

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**COMPARAÇÃO DE QUATRO PARES DE *PRIMERS* NA
UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA
DE *M. LEPRAE* EM BIÓPSIAS DE LESÃO DE PELE DE PACIENTES
COM HANSENÍASE**

Márcia Moura Nunes

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências
Biológicas

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**COMPARAÇÃO DE QUATRO PARES DE *PRIMERS* NA
UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA
DE *M. LEPRAE* EM BIÓPSIAS DE LESÃO DE PELE DE PACIENTES
COM HANSENÍASE**

MÁRCIA MOURA NUNES

Dra. ISABELA MARIA BERNARDES GOULART

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**COMPARAÇÃO DE QUATRO PARES DE *PRIMERS* NA
UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA
DE *M. LEPRAE* EM BIÓPSIAS DE LESÃO DE PELE DE PACIENTES
COM HANSENÍASE**

Márcia Moura Nunes

Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart
Instituto de Genética e Bioquímica

Coordenadora Professora Dra. Vera Lúcia

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

COMPARAÇÃO DE QUATRO PARES DE *PRIMERS* NA
UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA
DE *M. LEPRAE* EM BIÓPSIAS DE LESÃO DE PELE DE PACIENTES
COM HANSENÍASE

Márcia Moura Nunes

Aprovada pela banca examinadora em / / Nota



Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

Msc. Adriana Freitas Neves

Msc. Karina Marangoni

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2007

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por toda luz que colocou em meu caminho, que foi fundamental em minha vida, não permitindo que eu desistisse dos meus ideais nem nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo, Thiago, pelo companheirismo e cumplicidade. Obrigada por todas as vezes que você me estendeu a mão afirmando que eu deveria levantar a cabeça e continuar, pois nenhum problema seria maior do que minha vontade de vencer, sempre me pedindo para não deixar que nada, nem ninguém me desanimasse. Amo você!

Aos meus pais, Reginaldo e Marlene, pelo amor, carinho e apoio incondicionais. Agradeço cada momento que vocês me proporcionaram, e agradeço também por terem acreditado em mim, me dando tanta força para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, Joel, meu amigo, por nunca ter me negado um conselho, um sorriso, uma brincadeira... e mesmo em silêncio, por estar sempre ao meu lado. Apenas a certeza de que posso sempre contar com você me conforta... Adoro seu bom humor e amo você!

E quero dizer que a certeza de ter vocês, a minha família, é a melhor sensação do mundo, pois sei que, aconteça o que for, sempre estaremos juntos, seja em bons ou em maus momentos, em dificuldades ou alegrias, pois sabemos que o que acontece em nossas vidas, tem uma razão, e cabe a nós aceitarmos e aprendermos com tudo aquilo que passamos. E com certeza, se não fosse por vocês, hoje eu não estaria aqui. E se sinto a realização de um sonho, se hoje alcancei mais um objetivo, eu devo isto a todos vocês, minha família. Adoro vocês!!!

Aos amigos Lucas, Máisa, Iêda, por todos os conselhos e risadas juntos. O companheirismo de vocês foi fundamental para minha formação...

Aos colegas e professores da graduação, em especial à Cecília Lomônaco e à Fernanda Nogueira-Ferreira, por não me deixarem desistir; ao professor Oswaldo Marçal, por me aceitar no estágio em Ecologia de Parasitos desde o segundo período da graduação... Obrigada.

Aos amigos de pesquisa em Hanseníase... Érica, Janaina, Luciano, Thiago e Mariana, pelas muitas horas de discussão dos trabalhos, e principalmente pelo apoio e pelas

risadas, porque mesmo trabalhando muito, nós sempre achamos um jeito para nos divertirmos... e principalmente à Karina, pela enorme força que tem me dado... Obrigada!

A Karina, Adriana, Érica e Ana Paula, que neste momento decisivo em minha vida, me deram tanto apoio, tanto com discussões teóricas quanto com palavras de incentivo e de amizade. Um muito obrigada especial!

Aos demais amigos do Laboratório de Genética Molecular: Alexandra, Ana Paula Carneiro, Andréia, Carlos, Carolina, Elisângela, Fabiana, Fausto, Flávia, Gabriela, Guilherme, Jaqueline, Juliana, Karla, Luciana, Patrícia, Paula Cristina, Paula Souza, Renata, Rone, Sílvia, Tatiana, Thaíse, Thiago, Washington.

A Prof. Isabela Maria Bernardes Goulart, pelas oportunidades e confiança em meu trabalho, pelo respeito aos doentes e pelo amor com que se propõe a realizar suas atividades. Obrigada pelos ensinamentos e pela orientação!

Ao Prof. Luiz Ricardo, pela oportunidade de trabalhar com o que sempre sonhei... Genética e Biologia Molecular. Obrigada pela confiança e respeito, e pelo exemplo de como ser um Geneticista Molecular.

A toda equipe do Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária, pelo fundamental apoio prestado ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos pacientes de hanseníase, que foram fundamentais na realização deste trabalho.

A todos que momentaneamente não foram lembrados, mas que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

Hanseníase é uma doença crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear. Suas formas clínicas são definidas levando-se em conta padrões imunológicos, formando um amplo espectro intimamente proporcional à potencialidade de resposta do hospedeiro ao parasita. A mucosa nasal é a principal porta de saída de bacilos de pacientes com hanseníase multibacilar não tratados, daí a importância de termos um diagnóstico de certeza, para que todos os casos da doença possam ser diagnosticados e tratados adequadamente conforme sua classificação operacional, evitando assim, as deformidades físicas causadas pelos danos neurais (que ocorrem nos casos mais graves da doença). No presente estudo foram analisados quatro pares de *primers*, que ampliam fragmentos de 372, 130, 89 e 78pb, para detectar a presença de DNA de *Mycobacterium leprae* em amostras de biópsias de pele de 88 pacientes com diagnóstico de hanseníase; foi usado um grupo controle de 35 pacientes do CREDESH, negativos para esta doença. O fragmento que amplifica 130pb detectou 59.1% dos pacientes, seguido do fragmento amplificado de 78pb, com 52.3%. Os fragmentos amplificados de 372pb e 89pb detectaram 43.2% e 42.1% respectivamente, enquanto que o IB de pele foi positivo em 40.9%, concordando com os valores encontrados na literatura, que permanecem entre 36 e 41%. O *primer* que amplifica fragmentos de 130pb detectou 34.6% dos pacientes negativos para 372pb; 38.4% dos negativos para 89pb e 21.1% dos negativos para o 78pb e deixou de detectar 13.8%, 11.1% e 13.8% dos casos positivos para estes mesmos pares de *primers*. A PCR com *primer* que amplifica fragmentos de 130pb concordou em 86,1% com o IB de pele, e detectou 42,3% dos pacientes negativos para este teste. A positividade encontrada neste estudo com os pares de *primers* que amplificam os fragmentos de 130pb e 78pb concordaram com a literatura, que relata valores entre 50,0% e 80,0%. A não-deteção pelos demais pares de *primers* que amplificam 372, 89 e 78pb pode ter ocorrido por limitações na PCR, e por isso novos estudos devem ser feitos, principalmente testando outras técnicas como Nested-PCR, PCR em tempo real e RT-PCR. Obteve-se que a maior positividade dos testes é obtida quando associamos os testes moleculares com o *primer* de 130pb ao teste baciloscópico, mantendo boa especificidade e

acurácia, e aumentando assim, a sensibilidade do teste, e por isso, preconizamos o uso da associação destes dois testes como diagnóstico de certeza de hanseníase.

Palavras chave: PCR, *primer*, diagnóstico, hanseníase

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1. Aspectos Gerais..... | 1 |
| 2. Situação epidemiológica da hanseníase..... | 2 |
| 3. Vias de transmissão..... | 3 |
| 4. Diagnóstico da hanseníase..... | 4 |
| | |
| OBJETIVOS..... | 7 |
| | |
| CASUÍSTICA..... | 8 |
| 1. Seleção de pacientes..... | 8 |
| 2. Aspectos éticos..... | 9 |
| | |
| MÉTODOS..... | 10 |
| 1. Coleta de biópsias de pele..... | 10 |
| 2. Extração de DNA..... | 10 |
| 3. PCR..... | 11 |
| 4. Especificidade e Sensibilidade dos Testes..... | 12 |
| 5. Análises Estatísticas..... | 12 |
| | |
| RESULTADOS..... | 12 |
| | |
| DISCUSSÃO..... | 17 |

CONCLUSÕES.....20

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFIA.....21

ANEXO I.....28

ANEXO II.....29

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 01** – Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo contendo os produtos das extrações de DNA total de biópsia de pele de pacientes de hanseníase. Centro de Referência em Hanseníase - Dermatologia Sanitária, UFU/SUS-MG..... 11
- Figura 02** Representação da PCR para diagnóstico do *M. leprae* por 4 diferentes pares de *primers* que amplificam 372, 130, 89 e 78 pares de base de DNA. Gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo. 1 – 5: reação para os produtos de 372pb; 7 -11 reação para os produtos de 130pb; 13 – 17: reação para os produtos de 89pb; 19 – 23: reação para os produtos de 78pb; 6, 12, 18, 24: controles negativos das reações; M: marcador de 100pb..... 12
- Tabela 01:** Positividade encontrada para os quatro pares de *primers* e para o IB de pele, evidenciando as percentagens encontradas em cada forma clínica, para cada teste..... 13
- Tabela 02** Frequências de concordâncias entre os resultados obtidos pelo IB de biópsias de pele e os resultados encontrados pela PCR com os quatro diferentes pares de *primers*..... 14
- Tabela 03:** Relação entre positividade para os fragmentos amplificados pelos quatro pares de *primers* pelo Índice Baciloscópico..... 14
- Tabela 04:** Validação dos parâmetros para produtos amplificados por PCR (372pb, 130pb, 89pb e 78pb) e IB no diagnóstico do *M. leprae* em biópsias de pele de pacientes com hanseníase..... 15
- Tabela 5:** Comparação da eficiência da PCR do *M. leprae* pelo par de *primers* que geram amplicons de 130pb com pares de *primers* que amplificam 372, 89 e 78 pb.

INTRODUÇÃO

1. Aspectos Gerais

Hanseníase é uma doença crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear fagocitário e células de Schwann (GOULART *et al.*, 2002). Ele é considerado de alta infecciosidade, por ser capaz de contaminar um grande número de indivíduos, mas de baixa patogenicidade, tendo em vista que apenas uma pequena parte das pessoas infectadas, aproximadamente 10%, efetivamente chegam a apresentar sinais da doença após um período usual de incubação que atinge em média, de 2 a 7 anos (BRASIL, 2002).

Suas formas clínicas são definidas levando-se em conta padrões imunológicos, formando um amplo espectro intimamente proporcional à potencialidade de resposta do hospedeiro ao parasita (GOULART *et al.*, 2002).

Os pacientes de hanseníase são classificados clinicamente de acordo com a escala de Ridley-Jopling em: virchovianos (V), dimorfo-virchovianos (DV), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-tuberculóides (DT), tuberculóides (T) ou indeterminadas (I) (RIDLEY & JOPLING, 1966). A manifestação da forma indeterminada (I) é insuficientemente diferenciada para permitir classificação, podendo evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos clínicos (GOULART *et al.*, 2002).

Porém, para efeitos operacionais de alocação em esquemas de tratamento, estas formas clínicas são divididas em Paucibacilares (PB) ou Multibacilares (MB) de acordo com o índice baciloscópio (IB) (WHO, 1982). As formas paucibacilares são: indeterminada e tuberculóide; e as multibacilares são: dimorfa e virchoviana (TALHARI & NEVES, 1997). No entanto, os diferentes sistemas de classificação clínica apresentam disparidades na capacidade de detectar os multibacilares (sensibilidade) e identificar corretamente os paucibacilares (especificidade) (CRIPPA *et al.*, 2004).

Pacientes com hanseníase tuberculóide têm uma forte imunidade celular, mas têm baixos níveis de anticorpos. Observa-se uma resposta imune celular específica com participação de linfócitos, principalmente do tipo TCD4+, típico do padrão Th1, que apresenta citocinas típicas (IL-2 e INF- γ) e atuam no sentido de aumentar a imunidade

mediada por células (MOSMANN *et al.*, 1986; YAMAMURA *et al.*, 1991). (YAWALKAR *et al.*, 2002).

Nos pacientes dimorfos a progressiva redução da resposta imune mediada por célula é acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosas, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos (GOULART, *et al.*, 2002). No pólo virchoviano (VV e DV) há uma ausência de resposta celular específica aos antígenos do *Mycobacterium leprae*, com predomínio da resposta Th2 e exarcebação da resposta humoral, medida pela determinação dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 (glicolípido fenólico presente na superfície do *Mycobacterium leprae*), por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) e pelo teste do ML-flow (GOULART *et al.*, 2002).

Avaliar a exposição ao bacilo, o início da infecção e da doença, é difícil pelo fato do *M. leprae*, não poder ser cultivado *in vitro*, por ter longo período de incubação, além de existirem formas paucibacilares que são dificilmente detectadas.

2. Situação epidemiológica da hanseníase

A Organização Mundial de Saúde (OMS), através de programas governamentais bem como pelo apoio do Banco Mundial e de Organizações não Governamentais (ONGs), havia estabelecido a eliminação da hanseníase como meta até o ano de 2005. Alguns países como Angola, Brasil, República da África Central, República Democrática do Congo, Moçambique, Nepal e Tanzânia ainda apresentam altos índices de prevalência, concentrando 74% do total de casos registrados no início de 2005 (WHO, 2005).

Nos dias de hoje a hanseníase ainda constitui um problema de saúde pública no Brasil, o que exige um plano de aceleração e de intensificação das ações de eliminação e de vigilância resolutiva e contínua (BRASIL, 2007). O Brasil registrou no final de 2005 um coeficiente de prevalência de hanseníase de 1,48 casos/10.000 habitantes (27.313 casos em curso de tratamento em dezembro de 2005) e um coeficiente de detecção de casos novos de 2,09/10.000 habitantes (38.410 casos novos em dezembro de 2005); a região sudeste apresentou taxa de prevalência de 0,60 casos/10.000 habitantes e coeficiente de detecção de 0,88/10.000 habitantes (BRASIL, 2007).

Até o final de 2006, Minas Gerais registrou 2.368 doentes em tratamento, o que corresponde a uma taxa de prevalência de 1,2 casos/10.000 habitantes; taxa que em

2005 foi de 1,5/10.000 habitantes. A meta da Secretaria do Estado de Saúde (SES) para 2007 é atingir o índice de menos de um caso por 10 mil habitantes, proposta feita pela OMS para a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública nos países detectados como endêmicos em 1991 (MINAS GERAIS/SES-MG, 2007).

Em Uberlândia, até o mês de Novembro de 2006, a taxa de prevalência foi de 0,73/10.000 habitantes, enquanto que em 2005 esta mesma taxa foi de 1,3/10.000 habitantes; e taxa de detecção deste município foi de 0,97/10.000 habitantes no final do ano de 2006 (MINAS GERAIS/SES-MG, 2007).

Os dados do ano de 2005 revelaram a necessidade de focalizar e agilizar o diagnóstico de hanseníase em menores de 15 anos que podem ser contactantes de casos ainda não-assistidos e não-identificados pelo sistema de saúde, portanto, essa é uma ação da maior significância para as estratégias subseqüentes. Assim, ações devem ser desenvolvidas para o alcance da meta de eliminação da hanseníase nos municípios brasileiros até o ano de 2010, conforme Plano de Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010 (BRASIL, 2007).

3. Vias de transmissão

O contato com o *M. leprae* não precisa ser necessariamente “pele a pele” como se acreditava previamente, porque a mucosa nasal é a principal porta de saída de bacilos em pacientes com hanseníase multibacilar não tratados (DE WIT *et al.*, 1993; CARDOSO, 2006). Os bacilos são raramente encontrados na pele intacta, sendo apenas as lesões ulceradas porta de saída de bacilos (YAWALKAR, 1992). Por outro lado, pacientes virchovianos não tratados podem liberar até 100 milhões de bacilos de hanseníase de suas secreções nasais diariamente (WATERS, 1981).

Atualmente discute-se a possibilidade de que não somente os doentes de hanseníase liberem bacilos, mas também seus contatos sadios portadores de *M. leprae* na mucosa nasal como encontrado em pesquisas com *swab* nasais de contactantes (HATTA *et al.* 1995; RAMPRASAD *et al.*, 1997; GOULART *et al.*, 2002; PATROCÍNIO *et al.*, 2005; CARDOSO, 2006).

Considera-se que a transmissão do *M. leprae* se dê pelo contato de pessoas suscetíveis à doença com os doentes não tratados das formas multibacilares, grupo

dimorfo (D) e forma virchoviana (V), ou seja, com baciloscopia positiva. No entanto, acredita-se que a transmissão por pessoas sem nenhum sintoma de hanseníase, porém com a presença do *M. leprae* na mucosa nasal possa ocorrer (CARDOSO, 2006; TALHARI & NEVES, 1997).

4. Diagnóstico em hanseníase

O diagnóstico clínico é feito pela constatação de lesões cutâneas hipopigmentadas ou eritematosas, presença de máculas, infiltração, pápulas ou nódulos. Outros sinais clínicos são anestesia das lesões dérmicas e espessamento de nervos periféricos (TALHARI & NEVES, 1997).

Além do diagnóstico clínico, realiza-se o exame baciloscópico nos pacientes com suspeita de hanseníase. Esse exame é feito através da coleta de material nos lóbulos auriculares, cotovelos, joelhos e de duas áreas infiltradas. Após a realização de procedimentos laboratoriais adequados, o resultado é negativo quando nenhum bacilo é encontrado em cem (100) campos e é positivo quando se encontram mais de dez (10) bacilos em cem (100) campos (TALHARI & NEVES, 1997).

Ainda hoje, os exames clínico-neurológicos e a baciloscopia são considerados como padrão de diagnóstico de hanseníase. Porém, são necessários no mínimo 100.000 bacilos por grama de tecido para que a detecção pela coloração de BAAR (bacilo álcool-ácido resistente) seja confiável (SHEPARD & McRAE, 1968), e por isso, sua sensibilidade é baixa (TALHARI & NEVES, 1997), principalmente em pacientes com características tuberculóides da doença, onde os bacilos são raros ou ausentes.

A confirmação do diagnóstico da hanseníase em casos duvidosos mostra-se como um importante motivo para a realização de exames histopatológicos. Como em qualquer outra doença, espera-se um resultado definitivo, entretanto, ele apresenta algumas limitações, pois nem sempre se detectam bacilos em pacientes com sintomatologia característica, já que tem havido controvérsias sobre a eficácia da microscopia para a identificação do bacilo da hanseníase em esfregaços e biópsias (HARDAS *et al.*, 1981).

Em virtude da dificuldade de encontrar bacilos álcool-ácido resistentes através de métodos histopatológicos nas fases iniciais da doença, a Reação em Cadeia da

Polimerase (PCR) tem sido usada com sucesso na detecção de bacilos presentes em pequenas quantidades nos tecidos (DONOGHUE *et al.*, 2001).

A recente utilização da PCR trouxe uma oportunidade sem precedentes da detecção do *M. leprae* de forma rápida, sensível e específica (YOON *et al.*, 1993). Sua sensibilidade é limitada a aproximadamente cinco (5) bactérias presentes no material coletado (RAMAPRASAD *e al.*, 1997). Rafi e colaboradores (1994) descreveram um estudo em que o limite de detecção era de aproximadamente uma bactéria, a especificidade e sensibilidade da PCR dependem das seqüências dos *primers* selecionados para iniciar a reação.

Ela tem sido amplamente usada para diagnósticos e estudos epidemiológicos da hanseníase (KRAMME *et al.*, 2003; CHAE *et al.*, 2002; DONOGHUE *et al.*, 2001; JAMIL *et al.*, 1993; KLATSER *et al.*, 1993; PATTYN *et al.*, 1993; SANTOS *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 1992). Várias seqüências já foram descritas para a detecção do *M. leprae* tais como seqüências de DNA que codificam os antígenos 18-kDa, 36-kDa e 65-kDa, ou as que não codificam antígenos, como aquelas repetitivas do *M. leprae* ou de RNA ribossômico (MIRSA *et al.*, 1995).

Alguns trabalhos têm mostrado boas perspectivas com relação à detecção do *M. leprae* em várias amostras (sangue, *swabs*, pele) de pacientes portadores de hanseníase por PCR (DE WIT *et al.*, 1991; FIALLO *et al.*, 1992; DE WIT *et al.*, 1993; YOON *et al.*, 1993; WICHITWECHKARN *et al.*, 1995; PATROCÍNIO *et al.*, 2005).

Tem-se obtido resultados também com PCR tempo-real para *M. leprae* (KRAMME *et al.*, 2003; SHAMSI *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2006) e também para *Mycobacterium ulcerans* (RONDINI *et al.*, 2003). Phetsuksiri e colaboradores (2006) descreveu o uso de RT-PCR para a detecção de RNA do bacilo de hanseníase com o intuito de verificar sua viabilidade nas amostras.

Assim, melhorar o diagnóstico de hanseníase é uma necessidade constante, visando eliminar os focos de infecção, quebrar a cadeia de transmissão e permitir um controle efetivo da doença (GOULART, 1995). E para isto, a PCR que detecta o DNA do *M. leprae* pode ser de grande valia para modificar o padrão ouro de diagnóstico em hanseníase, principalmente nas formas indeterminada e tuberculóide, nas quais os métodos convencionais (baciloscopias) não conseguem detectar o *Mycobacterium leprae* em amostras de esfregaços dérmicos e de biópsias de lesões de pele (KANG *et al.*, 2003).

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Utilizar quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores da reação de PCR (*primers*) específicos ao *Mycobacterium leprae*, que amplificam fragmentos de tamanhos diferentes entre si (372 pb; 130 pb; 89 pb e 78pb), para determinar os casos de presença do DNA do bacilo em amostras de tecido dos pacientes com hanseníase, correlacionando-os com a forma clínica e classificação operacional, e ainda com o Índice Baciloscópico (IB) de lesão de pele.

Objetivos específicos:

1. Otimizar a Reação em Cadeia da Polimerase, a fim de detectar o DNA de *M. leprae*, correlacionando-a com as diferentes formas clínicas da doença, conforme o espectro de Ridley & Jopling (1966), e classificação operacional.
2. Comparar a eficiência dos diferentes pares de *primers* específicos para o *M. leprae*, correlacionando-os com os exames baciloscópicos convencionais de biópsias de lesão de pele em pacinetes com hanseníase.
3. Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia de cada par de *primer* para o diagnóstico de hanseníase, principalmente das formas paucibacilares, uma vez que análises histopatológicas raramente detectam bacilos nesses casos.

CASUÍSTICA

1. SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram convidados a participar do estudo 88 pacientes com diagnósticos de hanseníase, virgens de tratamento, atendidos no Centro de Referência Nacional em Hanseníase com ênfase em Dermatologia Sanitária (CREDSH), Hospital de Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU), em suas duas Unidades, Ambulatório Central e Centro de Saúde - Escola (CSE) – Jaraguá.

Para classificação clínica, os pacientes foram submetidos a exames dermatoneurológicos, com descrição detalhada das características macroscópicas das lesões, quantidade e distribuição, que foram mapeadas em diagrama corporal contido nos prontuários. Foram realizados teste de Mitsuda, teste sorológico pelo ML-Flow para complementar a classificação e Índice Baciloscópico (IB) de biópsias de lesões de pele para exame histopatológico. Estes resultados foram comparados com os resultados obtidos pelas PCRs feitas com os quatro pares de *primers*.

A classificação das formas clínicas dos pacientes foi feita segundo a escala de Ridley & Jopling (1966), dividindo-os em seis (6) formas clínicas conforme a imunidade celular e a carga bacilar. A classificação operacional final de pacientes atendidos no CREDSH/HC/UFU considerou que os pacientes paucibacilares (PB) apresentavam ML-Flow negativo e baciloscopia do esfregaço dérmico negativa e pacientes multibacilares (MB) apresentavam ML-Flow diferente de zero e/ou baciloscopia de esfregaço dérmico positiva, independentemente do número de lesões.

Foram convidados 35 pacientes do CREDSH para compor o grupo controle deste estudo. As biópsias foram coletadas e analisadas, sendo que todos tiveram resultados negativos para hanseníase, e foram diagnosticados positivamente para outras patogenias. O histórico dos pacientes foi analisado e somente foram convidados aqueles pacientes que não tinham antecedentes de hanseníase.

2. ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa faz parte do projeto temático intitulado “Caracterização Imunológica e Molecular de Pacientes com Hanseníase e seus Comunicantes para Identificação de Grupos de Risco”, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU por meio do parecer nº099/2003 (Anexo I). Os pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II), e estavam conscientes de que poderiam desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que houvesse prejuízo próprio.

MÉTODOS

1. COLETA DE BIÓPSIAS DE PELE

Iniciou-se com anti-sepsia da região com álcool iodado, seguida de anestesia local subcutânea de lidocaína a 2%. Incisou-se, em cunha, com bisturi, obedecendo às linhas de tensão da pele, retirando um fragmento de aproximadamente 1 cm na sua maior extensão com mononylon 2-0, pontos separados e curativo.

Uma parte da amostra foi acondicionada em papel alumínio esterilizado e mergulhada, em seguida, em nitrogênio líquido para ser encaminhado ao Laboratório do CREDSH/UFU, anexo ao Laboratório de Biotecnologia da FAMED. A outra parte foi enviada ao Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas – UFU, em frasco com formol tamponado a 10% para classificação histopatológica da forma clínica do paciente.

2. EXTRAÇÃO DE DNA

As biópsias de pele foram acondicionadas a -80°C a fim de garantir a conservação do DNA. No momento da extração, elas foram picotadas com um bisturi e transferidas para tubos de 2ml, onde foram adicionados 300 μl de TLN (NaCl 400 mM; EDTA 50mM pH 8,0; Tris-HCl 25 Mm pH 8,0), 50 μl de proteinase K (10 mg/ ml) e 30 μl de SDS(10%). Os tubos foram incubados a 55°C . Após 24 horas, foram adicionados 500 μl de fenol tamponado (pH 8,0), 250 μl de TRIS-HCl 1 M, pH 8,0 e 250 μl de clorofórmio. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. A seguir, 600 μl do sobrenadante foram transferidos para tubos estéreis, e adicionou-se 1,0 ml de etanol absoluto. Os tubos foram incubados a -20°C overnight. Em seqüência, os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm/15 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 1.0 mL de etanol 75%, e centrifugou-se os tubos por mais 10 minutos à velocidade de 15.000 rpm. O sobrenadante foi descartado deixando o *pellet* secar e, em seguida, foram diluídos em 50 μl de água ultra pura e armazenados à -20°C overnight. Foi feito um gel de agarose para visualizar a qualidade destes materiais extrídos (Figura 1).

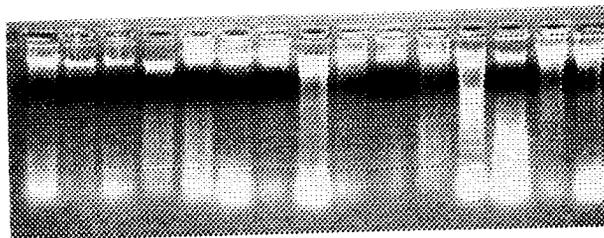


Figura 01 – Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo contendo os produtos das extrações de DNA total de biópsia de pele de pacientes de hanseníase. Centro de Referência em Hanseníase - Dermatologia Sanitária, UFU/SUS-MG.

3. PCR

Para a detecção do *Mycobacterium leprae* foram utilizados quatro pares de *primers*, que amplificam fragmentos de 372 pb, 130 pb, 89 pb e 78 pb, de uma mesma sequência repetitiva RLEP3 (X17153) do *M. leprae*. O par de *primers* que amplifica 372pb apresenta alta especificidade e sensibilidade (YOON *et al.*, 1993). Em estudos recentes para amplificar fragmentos sequencias de DNA de *M. leprae* em biópsias de mucosa nasal, o par de *primers* que amplifica fragmentos de 130pb apresentou uma positividade de 69.2% do total de pacientes analisados (PATROCÍNIO *et al.*, 2005). Os *primers* que amplificam fragmentos de 89pb e 78pb foram desenhados internamente ao par que amplifica fragmentos de 130pb, através do *software PRIMER*, comparando as sequências com os dados do Gene Bank, com o objetivo de amplificar fragmentos de DNA de *M. leprae* que poderiam estar degradados nas amostras, e por isso não seriam detectados pelos *primers* maiores.

Foi usado um par de *primers* específico que amplifica um fragmento de 200pb do gene NRAMP1 (proteína de macrófago associado à resistência natural) como controle interno das reações de PCR. As condições das reações foram padronizadas segundo a metodologia proposta por Innis e colaboradores (1990), e as concentrações dos reagentes foram de 200 μ M de DNTPs; 2,5 mM de MgCl₂; 10 pM de cada primer; 1 unidade de Taq Platinum e tampão 1X. O programa da PCR foi otimizado com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95° C por 1 minuto, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95° C por 20 segundos, anelamento a 56° C por 20 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos. Todas as amostras foram submetidas à extensão final a 72° C, por 10 minutos.

4. ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DOS TESTES

A especificidade dos testes foi avaliada usando *primers* específicos para o *Mycobacterium leprae*, que amplificam 372 pb, 130pb, 89pb e 78pb do genoma deste bacilo. Os *primers* foram testados em amostras positivas para diferentes espécies patogênicas: *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania brasiliensis*. Não foram observadas bandas em gel de agarose referentes a estes fragmentos.

O grupo controle foi usado para cálculos dos testes de acurácia, especificidade e sensibilidade para a detecção do bacilos pelos *primers* que amplificam 372, 130, 89 e 78 pares de bases.

(1998), que encontrou 50.0% de amostras positivas com um *primer* que amplifica fragmentos de 531pb.

Para as formas clínicas DD, DV e V, a positividade do *primer* 130pb foi superior aos valores encontrados pelo IB, sendo que este *primer* detectou 78,6% em DD, 84,6% em DV e 100,0% em V (Tabela 1). Os testes moleculares com os *primers* de 78pb e 130pb foram os únicos que detectaram 100.0% dos casos de DV e V, respectivamente, enquanto que o IB detectou apenas 77.0% de DV e 92.8% de V, deixando de detectar 23.0% (3/13) de DV e 7.1% (1/14) de V (Tabela 1).

Tabela 1: Positividade encontrada para os quatro pares de *primers* e para o IB de pele, evidenciando as percentagens encontradas em cada forma clínica, para cada teste.

| Formas Clínicas | N (%) | 372 pb N (%) | 130 pb N (%) | 89 pb N (%) | 78 pb N (%) | IB PELE N (%) |
|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| I | 1/88 (1,1) | 0 (0) | 1 (100,0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| T | 21/88 (23,8) | 7 (33,3) | 6 (28,6) | 3 (14,2) | 5 (23,8) | 0 (0) |
| DT | 25/88 (28,4) | 8 (32,0) | 7 (28,0) | 5 (20,0) | 8 (32,0) | 3 (12,0) |
| DD | 14/88 (15,9) | 5 (35,7) | 11 (78,6) | 7 (50,0) | 8 (57,1) | 10 (71,4) |
| DV | 13/88 (14,7) | 9 (69,2) | 11 (84,6) | 12 (92,3) | 13 (100,0) | 10 (77,0) |
| V | 14/88 (15,9) | 9 (64,3) | 14 (100,0) | 10 (71,4) | 13 (92,8) | 13 (92,8) |
| Positividade | 88/88 (100,0) | 38/88 (43,2) | 59,1 (52/88) | 37/88 (42,1) | 46/88 (52,3) | 36/88 (40,9) |

I (forma indeterminada), T (forma tuberculóide), DT (forma dimorfo-tuberculóide), DD (forma dimorfo-dimorfo), DV (forma dimorfo-virchoviana) e V (forma virchoviana).

O *primer* que amplifica fragmentos de 130pb detectou 34.6% dos pacientes negativos para 372pb; 38.4% dos negativos para 89pb e 21.1% dos negativos para o 78pb e deixou de detectar 13.8%, 11.1% e 13.8% dos casos positivos para estes mesmos pares de *primers*. A PCR com *primer* que amplifica fragmentos de 130pb concordou em 86,1% com o IB de pele, e detectou 42,3% dos pacientes negativos para este teste (Tabela 2), deixando de detectar apenas 16.6% (6/36) dos pacientes com IB positivo, sendo que destes pacientes 2 eram DD e 4 eram DT.

Tabela 2: Frequências de concordâncias entre os resultados obtidos pelo IB de biópsias de pele e os resultados encontrados pela PCR com os quatro diferentes pares de *primers*

| Índice Baciloscópico de Pele | Produtos amplificados por PCR (%) | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | 372pb | 130pb | 89pb | 78pb |
| Positivos 40,9% (36/88) | 58,3 | 86,1 | 63,8 | 75, |
| Negativos 59,1% (52/88) | 32,7 | 42,3 | 27,0 | 36,5 |
| Total | 43,2 | 59,1 | 42,1 | 52,3 |

Em amostras com IB negativo os *primers* de 89pb e 78pb foram positivos em 27.0% e 36.5%, respectivamente. Os pares de *primers* de 372pb, 89pb e 78pb deixaram de detectar 41.6%, 36.1% e 25.0%, respectivamente, de casos que tiveram IB de pele positivo (Tabela 3).

Tabela 3: Relação entre positividade para os fragmentos amplificados pelos quatro pares de *primers* pelo Índice Baciloscópico.

| IB | 372 pb | | 130 pb | | 89 pb | | 78 pb | |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Positivo N (%) | Negativo N (%) |
| Positivo 36/88 (40,9%) | 21/36 (58,3) | 15/36 (41,6) | 30/36 (86,1) | 6/36 (16,6) | 23/36 (63,8) | 13/36 (36,1) | 27/89 (75,0) | 9/36 (25,0) |
| Negativo 52/88 (59,1%) | 17/52 (32,7) | 35/52 (67,3) | 22/52 (42,3) | 30/52 (57,3) | 14/52 (27,0) | 38/52 (73,0) | 19/52 (36,5) | 33/52 (63,5) |
| TOTAL | 38/88 (43,2) | 50/88 (56,8) | 52/88 (59,1) | 36/88 (40,9) | 37/88 (42,1) | 51/88 (57,9) | 46/88 (52,3) | 42/88 (47,7) |

IB: Índice Baciloscópico de biópsias de pele

Todos os pares de *primers* apresentaram 100,0% de especificidade ao *M. leprae*, e apresentaram especificidade e acurácia maiores que os valores observados para IB. A maior sensibilidade e acurácia foram obtidas pelo par de *primer* que amplifica fragmentos de 130pb, 59,1% e 70,7%, respectivamente. O par de *primers* que amplifica fragmentos de 372pb obteve 43,2% e 59,3%; o que amplifica 89pb apresentou 42,1% e

Tabela 5: Comparação da eficiência da PCR do *M. leprae* pelo par de *primers* que geram amplicons de 130pb com pares de *primers* que amplificam 372, 89 e 78 pb.

| Amplicons de 130pb | Produtos amplificados pela PCR | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 372 pb | | 89 pb | | 78 pb | |
| | Positivos | Negativos | Positivos | Negativos | Positivos | Negativos |
| Positivos 59,1% (52//88) | 63,4 (33/52) | 34,6 (18/52) | 63,4 (33/52) | 38,4 (20/52) | 78,8 (41/52) | 21,1 (11/52) |
| Negativos 40,9% (36/88) | 13,8 (5/36) | 86,1 (31/36) | 11,1 (4/36) | 86,1 (31/36) | 13,8 (5/36) | 86,1 (31/36) |
| Total | 43,2 (38/88) | 56,8 (50/88) | 42,1 (37/88) | 57,9 (51/88) | 52,3 (46/88) | 47,7 (42/88) |

DISCUSSÃO

A validação de vários indicadores para a epidemiologia e controle da hanseníase tem sido avaliada em muitos estudos, incluindo métodos moleculares e imunológicos para a detecção do *M. leprae*, definição de portadores sadios e de infecção subclínica, porém com resultados controversos, devido à alta complexidade da doença e também pela metodologia de detecção do *M. leprae* (CARDOSO, 2006).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem mostrado alta sensibilidade e especificidade para detecção de *M. leprae* e pode ser de grande utilidade na detecção de pacientes com hanseníase em seu estágio inicial e na classificação clínica correta para alocá-los em esquemas de tratamento PB e MB com riscos de incapacidades diferenciados (VIRMOND, 1997).

O presente estudo investigou a sensibilidade, especificidade e acurácia da PCR convencional para a detecção de DNA de *M. leprae* em biópsias de pele, com objetivo de amplificar fragmentos de diferentes tamanhos, mas que amplificam uma mesma região do genoma do bacilo.

A escolha pela biópsia de pele foi baseada nas diferenças de sensibilidade relatadas na literatura entre a baciloscopia de biópsias e esfregaços dérmicos (BATHIA *et al.*, 1993; ILA, 2002), mostrando que biópsias são mais efetivas que esfregaços dérmicos. A pouca quantidade de células em esfregaços pode justificar a baixa detecção de DNA de *M. leprae* nas amostras, e também pode ser mais suscetível a contaminações exógenas (KAMPIRAPAP *et al.*, 1998).

O número de pacientes com hanseníase no sexo masculino foi discretamente maior do que no sexo feminino o que concorda com os dados encontrados no Brasil e no estado de Minas Gerais (SINAN, 2005). As mulheres desenvolvem resposta imunológica mais forte ao *M. leprae* do que os homens, como sugerido por uma incidência menor e formas clínicas da doença menos graves na maior parte do mundo (ULRICH *et al.*, 1993). Além disso, os homens geralmente expõem-se a fatores de infecção maiores como resultado do estilo de vida (NOORDEEN, 1985).

A literatura tem apresentado variações nas positivities da PCR através da utilização de diversos tamanhos de fragmentos amplificados. Kang e colaboradores (2003) comparou dois pares de *primers* com diferentes tamanhos (360pb e 129pb), mas que amplificavam regiões diferentes do genoma do bacilo, e demonstrou uma maior

positividade da PCR com o menor fragmento (80,0%) e 56,7% com o maior fragmento. Wichtwechkarn e colaboradores (1995) e Kampirapap e colaboradores (1998) usaram um par de *primers* que amplifica fragmentos de 531pb e encontraram 66,0% e 50,0%, respectivamente; Yoon e colaboradores (1993) utilizou *primers* que amplificam fragmentos de 372pb e obteve 73,3%. A positividade encontrada neste estudo com os pares de *primers* que amplificam os fragmentos de 130pb e 78pb concordam com a literatura, que relata valores entre 50,0 e 80,0%.

É importante ressaltar que 25,0% dos pacientes tiveram resultados negativos para todos os testes avaliados com biópsias de pele. Todos esses pacientes pertenciam às formas clínicas T(10) ou DT(12). Uma exarcebação de resposta imune celular com afluxo de linfócitos TCD4+ e com intensa produção IL-2 e IFN- γ , além da presença de macrófagos epitelióides e células gigantes de Langhans, com a produção de TNF- α , uma potente citocina inflamatória, contribuem para a manutenção do granuloma imune, com grande poder bactericida (GOULART *et al.*, 2002).

A presença destas citocinas, especialmente TNF- α and IFN- γ , nas formas T e DT (GOULART *et al.*, 1996), que em grandes quantidades *in situ*, levariam à ativação da via do óxido nítrico, com destruição bacilar (GOULART *et al.*, 2002) e, conseqüentemente, à degradação do DNA (BRONTE *et al.*, 1993; IBUKI *et al.*, 2003) e por isso fragmentos de DNA não são amplificados pela PCR nestas formas clínicas.

Outras técnicas também vêm sendo utilizadas como Nested-PCR, PCR Tempo-Real, PCR *in situ* e RT-PCR (KRAMME *et al.*, 2003; PHETSUKSIRI *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2006). Dayal e colaboradores.(2005) relatou o uso de PCR *in situ* para detecção de *M. leprae* em 60,0% das amostras analisadas em crianças. A PCR Tempo-real obteve 91,3% de sensibilidade (MARTINEZ *et al.*, 2006) usando *primers* que codificam genes para antígenos 85-B, e foi 17,7% superior a PCR convencional. Phetsuksiri e colaboradores (2006) relatou a RT-PCR (transcriptase reverse) como forma de avaliar a viabilidade do bacilo nas amostras analisadas para o diagnóstico de hanseníase.

Algumas limitações podem ter ocorrido durante a PCR como bactérias que não tiveram suas cápsulas lisadas durante o processo de extração de DNA; ou inibição causada pelo excesso de DNA genômico humano ou problemas na manipulação das amostras, que podem ter degradado o DNA. Outras limitações também podem diminuir a eficácia do método da PCR, como a ocorrência de mutações de ponto no sítio de

ligação dos *primers* e a provável existência de outros inibidores da PCR (YOON *et al.*, 1993).

Quanto às diferenças observadas entre a sensibilidade da PCR e do IB, pode-se inferir o fato de que o fragmento da biópsia é dividido em duas partes, sendo uma encaminhada ao laboratório de Patologia e outra, ao laboratório de Biologia Molecular. Isto influencia os resultados, uma vez que a amostra analisada nos testes possui diferentes quantidades de DNA do bacilo.

Sugerimos que em estudos posteriores sejam realizadas as técnicas de RT-PCR para mensurar a viabilidade do bacilo nestas amostras, bem como Nested-PCR com os *primers* que amplificam fragmentos de 78pb e 89pb (internos aos fragmentos amplificados de 130pb), buscando um aumento significativo entre a positividade desta técnica com a técnica realizada neste trabalho.

CONCLUSÕES

Não existe um padrão-ouro para diagnóstico de hanseníase, sendo que este é feito através da combinação de exames clínicos, laboratoriais e histopatológicos (ILA, 2002). Neste trabalho propusemos a investigação do DNA de *M. leprae* através da amplificação de quatro fragmentos, e observamos que o par de *primers* que amplifica fragmentos de 130pb teve o melhor desempenho em sensibilidade, especificidade e acurácia, com boa positividade nas formas I, T e DT. Por isso, preconizamos o uso desta técnica, associada ao IB de biópsia de pele como diagnóstico de certeza para hanseníase.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BATHIA, A.S.; KATOCH, K.; RANGARAJAN, B.; NARAYANAN, RAMU G.; MUKHERJEE, LAVANIA R.K. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. **International Journal of Leprosy**. n.3, v.61, p.433-438, 1992

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância Sanitária/ Departamento de Vigilância epidemiológica. Coordenadoria Geral de Doenças Endêmicas/ Área técnica de Dermatologia Sanitária. **Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase**. Brasília, novembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hanseníase**. Brasília, 2003. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: 05 de fev. de 2007.

BRONTE V., ZANOVELLO P., ROSATO A., ZAMBON A., MANDRUZZATO S., PIZZO P., DI VIRGILIO F., COLLAVO D. Synergistic Effect of Extracellular Adenosine 5'- Triphosphate and Tumor Necrosis Factor on DNA Degration. **Cellular Immunology** n. 152, p.110-119, 1993 .

CARDOSO, A.M. Epidemiologia molecular do *Mycobacterium leprae*: detecção qualitativa e quantitativa de DNA do bacilo em swab nasal de pacientes com hanseníase e seus contatos domiciliares. **(Tese de Mestrado)**, 2006.

CHAE, G.T.; DIM, M.J.; KANG, T.J.; LEE, S.B.; SHIN, H.K.; KO, Y.H.; KIM, N.H.; DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDa gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multidrug therapy for leprosy. **Journal of Medical Microbiology**. V.51, p. 417-422, 2002.

DAYAL,R.; SINGH, S.P., MATHUR, P.P., KATOCH, V.M.; NATRAJAN, M. Diagnostic value of in situ polymerase chain reaction in leprosy. **Indian Journal of Pediatric**. V.72, p.1043-1046, 2005.

DE WIT, M.Y.L.; FABER, R.W.; KRIEG, R.S.; DOUGLAS, J.T.; LUCAS, S.B.; MONTREEWASUWAT, N.; PATTYN, S.R.; HUSSAIN, R.; PONNIGHAUS, J.R.; HARTSKEERL, R.A.; KLATSER, P.R. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. **Journal of Clinical Microbiology**. V.29, n.5, p.906-910, 1991.

DE WIT, M.Y.L.; DOUGLAS, J.T.; MCFADDEN, J.; KLATSER, P.R. Polimerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. V.31, n.3, p.502-506, 1993.

DONOGUE, H.F.; HOLTON, J.; SPIGELAN, M., PCR *primers* that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **Journal of Medical Microbiology**, v.50, n.2, p.177-182, 2001.

FIALLO, P.; WILLIAMS, D.L.; CHAN, J.P.; GILLS, T.P. Effect of fixation on polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.12, p. 3095-3098, 1992.

GOULART, I.M.B. Detecção de TGF- β 1 em lesões cutâneas de diferentes formas clínicas de hanseníase. 1995. 83p. **Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1995.**

GOULART, I.M.B.; FIGUEIREDO, F.; COIMBRA, T.; FOSS, N.T.; Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **American Journal of Pathology**, v.148, p.911-917, 1996.

GOULART, I.M.B.; PENA, G.O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n.35, v.4, p. 365-375, 2002.

HARDAS, U.; LELE, V. Evaluation of fluorescence microscopy for detection of *M. leprae*. **Leprosy in India**, New Delhi, v.53, n.2, p. 273-277, Apr. 1981.

IBUKI Y.; MIZUNO, S.; GOTO, R. λ - Irradiation induced DNA damage enhances NO production via NF- κ B activation in RAW264.7 cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1593, p. 159-167, 2003.

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR: A Guide to Methods and Applications**. San Diego New Boston, Academic Press INC, 1990.

International Leprosy Association Technical Forum. (2002). The diagnosis and classification of leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterials Disease**, 70: s23-s31

JAMIL, M.; KEER, J.T.; LUCAS, S.B.; DOCKRELL, H.M.; CHIANG, T.J.; HUSSAIN, R.; STOKER, N.G. Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. **Lancet**. V.342, p. 264-268, 1993.

KAMPIRAPAP, K., SINGTHAM, N., KLASTAR, P., WIRIVAWIPART, S. DNA Amplification for Detection of Leprosy and Assessment of Efficacy of Leprosy Chemotherapy. **Internatinal Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**. Bloomfield, v.66, n.1, p. 16-21, Jan. 1998.

KANG TJ, KIM SB, LEE, GT, KIM JP, KIM C. Comparision of two different amplification products (the 18 k-Da protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. **Clinical and Experimental Dermatology**, n.28, p. 420-424,2003.

KLASTAR, P.R.; VAN BEERS, S.; MADJID, B.; DAY, R.; DE WIT, M.Y. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**. n.31, p.2947-2951, 1993.

KRAMME, S.; BRETZEL, G.; PANNING, M.; KAWUMA, J.; DROSTEN, C. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. **Medical Microbiology and Immunology**. 2003

MARTINEZ, A N.; BRITTO, C.F.P.C.; NERY, J.A C.; SAMPAIO, E.P.; JARDIM, M.R.; SARNO, E.N.; MORAES, M.O. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**. Sept, p.3154-3159, 2006.

MINAS GERAIS – Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais / Coordenação Estadual de Dermatologia Sanitária – Sinan **Indicadores de Hansenise do pacto de atenção básica por município de residência em Minas Gerais**, 2007.

MIRSA, N.; RAMESH, V.; MIRSA, R.S.; NARAYAN, N.P.S.; CLSTON, M.J.; NATH, I. Clinical Utility of LSR/A15 Gene for *Mycobacterium leprae* Detection in Leprosy Tissues Using the Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Leprosy**, v.63, n.1,1995.

MOSMANN, T.R; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I-Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**. , v.136, n.7, p.2348-2357, 1986.

NORDEEN, S.K. Epidemiology and control of leprosy: a review of progress over the last 30 years (1962-1992). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n.87, p.515-517. 1993.

PATROCÍNIO, L.G.; GOULART, I.M.B.; GOULART, L.R.; PATROCÍNIO, J.A, FERREIRA, F.R.; FLEURY, R.N. Detection fo *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Mibrobiology**, v.44, p.311-316, 2005.

PATTYN, S.R.; URSI, D.; IEVEN, M.; GRILLONE, S.; RAES, V. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Disease**. N.61, p. 389-393, 1993.

PFALTZGRAFF RE, BRYCESON A. Clinical Leprosy. In: Hastings RC (ed) **Leprosy**, 1st edition, Churchill Livingstone Inc, New York, p.31-52, 1985.

PHETSUKSIRI, B.; RUDEEANEK SIN, J.; SUPAPKU, P.; WACHAPONG, S.; MAHOTARN, K.; BRENNAN, P.J. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. N.48, p.319-328, 2006.

SANTOS, AR.; BALASSIANO, V.; OLIVEIRA, M.L.; PEREIRA, M.A.; SANTOS, P.B.; DEGRAVE, W.M.; SUFFYS, P.N. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eighth years completion of anti-leprosy therapy. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. n.96, p. 1129-1133, 2001.

RAFI, A.; DONOGHUE, H.D.; STANFORD, J.L. Application of Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycobacterium leprae* Dna in Specimens from Treated Leprosy Patients. **International Journal of Leprosy**, v.63, n.1, 1994.

RAMAPRASAD, P.; FERNANDO, A.; MADHALE, S.; RAO, J.R.; EDWARD, V.K.; SAMSON, P.D.; KLATSER, P.R.; DE WIT, M.Y.; SMITH, W.C.; CREE, I.A. Transmission and protection in leprosy: indication of the role of mucosal immunity. **Leprosy Review**. V.68, p 301-315, 1997.

RIDLEY DS, JOPLING WH. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **International Journal of Leprosy**, n.34, p.255-273, 1966.

RONDINI, S.; MENSAH-QUAINOO, E.; TROLL, H.; BODMER, T.; PLUSCHKE, G. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. **Journal of Clinical Microbiology**. Sept, p. 4231-4237, 2003.

SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO. Informações de Saúde. **DATASUS.2005**. Disponível em: <www.hanseniaze.datasus.gov.br>. Acesso em: 01 jan. 2007.

SHAMSI, F.A; CHAUDHRY, I.A; MORAES, M.O; MARTINEZ, A.N.; RILEY, F.C. Detection of *Mycobacterium leprae* in ocular tissues by histopathology and real-time polymerase chain reaction. **Ophthalmic Research**, v.39, n.2, p. 63-68, 2007.

SHEPARD, D.D.; MCRAE, D.H. A method for counting acid-fast bacteria. **International Journal of Leprosy**. V.36, p.78-82, 1968.

TALHARI S. & NEVES, R.G. Hanseníase. **Dermatologia Tropical**. 3a edição. Manaus, 167p,1997.

ULRICH, M.; ZULUETA, A.M.; DITTMAR-CÁCERES, G.; SAMPSON, C.; PINARDI, M.E.; RADA, E.M.; ARANZAZU, N. Leprosy in women: Characteristics and repercussions. **Society of Science Medicine New York**, v.37, n.4, p. 445-456, Aug. 1993.

VIRMOND, M.; VIETH, H. Prevenção de incapacidades na hanseníase: uma análise crítica. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.30, n.3,p.358-363,1997.

WATERS, M.F.R. Leprosy. **Br. Medical Journal.**, v.283, p.1321, 1981.

WICHTWECHKARN, J.; KARNJAN, S.; SHUNTAWUTTISSETTEE, S.; SORJPRASIT, C.; KAMPIRAPAP, K.; PEERAPAKORN, S. Detection of *Mycobacterium Leprae* Infection by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.1, p.45-49, 1995.

WILLIAMS, D.L.; GILLIS, T.P.; FIALLO, P.; JOB, C.K.; GELBER, R.H.; HILL, C.; IZUMI, S. Detection of *Mycobacterium leprae* and the potential for monitoring antileprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR. **Molecular and Cell Probes**. N.6, p.401-410, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record. **WHO**, n.34, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemotherapy of leprosy for control programmes. **WHO**, Geneva, Technical Report Series, n.675, 1982.

YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; DEANS, R.J.; WEINBERG, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science.** , v.254, p.277-279, 1991.

YAWALKAR, S.J. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers**, 132 pp. Basle, New York, 1992.

YAWALKAR, S.J. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers**, 132 pp. Basle, New York, 2002.

YOON, K-H.; CHO, S-N.; LEE, M-K.; ABALOS, R.M.; CELLONA, R.V.; FAJARDO, J.R.; T.T.; GUIDO, L.S.; DELA CRUZ, E.C.; WALJH, G.P.; KIM, J-D. Evaluation of Polymerase Chain Reaction Amplification of *Mycobacterium leprae*-Specific Repetitive Sequence in Biopsy Specimens from Leprosy Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.4, p. 895-899, 1993.

Anexo I



Universidade Federal de Uberlândia
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
 Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38400-089 - ☎ (034) 3231-8046 FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 099/03

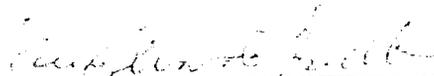
Uberlândia, 07 de julho de 2003.

Ilmo(a) Sr.(a)
 Prof.(a).Dr.(a) Isabela Maria Bernardes Goulart

Prezada(a) Professor(a),

Informamos-lhe que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia examinou e **APROVOU** o projeto de pesquisa "Caracterização Imunológica e Molecular dos Pacientes com Hanseníase e seus Comunicantes para Identificação de Grupos de Risco", protocolado sob o número 048/2003, do qual V.Sa. figura como pesquisador responsável, para ser desenvolvido a partir de 04/07/2003.

Em adendo, informamos que o prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res 196/96 CNS.


 Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
 Coordenador do CEP/UFU

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A hanseníase é uma doença que afeta a pele e os nervos. No início os sintomas são dificilmente notados e por ser transmitida principalmente pelo nariz, este local pode ser precocemente afetado. Durante o desenvolvimento da doença as lesões de pele são mais aparentes e os nervos podem ser irreversivelmente danificados resultando em graves seqüelas. Quanto mais demora para que a doença seja diagnosticada e o tratamento iniciado, maior será o dano. O diagnóstico pode ser dificultado porque os exames atuais não conseguem detectar o bacilo quando eles estão em pequena quantidade no organismo.

Atualmente a hanseníase tem cura e muitos são os esforços para que ela deixe de ser um problema de saúde pública no Brasil. Mas, como não há uma vacina específica contra a hanseníase, é muito importante que se possa identificar os portadores sadios do bacilo que causa a doença, bem como os contatos de pacientes que estejam no estágio inicial da infecção, ainda subclínico, para que se possa definir os grupos que tenham maior risco de desenvolver a hanseníase.

Para isso, a equipe de saúde do Centro de Referência Estadual em Hanseníase e Dermatologia Sanitária da UFU (CREHDS/UFU) está propondo uma pesquisa onde deverão ser realizados os exames de rotina para o diagnóstico da doença nos pacientes, tais como baciloscopia, teste de Mitsuda e biópsia de lesão de pele e, nos contatos domiciliares serão realizados exames dermatoneurológico, teste de Mitsuda (uma injeção de 0,1 ml intradérmica no antebraço para avaliar a imunidade celular/resistência) e teste ML-Flow (para detectar anticorpos contra a bactéria que causa a hanseníase no sangue da pessoa testada, coletando apenas uma gota de sangue com uma picada na ponta do dedo e avaliar se ela está ou foi infectada indicando que a pessoa corre um risco maior de desenvolver a hanseníase). Nos pacientes e seus contatos serão realizados ainda coleta de swabs das cavidades nasal/bucal com escovinha própria e biópsia de pequeno fragmento de cometo nasal com pinça de nariz, ambos procedimentos para identificar DNA da bacilo de Hansen. Cabe ressaltar que todo material utilizado será estéril e descartável, e no caso das biópsias, serão realizadas com anestésico local. O material coletado será enviado ao laboratório do Centro de Referência, onde serão realizados os exames pela técnica de DNA e os resultados serão mantidos em sigilo.

Espera-se que com este estudo seja possível detectar em que estágio de desenvolvimento se encontra a doença no paciente, bem como definir os possíveis portadores sadios e aqueles que já estejam infectados com o bacilo entre os comunicantes, para seguimento periódico pela equipe do CREHDS/UFU, subsidiando uma proposta de tratamento precoce deste grupo de risco, a fim de prevenir o aparecimento da doença nos familiares, diminuir o risco de contágio da população e dessa forma, interromper a cadeia de transmissão da hanseníase.

O direito do paciente e seus contatos pedirem esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e se concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio.

pelos presentes termos apresentados por este documento, eu,

concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos.

Assinatura _____

Objetando de _____ de 200