE - DADOS CLÍNICOS

15. Tem outra doença?

1. Sim 2. Não 99. Não sabe informar

15.1 Qual?

1. Diabetes	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica
2. Reumáticas	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica
3. Cardiovasculares	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica
4. Gastrointestinais	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica
5. Outras	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica

Especificar _____

Especificar _____

16. Há quanto tempo notou o aparecimento dos primeiros sinais ou sintomas (manchas, caroços, dormência, obstrução nasal)?

Anos _____ Meses _____ 99. Não sabe informar

17. Morfologia das lesões:

1. Manchas hipocrômicas (lesões não elevadas esbranquiçadas)
1. Sim 2. Não
2. Áreas referidas hipo/anestésicas (excluir palmas, plantas e olhos)
1. Sim 2. Não
3. Placas (lesões planas com tamanho igual ou maior que 1cm)
1. Sim 2. Não
4. Pápulas (pequenas elevações superficiais medindo até 0,9cm)
1. Sim 2. Não
5. Nódulos (lesões palpáveis em profundidade de tamanho igual ou maior que 1cm)
1. Sim 2. Não
6. Infiltração Difusa (reservado só para casos na faixa virchowiana)
1. Sim 2. Não
7. Espessamento neural
1. Sim 2. Não
8. Obstrução nasal
1. Sim 2. Não

18. Número de lesões de pele

1. Uma 3. Três 5. Cinco
2. Duas 4. Quatro 6. Mais que cinco 7. Infiltrações

19. Delimitação das lesões (ver os bordos das lesões visíveis e assinalar)

1. Bem delimitadas 2. Mal delimitadas 3. Bem e mal delimitadas 88. Não se aplica

ENTREVISTA – CASO DE HANSENÍASE - DADOS CLÍNICOS

20. Localização das lesões/infiltração:

20.1 Cabeça/Pescoço	1. Sim	2. Não	
20.2 Tronco	1. Sim	2. Não	
20.3 Difusas	1. Sim	2. Não	
20.4 Membros: MSE	1. Sim	2. Não	
MSD	1. Sim	2. Não	
MIE	1. Sim	2. Não	
MID	1. Sim	2. Não	

21. Modo de aparecimento da lesão inicial:

1. Abrupto (hs ou alguns dias) 2. Insidioso (semanas, meses ou anos)

99. Não sabe informar

22. Classificação Clínica Ridley-Joppling:

1. MHI 3. MHDT 5. MHDV 7. Neural Puro

2. MHT 4. MHDD 6. MHV 77. Não realizado

23. Classificação Clínica Madri:

1. MHI 2. MHT 3. MHD 4. MHV 77 . Não realizado

24. Classificação Clínica Operacional:

1. PB 2. MB 77. Não realizado

25. Está em reação:

1. Tipo I 3. Não especificada

2. Tipo II 4. Tipo I e Tipo II 88. Não se aplica

26. Como é a reação?

1. Febre	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica	
2. Dor nas lesões	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica	
3. Neurite	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica	
4. Comprometimento Ocular/Visceral	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica	
5. Placas Eritematosas	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica	
6. Edema de mãos e pés	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica	
7. Artrite	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica	
8. Nódulos	1. Sim	2. Não	88. Não se aplica	

27. Tratamento para MH ?

1. PQT/PB

2. PQT/MB

3. Outros Especificar _____

28. Grau de incapacidade no diagnóstico

0. Grau Zero

1. Grau 1

2. Grau 2

77. Não realizado

28.1 Grau de incapacidades em cada um dos locais abaixo especificados:

1. Olho Direito	0. Grau Zero	1. Grau 1	2. Grau 2	77. não realizado
2. Olho Esquerdo	0. Grau Zero	1. Grau 1	2. Grau 2	77. não realizado
3. Mão direita	0. Grau Zero	1. Grau 1	2. Grau 2	77. não realizado
4. Mão esquerda	0. Grau Zero	1. Grau 1	2. Grau 2	77. não realizado
5. Pé direito	0. Grau Zero	1. Grau 1	2. Grau 2	77. não realizado
6. Pé esquerdo	0. Grau Zero	1. Grau 1	2. Grau 2	77. não realizado

MATERIAL COLETADO

1. Mitsuda

1. Sim

2. Não

2. Swab nasal

1. Sim

2. Não

3. Sorologia

1. Sim

2. Não

4. Sangue com EDTA

1. Sim

2. Não

5. Biopsia em formol

1. Sim

2. Não

6. Biopsia em RNA later

1. Sim

2. Não

7. Baciloscopia

1. Sim

2. Não

Setores	Bairros	PSF / REFERENCIA
SETOR I	Distrito Industrial Rondonópolis	
	Jardim das Paineiras	
	Jardim Maracanã	
	Jardim Maria Tereza	
	Jardim Morumbi	
	Jardim Rui Barbosa	PSF Industrial
	Jardim Tancredo Neves	PS Paineiras
	Loteamento Pedra 90	PSF Parque Universitário
	Parque Residencial Ana Carla	PSF Mamed
	Parque Residencial Oasis	PSF Vila Olinda - Dom Bosco
	Parque Residencial Universitário	
	Residencial Dona Magnólia	
	Vila Estrela Dalva	
	Vila Mamede	
	Vila Olinda	
	Vila Rosaly	
	Vila São Paulo	

SETOR II	Áreas Goulart	
	Cidade Salmen	
	Distrito Industrial Augusto Bortoli Razia	
	Jardim Belo Horizonte	
	Jardim Ipanema	
	Jardim Lourdes	
	Jardim Maria Vitorasso	
	Loteamento Alves	
	Loteamento Jacob	PSF São Francisco
	Núcleo Habitacional Verde Teto	PS Verde Teto
	Parque Industrial Fabrício Vitorasso Mendes	PSF Canaã
	Parque Industrial Goulart	PS Vila Goulart
	Parque Industrial Vitorasso	
	Recanto Maria Flavia	
	Recanto Santa Elza	
	Residencial Bela Vista	
	Vila Amizade	
	Vila Baixa	
	Vila Boa Esperança	
	Vila Canaã	
	Vila Goulart	
	Vila Goulart A	
	Vila Goulart B	
	Vila Mariley	
	Vila Olímpica	
	Vila Portal das Águas	
	Vila Salmen	
	Vila Salmen 2º parte	

Setores	Bairros	PSF/Referencia
SETOR III	Bairro Aeroporto	
	Jardim Adriana	
	Jardim América	
	Jardim do Sol	
	Jardim HD	
	Jardim Kamal Jublat	
	Jardim Liberdade	
	Jardim Liberdade II	PSF Jardim Adriana
	Jardim Novo Horizonte	PSF Monte Líbano
	Jardim Santa Marta	PSF Joao de Barro
	Loteamento Pe. Lothar	PSF Vila Rica
	Monte Líbano	
	Projeto João de Barro	
	Residencial Antonio Geraldine	
	Residencial Dom Osório Stoffel	
	Residencial Jardim José Sobrinho	
	Residencial Joao Moraes	
	Residencial Quitéria Teruel	
	Vila Rica	

SETOR IV	Jardim Carlos Bezerra	
	Jardim Carlos Bezerra II	
	Jardim Copacabana	
	Jardim Dinalva Muniz	
	Jardim Eldorado	
	Jardim Eldorado 2ª parte	
	Jardim Marajó	
	Jardim Nilmara	
	Jardim Progresso	PSF Serra Dourada
	Jardim São Bento	CS Conjunto São José
	Jardim Serra Dourada 1ª parte	PS Marechal Rondon
	Jardim Serra Dourada 2ª parte	PSF Vila Verde
	Jardim Três Poderes	
	Jardim Reis	
	Núcleo Habitacional Conjunto São José I	
	Núcleo Habitacional Conjunto São José II	
	Núcleo Habitacional Conjunto São José III	
	Núcleo Habitacional Marechal Rondon	
	Parque Residencial Nova Era	
	Residencial Buriti	
	Residencial Edelmira Querubin	
	Vila União	
	Vila Verde	

SETOR V	Cidade Natal	
	Dom Oscar Romero	
	Jardim Brasil	
	Jardim da Mata	
	Jardim das Flores	
	Jardim Dom Bosco	POLICLINICA
	Jardim Ipiranga	PSF Ipiranga
	Jardim Itapua	PSF Itapuã
	Jardim Marisol	PSF Padre Rodolfo
	Jardim Padre Rodolfo	PSF Sumaré
	Jardim Santa Fé	PSF Vila Mineira
	Jardim Sumaré	
	Jardim Taiti	
	Loteamento Padre João Bosco Bunier	
	Loteamento Padre Ezequiel Ramim	
	Residencial Lageadinho	
	Vila Clarion	
	Vila Ipiranga	
	Vila Itamaraty	
	Vila Mariana	
	Vila Mineira	
	Vila Operaria	

SETOR VI	Jardim Assunção	
	Jardim Bela Vista	
	Jardim Gramado	
	Jardim Gramado II	
	Jardim kênia	
	Jardim Luz D' yara	
	Jardim Marialva	PSF Assunção
	Jardim Modelo	PSF Luz D'Yara
	Jardim Nossa Senhora da Gloria	PSF CAIC
	Jardim Primavera	PSF Primavera
	Jardim Primavera I	PSF Ipê
	Jardim Rivera	
	Jardim Santa Barbara	
	Jardim Tropical	
	Loteamento Olivina	
	Loteamento Valeria Cristina	
	Residencial Hortência	
	Vila Carvalho	
	Vila Castelo	
	Vila Esplanada	
	Vila Florisbela	
	Vila Ipê	
	Vila Iracy	
	Vila Olga Maria	
	Vila Santa Catarina	
	Vila Santa Catarina II parte	
	Vila Valeria	

SETOR VII	Bairro Santa Cruz	
	Centro B	
	Jardim Beira Rio	
	Jardim Brasília	
	Jardim Brasília II	
	Jardim Cuiabá	
	Jardim dos Pioneiros	
	Jardim Ebenezer	
	Jardim Moradores dos Bandeirantes	
	Jardim Oliveira	
	Jardim Paulista	PSF Jambrapi
	Jardim Santa Clara	PSF Santa Clara
	Jardim Santa Clara 2ª parte	PSF. Bom Pastor
	Jardim Santa Rosa	
	Jardim Urupês	
	Jardim Urupês A	
	Jardim Vera Cruz	
	Loteamento Cellos	
	Loteamento Jambalaia 1 parte	
	Loteamento Jambalaia 2 parte	
	Loteamento Kennedy	
	Loteamento Santos Dumont	
	Prolongamento Cellos	
	Vila Bom Pastor	
	Vila Dom Pedro	
	Vila Duarte	
	Vila Esperança	
	Vila Planalto	
	Vila Santo Antonio	
	Vila São Jose	

SETOR VIII	Bairro La Salle ag-31	
	Bairro La Salle ag-32	
	Centro A	
	Jardim Esmeralda	
	Jardim Guanabara	C.S. Guanabara
	Jardim Pindorama	PS Pindorama
	Loteamento Nossa Senhora Aparecida	
	São Francisco	
	Vila Andréia	
	Vila Birigui	
	Vila José Luiz	
	Vila Maria	
	Vila Marinopolis	
	Vila Santa Luzia	

SETOR IX	Jardim Belo Panorama	
	Jardim Gloria	
	Jardim Residencial São Jose	
	Loteamento Nossa Senhora do Amparo	PSF N.S. do Amparo
	Loteamento Santa Esther	C.S. Cohab
	Loteamento Santa Laura	PSF Vila Cardoso
	Núcleo Habitacional Participação	
	Núcleo Habitacional Rio Vermelho	
	Parque Real	
	Vila Aurora	
	Vila Aurora III parte	
	Vila Cardoso	
	Vila Duete Vilalba	
	Vila Poroxo	
	Vila Santa Maria	
	Vila São Pedro	
	Vila São Sebastião I	

SETOR X	Condomínio Residencial Sunflower	
	Coophalis	
	Jardim Iguassu	
	Jardim Lucia Maggi	
	Jardim Mato Grosso	PSF Jardim Iguaçu
	Jardim Rondônia	PSF Cidade Alta
	Parque Residencial Cidade Alta	
	Setor Residencial Granville I	
	Setor Residencial Granville II	
	Vila São Sebastião	

SETOR XI	Chácara Nossa Senhora da Guia	
	Chácara Paraíso	
	Chácara Pica Pau	
	Chácara Residencial Parque das Nações	
	Conjunto Habitacional Cidade de Deus	
	Jardim Atlântico	PSF Jardim Atlantico - Europa
	Jardim Europa	PSF Parque São Jorge
	Loteamento Andre Maggi	
	Loteamento Parque das Rosas	
	Parque São Jorge	
	Residencial Azaléia	
	Residencial Bispo Casaldaglia	
	Residencial João Antonio Fagundes	
	Residencial Margaridas	
	Residencial Paraíso	
	Residencial Sitio Farias	
	Sitio Farias	

SETOR XII	Chácara Antonio Barbosa	
	Jardim Arco Iris	
	Jardim Village do Cerrado	
	Parque Sagrada Família	
	Residencial Alfredo de Castro	PS Paulista
	Residencial Altamirano	
	Residencial Scheffers Ville	
	Terra Nova	
	U.F.M.T.	
	Vila Paulista	

DISTRITO	Boa Vista	
	Cabeceira do Almoço	
	Campo Limpo	
	Naboreiro	
	Nova Galileia	
	Rio Vermelho Bajara	
	Vila Bueno	