

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS

**ANÁLISE METABOLÔMICA SÉRICA DE POTENCIAIS BIOMARCADORES  
NA HANSENÍASE**

Paula Cristina Brígido Tavares

Uberlândia - MG  
Dezembro - 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
APLICADAS

ANÁLISE METABOLÔMICA SÉRICA DE POTENCIAIS BIOMARCADORES  
NA HANSENÍASE

Tese apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas como requisito parcial  
para obtenção do título de Doutor.

Discente: Paula Cristina Brígido Tavares  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho  
Coorientadora: Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

Uberlândia - MG  
Dezembro - 2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada  
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 137 do PPIPA				
Data:	vinte e nove de dezembro de dois mil e vinte	Hora de início:	17h00min	Hora de encerramento:	21h25min
Matrícula do Discente:	11613IPA001				
Nome do Discente:	Paula Cristina Brígido Tavares				
Título do Trabalho:	Análise Metabolômica Sérica de Potenciais Biomarcadores Na Hanseníase				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunopatologia e Alergia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Marcadores biomoleculares e vias de sinalização em processos neoplásicos				

Reuniu-se, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Profa . Dra . Lila Teixeira de Araújo Janahú (FIOCRUZ); Profa. Dra. Vânia Del' Arco Paschoal (FAMERP); Prof. Dr. Álvaro Ferreira Junior (UFG); Prof. Dr. Claudio Guedes Salgado (UFPA); Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho - Presidente (Orientador da candidata).

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e a candidato(a) agradeceu a presença do público, e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

**Aprovado(a).**

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/12/2020, às 21:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Álvaro Ferreira Júnior, Usuário Externo**, em 04/01/2021, às 20:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Guedes Salgado, Usuário Externo**, em 05/01/2021, às 20:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **VÂNIA DEL ARCO PASCHOAL, Usuário Externo**, em 06/01/2021, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Lila Teixeira de Araújo, Usuário Externo**, em 06/01/2021, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2471741** e o código CRC **0F25211E**.

---

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

T231  
2020 Tavares, Paula Cristina Brígido, 1986-  
ANÁLISE METABOLÔMICA SÉRICA DE POTENCIAIS  
BIOMARCADORES NA HANSENÍASE [recurso eletrônico] / Paula  
Cristina Brígido Tavares. - 2020.

Orientadora: Luiz Ricardo Goulart Filho.  
Coorientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.62>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo ,1962-,  
(Orient.). II. Goulart, Isabela Maria Bernardes,1959-,  
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.  
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
IV. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

### **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha mãe, mulher guerreira e de fibra que me ensinou a sorrir, a ter fé mesmo nos momentos de dor, a viver a esperança e me sustentar em amor.

“Be curious. And however difficult life may seem, there is always something you can do and succeed at. It matters that you don't just give up.”

**Stephen Hawking**

“Seja curioso. E por mais difícil que a vida possa parecer, sempre há algo que você pode fazer e ter sucesso. Importa apenas que você não desista.” (tradução livre)

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus que esteve presente comigo diariamente, concedendo-me paz, aquietando minha alma em todas as situações, guiando meus passos, iluminando-me e conduzindo pelos melhores caminhos.

Às minhas filhas e grandes companheiras, Maria Julia, Vitória e Isabella, pelas alegrias proporcionadas e ensinamentos trazidos pelo espelhamento de meus atos, contribuindo para uma busca constante de melhorias.

À minha família (mãe e irmãs) que sempre me apoiaram em todos os sentidos e por acreditarem nos meus sonhos. Mesmo com as dificuldades que encontramos no caminho, vocês em momento algum fez com que eu me sentisse sozinha no mundo. Amo vocês de forma incondicional.

À minha ex-esposa, Rebecca, agradeço o amor, carinho, cuidado, coragem e dedicação fornecida à nossa família.

Ao meu amor, Gabriela, pelo apoio e paciência nos meus dias ruins. Obrigada pelas experiências compartilhadas e confiança depositada nos momentos incertos. Te amo de forma incondicional. Creio nos rumos que nossa jornada toma mostrando-nos a certeza de nossas escolhas.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pela sua dedicação, paciência e disponibilidade em me orientar, sendo um exemplo em suas práticas e resultados obtidos.

À minha coorientadora, Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart, por ter me recebido de braços abertos e pelas inúmeras possibilidades e oportunidades a mim oferecidas.

Aos técnicos do laboratório do Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária (CREDESH), Denis, Paola, Kelsie e Thiago, pelo empenho e contribuições.

À Larissa, Paula, e Mário do Laboratório de Nanobiotecnologia por acreditarem em mim e darem a oportunidade de trabalhar com vocês. Sou muito grata por tudo!

Ao professor Dr. Anderson Rodrigues dos Santos (FACOM/UFU), pela colaboração com as análises de inteligência artificial, enriquecendo ainda mais esse trabalho.

À família LATRI (Laboratório de Tripanosomatídeos), amigos que mesmo longe, estiveram sempre ao meu lado participando da minha jornada. Obrigada pelas demonstrações de carinho e experiências possibilitadas.

Aos meus amigos do setor de Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, que estão diariamente comigo, me apoiando e incentivando. Vocês são a família com quem passo horas e horas de plantão. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Aos profissionais do CREDESH, que dedicam o seu tempo, esforço e amor ao grupo em prol dos pacientes portadores da hanseníase.

Agradeço a Natasha e a Luciana, biólogas do laboratório de Nanotecnologia-UFU, por sempre me apoiarem.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas/ICBIM/UFU, aos ótimos e queridos professores que compõe esse programa. Às secretárias, pela paciência e dedicação.

Aos que, porventura, não citei o nome, mas de alguma forma me ajudaram.

Por fim, à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), ao Ministério da saúde (MS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para que esse trabalho fosse realizado. Torço e oro, diariamente, para que todos(as) os(as) pesquisadores(as) do Brasil, suas instituições de ensino superior, os Programas de Pós-Graduação e as agências de fomento federais e estaduais mantenham-se firmes e superem esse momento político turbulento e hostil.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AM</b>	Aprendizado de máquina
<b>B</b>	Borderline
<b>BAAR</b>	Bacilo álcool-ácido resistente
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CE-MS</b>	Capilar Electrophoresis-Mass Spectrometry
<b>CO</b>	Classificação Operacional
<b>CREDESH</b>	Centro Nacional de Referência em Dermatologia Sanitária e Hanseníase
<b>Ct</b>	<i>Cycle-threshold</i>
<b>D</b>	Dimorfo
<b>DD</b>	Dimorfo-Dimorfo
<b>DNS</b>	Departamento Nacional de Saúde
<b>DT</b>	Dimorfo-Tuberculóide
<b>DV</b>	Dimorfo-Virchowiano
<b>ESI</b>	<i>Eletroctrospray</i>
<b>GC-MS</b>	Cromatografia gasosa
<b>GI2</b>	Grau de incapacidade 2
<b>HC</b>	Hospital de Clínicas
<b>HMDB</b>	<i>Human Metabolome Database</i>
<b>HPLC</b>	<i>High-performance liquid chromatography</i>
<b>I</b>	Forma Indeterminada
<b>IB</b>	Índice Baciloscópico
<b>IE</b>	Índice ELISA
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>L</b>	Lepromatoso
<b>LC-MS</b>	Cromatografia líquida
<b>MB</b>	Multibacilares
<b>MoNA</b>	<i>MassBank Of North America</i>
<b>MS</b>	Espectrometria de massas
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPD</b>	Orto-fenileno-diamina

<b>PB</b>	Paucibacilares
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia polimerase
<b>PGL-I</b>	Glicolípido fenólico I
<b>PQT</b>	Poliquimioterapia
<b>qPCR</b>	Reação em cadeia polimerase quantitativa
<b>Q-TOF</b>	<i>Quadrupole time-of-flight</i>
<b>R&amp;J</b>	<i>Ridley &amp; Jopling</i>
<b>RF</b>	<i>Random Forest</i>
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>T</b>	Tuberculóide
<b>UFU</b>	Universidade Federal de Uberlândia
<b>V</b>	Virchowiano
<b>VC</b>	Validação cruzada

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Primeiro leprosário Nacional.....	Pág.16
<b>Figura 2.</b> <i>Mycobacterium leprae</i> coradas pela técnica Ziehl-Neelsen.....	Pág.18
<b>Figura 3.</b> Modelo esquemático da parede celular de <i>M. leprae</i> .....	Pág.19
<b>Figura 4.</b> Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase no mundo em 2018.....	Pág.20
<b>Figura 5.</b> Os três pilares da estratégia global para a hanseníase (2016-2020) e seus componentes.....	Pág.21
<b>Figura 6.</b> Hanseníase Indeterminada: máculas hipocrômicas, mal delimitadas no dorso.....	Pág.26
<b>Figura 7.</b> Hanseníase Tuberculóide: lesão anular na perna.....	Pág.27
<b>Figura 8.</b> Hanseníase Dimorfa: lesão com bordas externas esmaecentes e internas bem definidas no dorso da mão.....	Pág.28
<b>Figura 9.</b> Hanseníase Virchowiana: ressecamento da pele e hansenomas nas pernas.....	Pág.28
<b>Figura 10.</b> Hanseníase Virchowiana: manchas eritêmato acastanhadas, mal delimitadas, no orso.....	Pág.29
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática da cascata “ômica”.....	Pág.35
<b>Figura 12.</b> Gráficos de dispersão do índice ELISA de IgM anti-PGL-1 em pacientes e amostras de controle.....	Pág.49
<b>Figura 13.A.</b> Curva padrão da qPCR.....	Pág.50
<b>Figura 13.B.</b> Gráfico de amplificação da qPCR em tempo real.....	Pág.50
<b>Figura 14:</b> Quantificação da carga bacilar em amostras de esfregaço dérmico de pacientes e de indivíduos do grupo controle.....	Pág.51
<b>Figura 15.</b> <i>Heat map</i> mostrando a intensidade normalizada dos metabólitos significantes dos 3 grupos (PB, MB e controle).....	Pág.54

<b>Figura 16.</b> <i>Heat map</i> mostrando a média intensidade normalizada dos metabólitos significantes dos 3 grupos (PB, MB e controle).....	Pág.55
<b>Figura 17. Modelo de predição por J48.</b> Árvore de decisão gerada a partir da análise dos dados do soro pelo algoritmo J48.....	Pág.56
<b>Figura 18.</b> <i>Heat map</i> utilizando os 25 metabólitos expressos diferencialmente pelo <i>Random Forest</i> .....	Pág.59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Aspectos clínicos da classificação da hanseníase conforme Ridley & Jopling.....	Pág.25
<b>Tabela 2:</b> Esquema de PQT pacientes PB de hanseníase com 6 cartelas.....	Pág.33
<b>Tabela 3:</b> Esquema de PQT pacientes MB de hanseníase com 12 cartelas.....	Pág.34
<b>Tabela 4.</b> Variáveis clínicas e epidemiológicas dos pacientes e controle (não doentes) conforme classificação operacional, forma clínica, sexo e faixa etária.....	Pág.49
<b>Tabela 5.</b> Indicadores do teste diagnóstico.....	Pág.51
<b>Tabela 6.</b> Lista dos 14 metabólitos diferencialmente expressos no soro de pacientes MB, PB e controle.....	Pág.52
<b>Tabela 7.</b> Matriz de metabólitos do soro gerada após o teste de <i>Tukey</i> .....	Pág.53
<b>Tabela 8.</b> Matriz de confusão modelo J48 das amostras de soro comparando os três grupos (MB, PB e controle).....	Pág.56
<b>Tabela 9.</b> Matriz de confusão gerada a partir da análise dos dados dos soros do algoritmo <i>Random Forest</i> .....	Pág.57

## SUMÁRIO

ABSTRACT.....	14
RESUMO.....	15
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Aspectos Históricos.....	16
1.2 Aspectos gerais.....	17
1.3 Epidemiologia .....	20
1.4 Transmissão da doença.....	22
1.5 Classificação da Hanseníase.....	23
1.6 Manifestações clínicas.....	25
1.7 Aspectos do diagnóstico da Hanseníase .....	29
1.8 Tratamento e resistência medicamentosa.....	33
2. METABOLÔMICA .....	35
3. JUSTIFICATIVA.....	39
4. OBJETIVOS .....	40
4.1 Objetivos Gerais.....	40
4.2 Objetivos Específicos.....	40
5. METODOLOGIA .....	41
5.1 Amostras biológicas .....	41
5.2 Critérios de inclusão/exclusão.....	41
5.3 Dados clínicos e epidemiológicos .....	42
5.4 Coleta de sangue periférico .....	42
5.5 Dosagem de anticorpos por ELISA.....	42
5.6 Coleta de amostras para extração de DNA.....	43
5.7 Extração de DNA .....	43
5.8 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....	44
5.9 Análise Quantitativa (qPCR).....	44
5.10 Preparo dos metabólitos .....	44
5.11 Metabolômica por MS.....	45
5.12 Análise estatística do metaboloma .....	45
5.13 Análise estatística do metaboloma .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.14 Algoritmos de classificação .....	46
5.15 Análise estatística das variáveis clínicas e epidemiológicas .....	47
6. RESULTADOS.....	48
6.1 Caracterização clínica e epidemiologia.....	48
6.2 Diferenças do índice ELISA anti PGL-1 entre pacientes com hanseníase e controles .....	49

6.3 Sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para o ensaio qPCR baseado em curva padrão .....	50
6.4 Análise do metaboloma do soro .....	52
7. DISCUSSÃO.....	60
8. CONCLUSÃO .....	67
9. REFERÊNCIA .....	68
10. ANEXOS.....	79

## ABSTRACT

Hansen's disease still represents a health problem in Brazil and worldwide. This disease, caused by *Mycobacterium leprae*, mainly affects the skin and the peripheral nervous system. Currently, clinical symptoms are used for the diagnosis of this disease; however, there is still no fast and reliable laboratory diagnosis. The early diagnosis of Hansen's disease and monitoring strategies for populations at risk of becoming ill is a challenge for its eradication. This study sought to identify changes in the metabolic profile induced in the serum of Paucibacillary and Multibacillary patients. In this study, plasma was used from individuals with different forms of Hansen's disease (PB = 42, Mb = 39), as well as from healthy individuals (control group, n = 37). The analysis of the metabolomic profile was carried out in the High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) system coupled to a quadrupole-flight-time mass spectrometer. The metabolic profile allowed the identification of 14 metabolites differentially expressed in the serum; 14 were responsible for the differences between the PB and control groups. Likewise, 14 metabolites were expressed differently between the MB and control groups; 4 differentially expressed metabolites were responsible for the difference between the PB and MB groups. Moreover, using the Random Forest classification algorithm, it was possible to differentiate the groups of infected and uninfected patients with an accuracy of 98.62%. These metabolites must be validated so that these molecules can be used as biomarkers not only to classify clinical forms but also to assess disease progression or to be used as therapeutic targets.

**Keywords:** Hansen's disease. Diagnosis. Mass spectrometer. Metabolomics.

## RESUMO

A hanseníase ainda representa um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Essa doença, causada pelo *Mycobacterium leprae*, afeta principalmente a pele e o sistema nervoso periférico. Atualmente sintomas clínicos são utilizados para o diagnóstico desta doença, no entanto, ainda não existe um diagnóstico laboratorial rápido e confiável. O diagnóstico precoce da hanseníase e estratégias de monitoramento de populações sob risco de adoecer é um desafio para eliminação. Esse estudo buscou identificar as mudanças no perfil metabólico induzido no soro de pacientes PB e MB. Nesse estudo foram utilizadas amostra de soro de indivíduos portadores das diferentes formas de hanseníase (PB = 42, MB = 39) bem como de indivíduos sadios (controles, n=37). A análise do perfil metabolômico foi analisado no sistema de HPLC acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo-de-vôo. O perfil metabólico permitiu identificar 14 metabólitos diferencialmente expressos entre o grupo PB e controle. Da mesma forma, 14 metabólitos foram expressos de forma distinta entre o grupo MB e controle; 4 metabólitos diferencialmente expressos foram responsáveis pela diferença entre o grupo PB e MB. Ainda, utilizando o algoritmo de classificação *Random Forest*, foi possível diferenciar os grupos de doentes e não doentes com acurácia de 98,62 %. Esses metabólitos devem ser validados para que essas moléculas possam ser utilizadas como biomarcadores não só para classificar as formas clínicas, mas também para avaliar a progressão da doença ou serem utilizados como alvos terapêuticos.

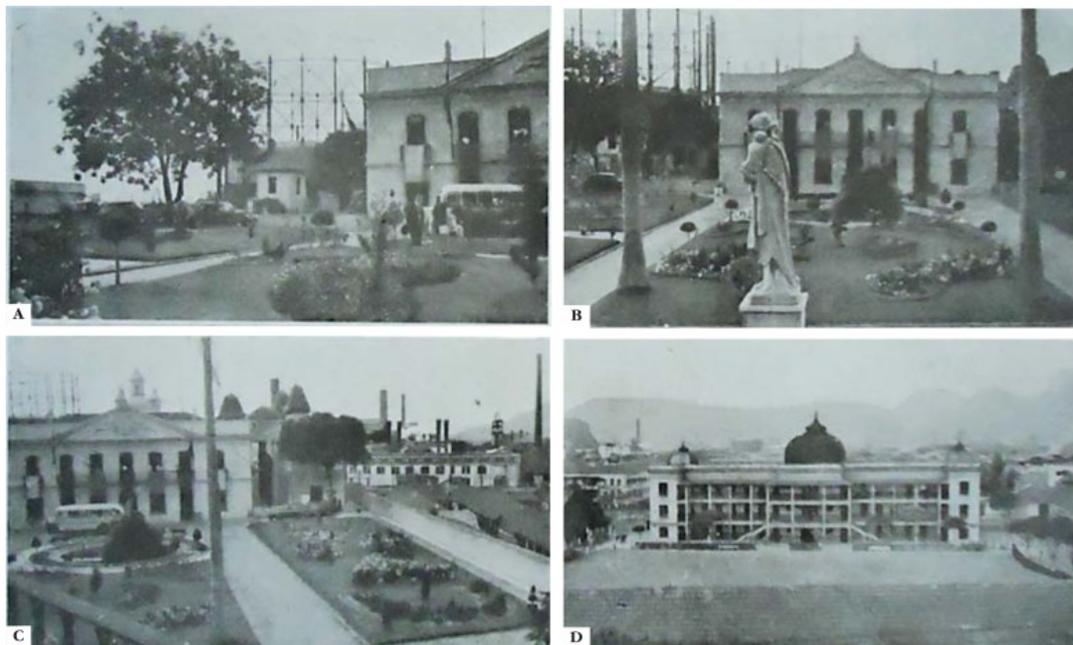
**Palavras-chave:** Espectrômetro massas, metabolômica, hanseníase e diagnóstico.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos Históricos

Em termos históricos, a hanseníase é uma doença milenar, sendo conhecida desde a antiguidade com citações em textos bíblicos que a denominava como lepra, sempre associada ao preconceito e a exclusão social. O responsável pela identificação do *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) como agente etiológico transmissível da hanseníase em 1873, foi o pesquisador Gerhard Amauer Hansen, que realizou diferentes pesquisas nos períodos entre 1870 e 1874, revolucionando os conceitos da época sobre a moléstia (BORENSTEIN et al., 2008; JUCKER-KUPPER, 2009).

Durante o período de colonização, a América Latina tornou-se, gradativamente, uma nova área endêmica mundial, especialmente devido ao tráfico de escravos africanos para as Américas, estabelecendo assim a principal via da disseminação no continente, sendo um período de grande importância para que o nosso continente fosse classificado como uma nova área endêmica mundial. No Brasil, na cidade do Rio de Janeiro, foi identificado e descrito o primeiro caso da doença no país. Neste mesmo local seria criado o primeiro leprosário nacional (**Figura 1**), destinado a abrigar os doentes de Lázaro ou leproso (EIDT, 2004; YAMANOUCHI et al., 1993).



**Figura 1. Primeiro leprosário Nacional.** Após a chegada dos portugueses, europeus e os escravos africanos, a lepra foi introduzida no Brasil. No Rio de Janeiro, aumentou a pressão para que as vítimas fossem retiradas das ruas. Em 1763, Frei Antônio, o bispo do Rio de Janeiro, fundou o hospital no bairro

de São Cristóvão. Fonte: [https://www.researchgate.net/figure/Hospital-Frei-Antonio-Former-Hospital-dos-Lazaros-de-Sao-Cristovao-Photograph-taken\\_fig1\\_263165540](https://www.researchgate.net/figure/Hospital-Frei-Antonio-Former-Hospital-dos-Lazaros-de-Sao-Cristovao-Photograph-taken_fig1_263165540).

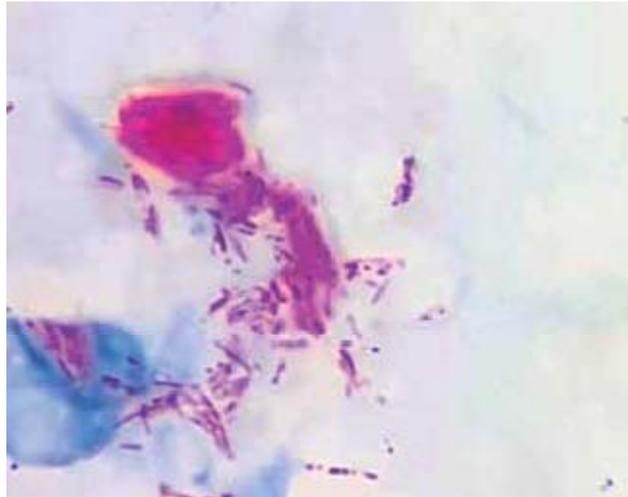
Em 1941, com a reorganização do Departamento Nacional de Saúde (DNS), foi criado o Serviço Nacional da Lepra com o objetivo de lutar contra a doença. Outro marco importante para o combate e para diminuição do estigma da doença foi à realização da 8ª Conferência Nacional de Saúde em 1980, onde foi possível recuperar o direito dos cidadãos, desativarem alguns leprosários e transformar outros em hospitais gerais (PIRES et al., 2011).

A luta contra a hanseníase vem evoluindo muito, porém mesmo com o passar dos anos, a hanseníase continua representando um grande desafio para os programas de saúde pública nos países em desenvolvimento como o Brasil, que ocupa o segundo lugar no mundo em número de casos novos da doença (“WHO | Leprosy”, 2016).

## 1.2 Aspectos gerais

O *M. leprae*, bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) de crescimento lento, é o agente etiológico da hanseníase, doença infectocontagiosa de evolução lenta, que se manifesta principalmente por sinais e sintomas dermatoneurológicos em consequência do padrão de resposta imunológica frente à infecção causada por seu agente etiológico (FOSS, 1999; GROSSI ARAÚJO, 2003; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

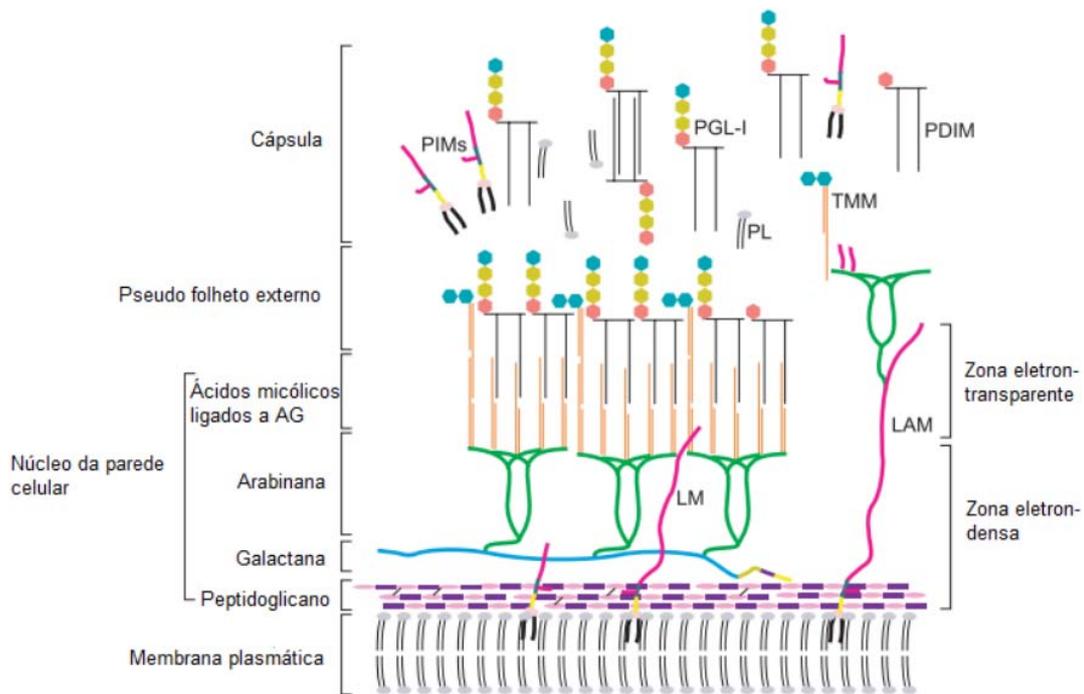
O *M. leprae* é um microrganismo do reino *Monera*, pertencente ao domínio *Bactéria*, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacterineae* e família *Mycobacteriaceae*, onde possui apenas um gênero *Mycobacterium* (*fungus bacterium*). Apresenta-se sob a forma de bacilo levemente encurvado ou reto, com extremidades arredondadas e mede aproximadamente 1 a 8 µm de comprimento e 0,2 a 0,5 µm de diâmetro (**Figura 2**) (ALVES; FERREIRA; NERY, 2014; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).



**Figura 2. *Mycobacterium leprae* coradas pela técnica Ziehl-Neelsen.** São evidenciadas pela coloração de ZIEHL-NEELSEN: coram-se pela mistura de fucsina mais ácido fênico aquecido, que penetra no citoplasma e resistem à descoloração com uma mistura de álcool e ácido. As bactérias se apresentam em forma de bacilos longos corados em vermelho. Fonte: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/963833/7-manual-diagnostico-laboratorial-version-final.pdf>

Observado em microscopia óptica, o *M. leprae* pode ser observado formando aglomerados ou globias em arranjos paralelos. A replicação do bacilo é muito lenta e ocorre por processo de divisão binária; não possui capacidade de mover-se, não produz toxinas e nem plasmídeos, microaerófilo, não tem a capacidade de formar esporos, é Gram-positivo e um Bacilo álcool-ácido resistente (BAAR)(ALVES; FERREIRA; NERY, 2014; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

O bacilo da hanseníase possui um envelope celular extremamente complexo e com uma estrutura composta por membrana celular, parede celular composta prioritariamente por peptidoglicanos e ácidos micólicos, e uma cápsula rica em glicolípido fenólico I (PGL-I, do inglês *Phenolic Glycolipid-I*) (**Figura 3**). As proteínas do envelope celular possuem um papel fundamental na patogênese do *M. leprae*, como é o caso das adesinas que possuem um papel importante nos sítios que constituem as fontes primárias de infecção; sendo responsáveis pela interação do bacilo com as células de *Schwann* e também da interação com as células epiteliais e endoteliais (SILVA et al., 2013; VIDAL PESSOLANI et al., 2003; ZENHA; FERREIRA; FOSS, 2009).



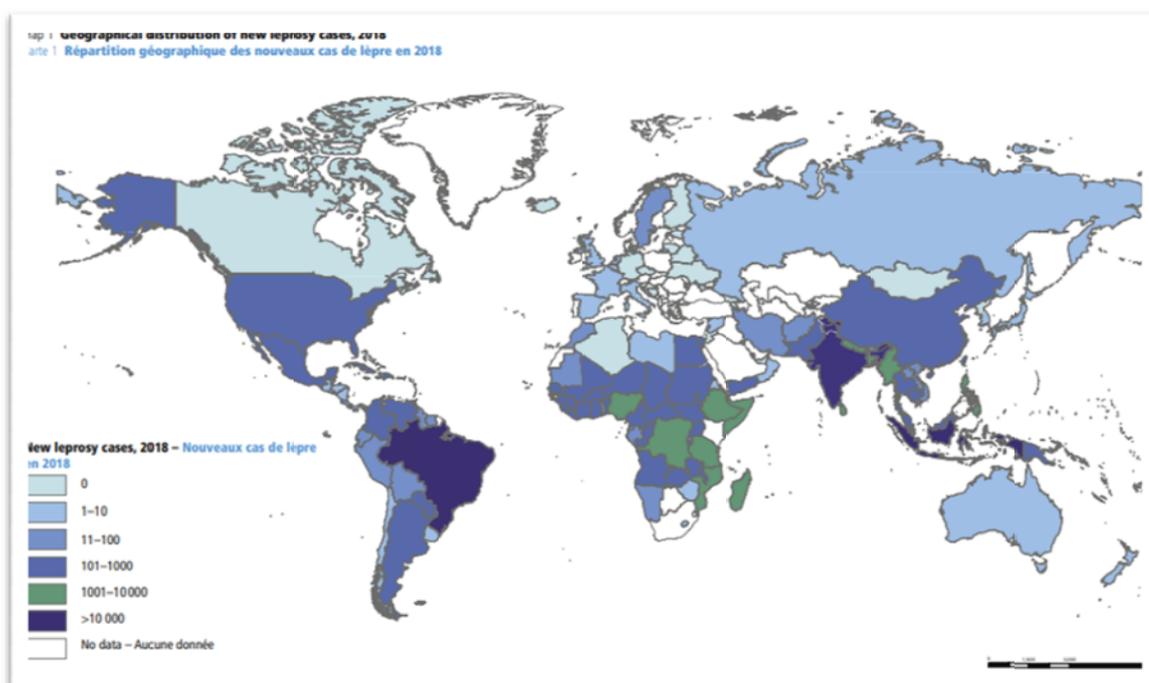
**Figura 3. Modelo esquemático da parede celular de *M. leprae*.** AG – arabinogalactana; LAM – lipoarabinomana; LM – lipomanana; PDIM – dimicocerosato de fitiocerol; PGL-I – glicolípido fenólico I; PIM – manosídeo de fosfatidilinositol; TMM – monomicolato de trealose; PL – fosfolípido. Fonte: adaptado de (VISSA; BRENNAN, 2001).

O *M. leprae* apresenta tropismo pelas células de *Schwann* localizadas nos nervos periféricos e por macrófagos de pele, o que resulta em lesões neurológicas e lesões cutâneas polimórficas, compostas por infiltrado granulomatoso que varia de acordo com a forma clínica da doença. Mesmo sendo pouco virulento, o bacilo possui mecanismos importantes para sua sobrevivência como a habilidade de induzir desdiferenciação e aumento na capacidade proliferativa das células de *Schwann*, que passam a exibir propriedades similares as células progenitoras (BHAT; PRAKASH, 2012; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015; SILVA et al., 2008).

Como já mencionado, o bacilo se manifesta em nervos periféricos, incluindo os nervos cranianos, levando a perda da condução neural e, conseqüentemente, a importantes alterações sensitivas, anatômicas e funcionais nos membros e na face (SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015). O comprometimento ocorre tanto nas células de *Schwann* mielinizadas quanto nas não mielinizadas, podendo também interferir na capacidade básica de interação com os axônios e na produção de mielina (EARLA, 2015; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015). Ele possui crescimento lento (aproximadamente 14 dias) em temperatura de 33-34°C, o que beneficia o seu metabolismo explicando o seu tropismo por áreas periféricas do corpo (BHAT; PRAKASH, 2012; GUTIERREZ; SUPPLY; BROSCH, 2009).

### 1.3 Epidemiologia

A hanseníase nos países em desenvolvimento como o Brasil, continua sendo um sério problema para os programas de saúde pública permanecendo como uma doença de grande desafio diagnóstico. No final de 2018, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência global da hanseníase registrada foi de 184.212 casos (0,24 casos por 10.000 habitantes), com 208.619 casos novos (2,74 casos novos por 100.000 habitantes) reportados por 159 países, dos quais 96% foram notificados em 23 países, incluindo o Brasil (**Figura 4**). Com maior concentração nos estados da Região Norte e Centro-Oeste e algumas regiões metropolitanas do Nordeste, a distribuição no Brasil é considerada heterogênea. Do total de casos novos 2.109 (7,4%) foram diagnosticados tardiamente, com grau 2 de incapacidade (BRASIL, 2019).



**Figura 4.** Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase no mundo em 2018. Fonte: Adaptado do Relatório Epidemiológico da OMS sobre hanseníase (“WHO | Leprosy: new data show steady decline in new cases”, 2019).

Foi elaborada em 2016 pela OMS a estratégia global para a hanseníase, sendo esses, a aceleração rumo a um mundo sem hanseníase (2016-2020), destacando três grandes pilares a serem trabalhados para fortalecer o controle, a coordenação e a parceria com o governo; combater a hanseníase e suas complicações e ainda, eliminar a discriminação promovendo concomitantemente a inclusão (**Figura 5**) (“WHO | Leprosy: new data show steady decline in new cases”, 2019).



**Figura 5.** Os três pilares da estratégia global para a hanseníase (2016-2020) e seus componentes Fonte: (“Global Leprosy Strategy 2016–2020: Accelerating towards a leprosy-free world”, [s.d.]).

O Brasil, alinhado com o plano mundial, vem desenvolvendo a Estratégia Nacional para o Enfrentamento da Hanseníase (2019-2022), que tem como objetivo essencial assegurar compromisso político e recursos para os programas de hanseníase nas esferas federal, estadual e municipal, assim fortalecendo as parcerias governamentais, não governamentais e interfaces para promover o diagnóstico precoce de casos de hanseníase (BRASIL, 2019). Esta estratégia visa ainda desenvolver pesquisas básicas e operacionais sobre todos os aspectos da hanseníase, potencializando a base de evidências para orientar políticas, estratégias e atividades, fortalecer o sistema de vigilância e informação em saúde para o controle e avaliação do programa, inclusive sistemas de informações geográficas (WHO, 2019). No âmbito do enfrentamento da hanseníase e suas complicações, a estratégia tem como objetivo assegurar o início imediato, adesão e conclusão ao tratamento, além de qualificar as ações de prevenção e manejo das incapacidades; promovendo e fortalecendo as equipes de estratégia da família na qualificação e educação permanente para reforçar a conscientização dos pacientes e da comunidade sobre a hanseníase. Em relação ao combate à discriminação e promoção da inclusão, planejam apoiar modelos de desenvolvimento inclusivo fortalecendo a capacidade de participação ativa das pessoas acometidas pela hanseníase, além de promover o acesso a serviços e programas de apoio social e financeiro (BRASIL, 2019). Para isso, a implementação no Brasil das estratégias e termos práticos, projeta diminuir a taxa de novos casos de hanseníase com grau de incapacidade 2 (GI2)

no diagnóstico para 5,5 casos/1 milhão, e em 44% para crianças com GI2; além de reduzir a zero o estigma e a discriminação dos indivíduos já afetados por essa doença tão negligenciada (BRASIL, 2019).

#### **1.4 Transmissão da doença**

*M. leprae* é transmitido pelo contato íntimo e prolongado com doentes portadores de hanseníase multibacilar e que ainda não se encontram em tratamento, havendo favorecimento transmissão, interferência de fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente em que vivem, como o aumento do risco de contaminação em condições precárias de moradia e de superlotação (ARAUJO et al., 2016; MARQUES et al., 2018; NUNES SARNO, 2003).

A mucosa nasal de pacientes com hanseníase e as lesões de pele constituem as portas de entrada no organismo em condições favoráveis, como também são consideradas as vias de eliminação do bacilo (ARAUJO et al., 2016; SANTOS et al., 2017). Araújo et al. (2016) em um estudo recente comprovam e sistematizam que a via aérea é a principal forma de eliminação e disseminação do bacilo. Este estudo foi realizado analisando o DNA por meio da Reação em cadeia polimerase quantitativa (qPCR) de amostras das biópsias de concha nasal, *swabs* nasais e da sorologia de pacientes e contatos, mostrando a importância das vias aéreas no papel central na interação inicial com o bacilo e, conseqüentemente, na persistência da doença no contexto epidemiológico (ARAUJO et al., 2016).

O bacilo caracteriza-se por alta infectividade e baixa patogenicidade, significando que poucos indivíduos irão apresentar sinais clínicos da doença. Isso ocorre devido a ação do sistema imunológico que consegue isolar, controlar a multiplicação e destruir o patógeno, ou seja, a progressão da doença depende resposta imunológica do paciente (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; GROSSI ARAÚJO, 2003; NUNES SARNO, 2003).

Alguns estudos expõem que a carga bacilar e a forma clínica do paciente com hanseníase também são determinantes importantes na transmissão da doença, contatos com maior risco de contrair hanseníase são aqueles próximos a pacientes que exibem alta carga bacilar, como no caso das formas multibacilares. Porém, indivíduos com infecção subclínica também podem carrear e transmitir o bacilo, sendo importantes na epidemiologia da hanseníase, pois não são diagnosticados e, conseqüentemente, não recebem terapia. (DA COSTA MARTINS et al., 2010; MOET et al., 2004a, 2004b).

Fatores sociais e econômicos contribuem na para a transmissão da doença. A hanseníase é uma enfermidade negligenciada pelos governos, talvez pelo fato dos casos ocorrerem em uma parcela da população que é social e economicamente vulnerável (GARBIN et al., 2015; MOURA et al., 2016).

A identificação de casos de portadores assintomáticos da doença, o diagnóstico precoce, o tratamento correto e o acompanhamento de doentes e contatos pelos serviços de atenção básica a saúde, são elementos fundamentais para cessar a transmissão e prevenir as alterações sensitivo-motoras de diversas regiões do corpo e suas consequências mutiladoras, evitando assim as limitações no convívio social (GARBIN et al., 2015; MOET et al., 2004a).

### **1.5 Classificação clínica da Hanseníase**

A classificação clínica da hanseníase apresenta relação com as peculiaridades clínicas, histopatológicas e com o grau de imunidade do hospedeiro frente à capacidade de multiplicação bacilar. Os sinais clínicos são antecidos de um longo período de incubação, e variam desde máculas hipocrômicas, placas eritematosas na pele a nódulos cutâneos, sem ou com comprometimento neural (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

Devido ao comportamento fastidioso de *M. leprae*, estudos demonstram que o surgimento dos sintomas pode levar de dois a sete anos devido a um longo período de incubação do bacilo no hospedeiro. Neste contexto, calcula-se que 95% da população geral têm boa resistência imunológica (natural) contra *M. leprae*, podendo alguns indivíduos após a infecção evoluir com cura espontânea. Nos 5% susceptíveis, a hanseníase pode se manifestar de diferentes formas clínicas, dependendo de fatores do hospedeiro, tais como susceptibilidade genética, condições socioeconômicas, sexo e idade (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; GROSSI ARAÚJO, 2003; LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

A classificação da hanseníase leva em consideração o amplo espectro de manifestações clínicas segundo as peculiaridades clínicas, imunológicas e histopatológicas. Inicialmente a classificação da doença foi realizada por Madri (1953), foram adotados critérios de polaridade que consideraram características clínicas, parâmetros bacteriológicos, imunológicos e histológicos. Foram estabelecidos os grupos polares, Tuberculóide (T) e Virchowiano (V) ou Lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma Indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma Borderline (B) ou Dimorfo (D) (BAKKER, 2005; DE LEPROLOGÍA (6°. 1953).

MADRID, 2019).

A Classificação segundo Ridley e Jopling (R&J, 1966), considera a hanseníase como uma doença espectral com dois polos imunologicamente estáveis e distintos: Tuberculóide (T) e Virchowiano (V); e uma forma imunologicamente instável – Dimorfo (D), que se subdivide em três grupos: Dimorfo-Tuberculóide (DT), Dimorfo-Dimorfo (DD) e Dimorfo-Virchowiano (DV) (**Tabela 1**). Ridley e Jopling levaram em consideração a imunidade dentro de um espectro clínico de resistência do hospedeiro, onde a forma polar T apresenta-se como uma doença localizada, com vigorosa resposta imune celular, poucos bacilos e lesões limitadas. Enquanto o polo V, é caracterizado pela elevada susceptibilidade a *M. leprae*, com proliferação disseminada do bacilo produção de lesões de pele difusa e uma resposta adaptativa humoral robusta constituída por anticorpos anti-*M. leprae*. Na subdivisão DT, DD e DV observam-se formas imunologicamente instáveis com evolução progressiva de DT para DV com redução da resposta imune mediada por células, acompanhada por altos níveis humorais, aumento da carga bacilar e numerosas lesões cutâneas e neurológicas (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; OKADA, 1989; RIDLEY; JOPLING, 1966).

Na classificação simplificada proposta pela OMS, de caráter apenas operacional e que é amplamente utilizada para tomada de decisão de conduta terapêutica, leva em conta a carga bacilar e sistematiza a proposta terapêutica. Nela os pacientes são divididos em Paucibacilares (PB), quando apresentam até cinco lesões cutâneas e baciloscopia negativa, e Multibacilares (MB) com mais de cinco lesões cutâneas e/ou baciloscopia positiva (**Tabela 1**) (OPROMOLLA, 2000; WHO, 1988).

Achados clínicos e laboratoriais	Forma Clínica				
	Tuberculóide	Dimorfo-Tuberculóide	Dimorfo-Dimorfo	Dimorfo-Virchowiano	Virchowiano
Número de lesões	Geralmente única	Uma ou poucas	Várias	Muitas	Muitas
Tamanho das lesões	Variável	Variável	Variável	Variável	Pequena
Superfície das lesões	Muito seca, às vezes escamosa	Seca	Ligeiramente brilhante	Brilhante	Brilhante
Sensibilidade nas lesões	Ausente	Moderada ou marcadamente diminuída	Levemente ou moderadamente diminuída	Levemente diminuída	Não afetado ou minimamente afetado
Crescimento de pelo nas lesões	Ausente	Marcadamente diminuído	Moderadamente diminuído	Levemente diminuída	Não afetado
BAAR nas lesões	Nada	Nulo ou escasso	Números moderados	Muitas	Muitos
BAAR em raspagem nasal	Nada	Nada	Nada	Geralmente nula	Muitos
TESTE DE MITSUDA	Fortemente positivo (+++)	Fracamente positivo (+ ou ++)	Negativo	Negativo	Negativo

*Tabela 1. Classificação da Hanseníase segundo Ridley e Jopling, detalhando os critérios clínicos, laboratoriais e as respectivas formas clínicas da doença.*

## 1.6 Manifestações clínicas

Por ser uma doença de evolução lenta, a hanseníase possui um período de incubação variável (2 a 7 anos), existindo relatos de períodos mais curtos de 7 meses, como também mais longos de 10 anos. O longo período de incubação deve-se ao fato de ainda existir casos que são difíceis de diagnosticar, atrapalhando a operacionalização da busca da fonte de infecção (BHAT; PRAKASH, 2012; FISCHER, 2017; LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

As principais manifestações neurológicas da hanseníase são observadas nos nervos periféricos, principalmente dos membros inferiores e superiores, sendo os nervos ulnar, radial, mediano, fibular e tibial os mais afetadas (BHAT; PRAKASH, 2012; MOURA et al., 2016). Os sintomas são progressivos e acompanham o processo de lesão com perda gradativa da sensibilidade (principalmente mãos e pés), atrofias, dores, parestias, paralisias musculares e deformidades (DE ARAÚJO et al., 2014; SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015).

A identificação das formas clínicas deve ser feita corretamente, permitindo o diagnóstico e o tratamento adequado do paciente. As manifestações clínicas da doença estão diretamente relacionadas ao tipo de resposta imunológica ao *M. leprae*

(MENDONÇA et al., 2008). Temos as seguintes formas clínicas da doença:

A forma I (**Figura 6**) ocorre nos indivíduos com resposta imune indefinida ao bacilo, sendo esse o estágio transitório da hanseníase. Caracterizada pelo aparecimento de manchas hipocrômicas ou eritemato hipocrômicas com alteração da sensibilidade; apresentando-se em manchas únicas ou com poucas lesões. As bordas das manchas podem ser bem demarcadas ou não, ausência de sudorese local, vasoconstrição e alopecia. Não há comprometimento de troncos nervosos e, por isso, não há, em princípio, desenvolvimento de incapacidades. As lesões podem permanecer estáveis, regredir ou evoluir para as formas do polo T ou V (FISCHER, 2017; POUDEL et al., 2019; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).



**Figura 6.** Hanseníase Indeterminada: máculas hipocrômicas, mal delimitadas, no dorso.  
Fonte: <http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2012/v17n4/a3329.pdf>

Já a forma T (**Figura 7**), caracteriza-se pelo controle da multiplicação bacilar. As manchas apresentam-se com bordas elevadas, bem demarcadas, geralmente são únicas ou pouco numerosas, distribuídas assimetricamente. Essa forma pode apresentar lesões em formato de placas ou anulares, com margens papulosas, eritematosas ou áreas da pele com hipocrômia. As lesões com desenvolvimento centrífugo lento induzem atrofia em seu interior, podendo apresentar descamação das bordas. Podem também apresentar aspecto tuberoso agrupadas em placas de diferentes tamanhos, lesões circinadas e geográficas. Existe variação de coloração que vai de róseo eritematoso a eritemato acastanhado com alteração significativa da sensibilidade. Existem relatos da ocorrência de alopecia parcial ou total. Os troncos nervosos podem estar comprometidos geralmente de forma assimétrica (FISCHER, 2017; POUDEL et al., 2019; REIBEL;

CAMBAU; AUBRY, 2015).



**Figura 7.** Hanseníase Tuberculóide: lesão anular na perna. Fonte: <http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2012/v17n4/a3329.pdf>

As formas D (DT, DD, DV) são caracterizadas pela instabilidade da resposta imunológica do hospedeiro, situando-se entre as formas T e V, alterando os seus aspectos clínicos entre elas. Essas formas refletem graduais variações da resistência ao bacilo, que tendem a se aproximar das características de cada uma das formas polares (**Figura 8**). A variedade DT apresenta lesões com aspecto T, porém são mais numerosas e pode haver o comprometimento de vários troncos nervosos. Na DV, as lesões são polimórficas com predomínio de placas e nódulos em grande número, com tonalidade pardacenta ou ferruginosa. Na DD, são observadas lesões anulares, similares a um alvo, de aspecto alveolar lembrando “queijo suíço”. A área central é geralmente hipocrômica ou normocrômica, com borda interna bem definida enquanto a borda externa é mal delimitada. O comprometimento neural em geral é importante. A pesquisa de BAAR pode ser negativa ou positiva com número variável de bacilos variável (FISCHER, 2017; GROSSI ARAÚJO, 2003; POUDEL et al., 2019; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).



**Figura 8.** Hanseníase Dimorfa: lesão com bordas externas esmaecentes e internas bem definidas no dorso da mão. Fonte: <http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2012/v17n4/a3329.pdf>

Caracterizada por grande polimorfismo lesional, a forma V pode afetar de maneira difusa diversas áreas da pele, múltiplos troncos nervosos e outros órgãos. Pode apresentar lesões disseminadas que podem ser eritematosas, infiltrativas com limites indeterminados e brilhantes. Nos locais de grande infiltração pode aparecer pápulas, tubérculos e nódulos. Pode haver infiltração difusa da face e pavilhões auriculares com perda de cílios e supercílios (**Figura 9 e 10**) (FISCHER, 2017; GUPTA et al., 2019; POUDEL et al., 2019; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).



**Figura 9.** Hanseníase Virchowiana: ressecamento da pele e hansenomas nas pernas. Fonte: <http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2012/v17n4/a3329.pdf>



**Figura 10.** Hanseníase Virchowiana: manchas eritemato acastanhadas, mal delimitadas, no dorso.  
Fonte: <http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2012/v17n4/a3329.pdf>

Índia e o Brasil relatam a existência da forma neural pura, onde é observado o comprometimento neural na ausência evidência de lesão cutânea, o que dificulta o diagnóstico da doença (DOS SANTOS et al., 2020; GARBINO et al., 2013; RAO; SUNEETHA, 2016). Estudos demonstram que as manifestações neurológicas como as parestesias localizadas, mononeurites ou mononeurites múltiplas, e mais raramente polineuropatias, podem preceder por vários meses o aparecimento de lesões cutâneas (SANTOS et al., 2017; GARBINO et al., 2013). Dependendo do nervo acometido e da área por ele inervada, o indivíduo pode apresentar diversas alterações graves, dentre elas podemos destacar: comprometimento do nervo ulnar, terá como ocorrência da chamada “mão em garra”. Quando a lesão ocorre no nervo radial, irá ocasionar a deformidade da “mão-caída”. No nervo mediano, temos perda da posição do polegar. Quando o nervo tibial é afetado, leva a perda da sensibilidade plantar e dedos “em garra”; e quando o nervo fibular é afetado, ocasiona a impossibilidade de levantar os pés (DE ARAÚJO et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2020; SANTOS et al., 2017).

A apresentação dos sinais clínicos, o desenvolvimento da doença e a possibilidade de cura espontânea, estão relacionados à condição imune do hospedeiro e carga bacilar, sendo assim, os casos PB apresentam menos danos e os casos MB exibem mais complicações referentes à doença (DA SILVA ROCHA et al., 2012; FOSS, 1999; LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

### **1.7 Aspectos do diagnóstico da Hanseníase**

O diagnóstico precoce da hanseníase e o tratamento adequado são elementos

fundamentais para cessar a transmissão e prevenir as incapacidades que tanto limitam as pessoas acometidas pela doença. O diagnóstico é fundamentalmente clínico sendo baseado em sinais cardinais da doença, como: lesões de pele com hipoestesia termo-analgésico, espessamento de nervos periféricos e presença do bacilo em esfregaços dérmicos, biópsia de pele ou nervo (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; OPROMOLLA, 2000).

O diagnóstico laboratorial baseia-se em ferramentas auxiliares que podem complementar o diagnóstico clínico, como a observação de bacilos do *M. leprae* na baciloscopia, o teste de intradermoreação (Mitsuda), a histopatologia, os testes imunológicos (sorologia e imunohistoquímica), genéticos (identificação molecular) e a eletroneuromiografia (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014; LIMA et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

O método de coloração de Ziehl-Neelsen é utilizado para a detecção dos BAAR na baciloscopia do esfregaço dérmico e de biópsia de lesão de pele sendo considerado padrão ouro no diagnóstico da hanseníase; porém, as formas PB, por terem poucos bacilos, dificilmente são detectáveis por este método convencional. Como na coloração de BAAR são necessários no mínimo 10.000 bacilos por grama de tecido para detecção confiável, a sensibilidade é baixa, principalmente em pacientes com características T da doença, onde os bacilos são raros ou ausentes (BRASIL, 2010). Diante disso, recomenda-se que seja feita a baciloscopia de pele para classificação dos casos de PB e MB, pois caso o exame apresente positivo, independentemente do número de lesões, o caso será classificado como MB. O método *Fite-Faraco*, técnica variante da Ziehl-Neelsen, é um procedimento a frio que pode auxiliar na obtenção de um melhor resultado (WHO, 2019).

Em relação à morfologia, esse teste verifica a viabilidade do bacilo para determinar a evolução ou a transmissão da doença. Para isso, o Ministério da Saúde preconiza realizar o raspado intradérmico em quatro sítios, com preferência pela lesão ativa ou com alteração de sensibilidade, além dos lóbulos auriculares e cotovelo contralateral à lesão. Caso não seja localizada, deve-se realizar o raspado intradérmico em ambos os lóbulos e cotovelos (BRASIL, 2010).

A baciloscopia negativa não exclui o diagnóstico de hanseníase e, se positiva, o Índice Baciloscópico (IB) expressará o número de bacilos em escala logarítmica entre 0

e 6, sendo metodologia quantitativo de escolha para determinar a leitura da baciloscopia para hanseníase (RIDLEY; JOPLING, 1966).

#### Escala Logarítmica de Ridley

- (0) – Ausência de bacilos em 100 campos examinados.
- (1+) – Presença de 1 a 10 bacilos, em 100 campos examinados.
- (2+) – Presença de 1 a 10 bacilos, em cada 10 campos examinados.
- (3+) – Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado.
- (4+) – Presença de 10 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado.
- (5+) – Presença de 100 a 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado.
- (6+) – Presença de mais de 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado.

O IB de um paciente é calculado por meio da média aritmética de quatro campos microscópicos no aumento de 1000x. Do ponto de vista morfológico, o *M. leprae* pode apresentar-se nas formas de bacilo íntegro, fragmentado ou granuloso, sendo o íntegro considerado a forma viável (RIDLEY; JOPLING, 1966).

O teste de Mitsuda indica o grau de imunidade do indivíduo ao contato com o antígeno de *M. leprae*, após injeção intradérmica de 0,1 mL desse antígeno na face anterior do antebraço direito distando 3cm abaixo da dobra antecubital (GARIBINO et al., 2013). Quanto à interpretação do teste, observa-se uma reação precoce em 72 horas, que se caracteriza por eritema e endureção local e uma reação tardia (reação de Mitsuda). Para a reação tardia, a leitura é realizada quatro semanas após a injeção, sendo considerada negativo se houver ausência de qualquer sinal no local de inoculação antigênica ou nódulo menor que 5mm de diâmetro. O teste de Mitsuda positivo, observa-se presença de nódulo maior ou igual a 5mm de diâmetro (BRASIL, 2010; LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

Para a identificação do bacilo, a histopatologia é realizada em biópsias de pele ou nervo, utilizando os métodos de coloração de hematoxilina-eosina e *Fite-Faraco*. Cada forma clínica é caracterizada por diferenças histológica. A forma T tem como achados os granulomas Tuberculóides, células Epitelióides, células gigantes de *Langhans* e citoplasmáticas em linfócitos. Já a forma V apresenta poucos linfócitos e a

presença de granulomas histiocitários abundantes em bacilos (PIRIS; LOBO; MOSCHELLA, 2010).

A sorologia para hanseníase é um teste complementar fundamental para o diagnóstico e monitoramento do tratamento da doença. Desde a década de 1980, com a descoberta do componente antigênico específico de *M. leprae*, PGL-I e o surgimento dos primeiros testes, possibilitaram o avanço no diagnóstico da hanseníase no que diz respeito à detecção da infecção subclínica e do diagnóstico precoce. Níveis elevados de imunoglobulina M (IgM) anti-PGL-I indicam presença do antígeno em pessoas que tiveram exposição recente a indivíduos MB ou que tiveram uma resistência terapêutica. No entanto, os títulos baixos de anticorpos estão presentes nas pessoas PB ou indivíduos tratados com boa resposta ao esquema terapêutico (DA COSTA MARTINS et al., 2010; LOBATO et al., 2011; SANTOS et al., 2018).

O surgimento de técnicas de biologia molecular é provavelmente um dos mais importantes avanços no diagnóstico laboratorial da hanseníase. A Reação em cadeia polimerase (PCR) convencional e a PCR em tempo-real são técnicas moleculares de identificação do material genético do *M. leprae* a partir de biópsias de pele, nervo, amostras muco nasal ou sangue (BARBIERI et al., 2019; SANTOS et al., 2018). Essas técnicas têm alta sensibilidade e especificidade diagnóstica porque amplificam sequências específicas de DNA do bacilo, auxiliando em casos de difícil diagnóstico clínico; tais como contatos domiciliares e sociais, histopatologia inconclusiva, na forma neural pura, baciloscopia negativa nos pacientes PB e quando não existem lesões de pele (MACHADO et al., 2020; MARTINEZ et al., 2014a). A PCR permite a amplificação e identificação do DNA de *M. leprae* em amostras contendo pequenas quantidades de bacilos, possibilitando auxiliar no diagnóstico de hanseníase, na classificação dos pacientes e no monitoramento do tratamento com a Poliquimioterapia (PQT) (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014; MACHADO et al., 2020; SANTOS et al., 2018).

Com o avanço tecnológico, outras inúmeras ferramentas laboratoriais vêm sendo desenvolvidas na investigação da hanseníase; tais como a eletroneuromiografia (estudo da função dos nervos e dos músculos), técnica que analisa a função do sistema nervoso periférico, diagnosticando a presença de lesões e a sua real localização; possibilitando a verificação complementar das informações da patologia (axonal, desmielinizante, mista) se aguda ou crônica. Essa ferramenta se tornou fundamental para auxiliar o diagnóstico

das formas neurais primárias da hanseníase, na evolução da terapêutica nos estados reacionais e nos diagnósticos diferenciais diante de outras neuropatias periféricas (GARBINO et al., 2013; SANTOS et al., 2018).

### 1.8 Tratamento e resistência medicamentosa

Na década de 40, a descoberta da Dapsona tornou a hanseníase uma doença tratável. Pelo baixo custo e baixa toxicidade, a monoterapia com a Dapsona logo se tornou a principal medida dos programas de controle da doença. Infelizmente o tratamento inadequado se tornou importante para o aparecimento de resistência secundária do bacilo a Dapsona. Logo a resistência primária a Dapsona surgiu levando ao aumento da taxa de resistência medicamentosa, o que tornou o tratamento ineficaz. A elevada taxa de recidiva após a cura com a monoterapia e a persistência de bacilos viáveis, fez com que a OMS incentivasse a busca por novos fármacos (BHAT; PRAKASH, 2012; DA SILVA ROCHA et al., 2012; EARLA, 2015). Assim, na década de 80, foi iniciada a poliquimioterapia (PQT) que utiliza associação de quimioterápicos bacteriostáticos e bactericidas por tempos pré-determinados, de acordo com a classificação clínica operacional de cada paciente.

A quimioterapia combinada com três drogas, Dapsona, Clofazimina e a Rifampicina, conhecida como PQT, é um esquema com doses fixas e parcialmente supervisionadas, que tem contribuído de forma importante para o tratamento da hanseníase desde sua implantação pela OMS em 1982 (WHO, 1982).

Pacientes PB são tratados com 600mg de Rifampicina mensalmente e 100 mg de Dapsona diariamente, no total de 6 doses em até 9 meses (**Tabela 2**). Pacientes MB são tratados com 600 mg de Rifampicina e 300mg de Clofazimina mensalmente e 50 mg de Clofazimina e 100 mg de Dapsona diariamente, num total de 12 doses em até 18 meses (BRASIL, 2016) (**Tabela 3**).

PQT para Hanseníase PB	
Dose mensal	Rifampicina 600 mg
	Dapsona 100 mg
Dose diária	Dapsona 100 mg

**Tabela 2.** Esquema de PQT pacientes PB de hanseníase com 6 cartelas.  
Fonte: Coordenação-Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação. CGHDE/DEVIT/SVS/MS, 2016.

PQT para Hanseníase MB	
Dose mensal	Rifampicina 600 mg
	Clofazimina 300 mg
	Dapsona 100 mg

Dose diária	Clofazimina 50 mg
	Dapsona 100 mg

**Tabela 3.** Esquema de PQT pacientes MB de hanseníase com 12 cartelas.  
Fonte: Coordenação-Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação. CGHDE/DEVIT/SVS/MS, 2016.

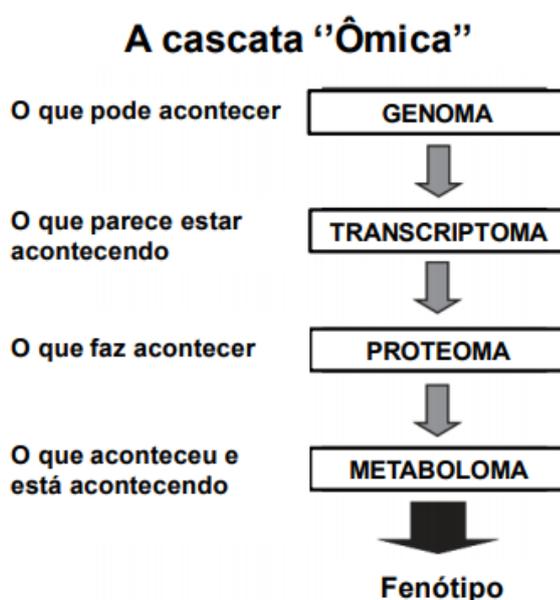
Apesar disso, a prevalência global da hanseníase, embora com tendência à queda, ainda permanecem significativos (WHO, 2009). Atualmente estão entre os principais desafios no tratamento e controle da hanseníase, detectar precocemente e vencer a resistência de *M. leprae* aos medicamentos disponíveis. Estudos recentes destacam o surgimento de cepas com mutações pontuais nos genes que codificam alvos de medicamentos, sendo este, um fator responsável pela resistência medicamentosa na hanseníase, representando uma ameaça à saúde pública e desafiando os avanços no combate da doença (CHAUFFOUR et al., 2018; VEDITHI et al., 2018).

Nos últimos anos, relatos de resistência a um ou mais medicamentos utilizados no tratamento da hanseníase vêm sendo reportados de forma global, tanto nos casos de recidivas e falências de tratamento, quanto em casos ainda não tratados (resistência primária) (CAMBAU et al., 1997; WILLIAMS; GILLIS, 2012). As recidivas, em conjunto com os casos de falência terapêutica, contribuem para dificultar a redução dessa estatística, já que poderiam agir na seleção de cepas com mutações associadas à resistência medicamentosa (CONTRERAS MEJÍA et al., 2014; LAVANIA et al., 2015, 2018).

## 2. METABOLÔMICA

As ciências ômicas buscam informações capazes de fornecer entendimentos acerca dos processos e das interações envolvidas no funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. As principais ômicas são a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. A genômica estuda a alteração do genoma, o conjunto de todos os genes de um determinado organismo. A transcriptômica estuda as alterações dos transcritos que determinam quais os genes serão expressos. A proteômica estuda as proteínas e moléculas com funções reparadoras e construtoras. A metabolômica estuda as alterações dos metabólitos, moléculas produzidas pelo metabolismo celular (CANUTO et al., 2018).

O termo metabolômica é relativamente recente, introduzido nos anos 2.000 por Dr. Oliver Fiehn e colaboradores (FIEHN et al., 2000). Entre as abordagens, essa é provavelmente a mais promissora área “ômica”; pois ela se aproxima do ponto final da “cascata ômica” (**Figura 11**). A partir da análise qualitativa e quantitativa da composição dos metabólitos de um organismo, é possível entender os processos biológicos através da avaliação das respostas metabólicas, bem como ter uma visão integrada dos efeitos biológicos sobre um organismo específico (FRAGA-CORRAL et al., 2020).



**Figura 11. Representação esquemática da cascata “ômica”.** A cascata “ômica” compreende conjuntos de dados complexos que apresentam de forma abrangente a resposta de sistemas biológicos a perturbações de doenças, genéticas e ambientais. Fonte: Adaptada de Dettmer; Aronov; Hammock, (2007).

A metabolômica tem como objetivo geral determinar os padrões de metabólitos de massa molecular baixa, caracteristicamente menor que 1500 Da, através da análise qualitativa e quantitativa, e correlacioná-los com o status fisiológico/bioquímico do organismo (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012).

A figura 11 mostra que a informação codificada no DNA é posteriormente transcrita em RNA mensageiro (RNAm). Esta molécula de RNAm é traduzida em uma proteína, que pode ser traduzida em enzima, com função biológica de catalisar reações intracelulares ou extracelulares intervindo na geração de metabólitos (pequenas moléculas químicas) (CANUTO et al., 2018; PACCHIAROTTA; DEELDER; MAYBORODA, 2012). Os metabólitos são compostos presentes em amostras biológicas (células, tecidos e fluídos), que regulam a atividade proteica, que tem a capacidade de intervir nos processos de transcrição e tradução, sendo o produto resultante do metabolismo celular. Além disso, possibilitam definir o fenótipo celular em respostas a alterações genéticas, de doença ou ambientais, pois representam a informação que integra a função da célula a um nível molecular (SANDLERS, 2017).

Observa-se que o metabolismo celular é integrado, existindo vários metabólitos que participam em diversas reações bioquímicas diferentes. Esses metabólitos existem em um estado de equilíbrio dinâmico sob condições normais. Quando o corpo recebe algum estímulo externo, a natureza e/ou a concentração destes metabólitos são alteradas. Os dados metabolômicos estão associados à complexidade química e a variação da concentração, portanto o desequilíbrio metabólico pode dificultar o seu entendimento global. Desse modo, a metabolômica evidencia essas mudanças de maneira a explicar essas modificações de um ponto de vista metabólico, e tem sido amplamente utilizada na descoberta de biomarcadores para doenças, que podem tornar-se fundamental em diversas aplicações como: diagnóstico precoce, acompanhamento da evolução de um tratamento e descoberta de novos fármacos (CRUZ et al., 2008; LIU et al., 2007; MASTRANGELO et al., 2015).

Devido à diversidade química e a extensa faixa de concentrações, a identificação e a quantificação dos metabólitos necessitam ser realizada utilizando um método capaz de detectar com sensibilidade adequada e permitir a identificação de tais compostos. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*), são as duas maiores plataformas usadas em metabolômica, na qual

cada uma delas possui suas próprias vantagens e desvantagens. RMN não realiza a separação dos analitos, e dependendo do solvente empregado a amostra pode ser utilizada para outras análises. Vários tipos de metabólitos podem ser quantificados simultaneamente, e como tal, RMN está perto de ser um detector universal (AL-MUBARAK et al., 2011; DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007; FRAGA-CORRAL et al., 2020; MARKLEY et al., 2017; WERNECKE et al., 2011). Entre as vantagens de RMN estão a reprodutibilidade analítica e a simplicidade no preparo da amostra. Porém, RMN é relativamente pouco sensível, e em análises de metabólitos pode ocorrer uma sobreposição de sinais muito maior quando comparado as técnicas de MS. Nas plataformas de metabolômica por MS, as técnicas hífenadas como Cromatografia Gasosa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*), Cromatografia Líquida (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) e Eletroforese Capilar (CE-MS, do inglês *Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry*), são as mais conhecidas na determinação do perfil metabólico de uma amostra biológica devido as suas altas sensibilidade e seletividade; altos desempenhos e ampla cobertura (DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007; POSTI et al., 2017; SHIMIZU et al., 2020; WANG et al., 2015).

Apesar de ser uma técnica recente, a metabolômica tem crescido amplamente devido a sua importância para a biologia de sistemas, uma vez que a expressão gênica ou proteica não resulta em uma alteração no fluxo metabólico. Os dados gerados pelas análises metabolômicas são abundantes e complexos, por isso, ferramentas adequadas de tratamento de dados devem ser empregadas no processamento destes para evitar erros e manter a integridade das variações biológicas inspecionadas (CLISH, 2015; DELGADO-POVEDANO et al., 2018; SANDLERS, 2017). Os estudos de metabolômica podem ser divididos em duas grandes abordagens: *untargeted* e *targeted* (respectivamente do inglês, “não direcionada” e “direcionada”). Na abordagem *untargeted*, também denominada de *fingerprinting* (do inglês, “impressão digital”), consiste na análise ampla de todos os metabólitos passíveis de detecção em uma amostra, incluindo espécies químicas desconhecidas. Essa abordagem oferece a oportunidade para a descoberta de biomarcadores que podem ser úteis em diagnósticos, tratamentos dentre outros. Já a metabolômica *targeted* consiste na medida da concentração de um número limitado e conhecido de metabólitos, sendo essa uma abordagem quantitativa; portanto, apresenta limites de detecção muito menores para

metabólitos conhecidos quando comparado à abordagem *untargeted* (CHO et al., 2017; GARCÍA et al., 2020; ZHA et al., 2018).

A MS vem sendo cada vez mais aplicada nos estudos envolvendo análises metabolômicas. Para isso os metabólitos devem ser extraídos e injetados no analisador, como o LC-MS, para que ocorram as etapas de separação, ionização, fragmentação e aquisição dos espectros. LC-MS é considerada uma técnica abrangente no que se refere à classe de compostos a serem analisadas, devido à grande variedade de fases estacionárias disponíveis, além dos diferentes modos de separação como a eluição em fase reversa (fundamentalmente partição), com ou sem pareamento iônico, interação hidrofílica e troca iônica. É uma técnica analítica que apresenta alta robustez, sensibilidade e seletividade, além de apresentar facilidades de operação. A identificação dos metabólitos também é realizada pela busca em bancos de dados de metabólitos conhecidos, entretanto, é bastante complexa (AL-QAHTANI et al., 2020; CHO et al., 2017; WANG et al., 2015).

### 3. JUSTIFICATIVA

A hanseníase ainda é uma doença com elevada prevalência no Brasil, portanto, do ponto de vista clínico e científico, acredita-se que o uso da metabolômica pode ser uma ferramenta utilizada para o diagnóstico precoce de novos casos da doença, prevenção da infecção em contatos domiciliares e sociais, e para monitoramento da eficácia do tratamento poliquimioterápico (EARLA, 2015; LASTÓRIA; DE ABREU, 2014). Complementarmente, ela pode ser fundamental para a descoberta de biomarcadores metabolômicos, clinicamente úteis que podem ser utilizados como alvos terapêuticos. 0

Embora trabalhos anteriores tenham demonstrado que já existem diversas metodologias para diagnóstico laboratorial da doença, ferramentas que detectam a doença em um estado inicial ainda é um desafio para interromper a transmissão. A falta de diagnóstico rápido pode ser visto como fator de risco para a disseminação da doença, dificultando a realização de um mapeamento detalhado do perfil de disseminação da mesma (LAVANIA et al., 2018; MOHANTY et al., 2018). Somado a isso, nos últimos anos a literatura científica tem apontado o envolvimento de vários metabólitos em diferentes funções biológicas, sendo possível medir com precisão o espectro de mudanças bioquímicas e mapear suas vias metabólicas; além de possuir utilidade na descoberta de biomarcadores de doenças e alvos de drogas (MASTRANGELO; BARBAS, 2017; MIRSAEIDI et al., 2015; SETHI et al., 2017).

Neste contexto, vimos que a metabolômica pode se tornar uma ferramenta de extrema importância para corroborar no entendimento e tratamento da hanseníase, permitindo avanços em pesquisas futuras sobre as assinaturas geradas por perfis metabólicos associados à doença e a exploração de outros mecanismos que compõem a relação do *M. leprae* com o hospedeiro humano.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivos Gerais**

Identificar os perfis metabolômicos séricos na busca de biomarcadores que possam ser usados para o diagnóstico precoce da hanseníase.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- Agrupar os pacientes de acordo com as características clínicas, epidemiológicas, imunológicas e pelo diagnóstico molecular;
- Identificar os metabólitos diferencialmente expressos no soro dos pacientes com hanseníase e nos pacientes não doentes (controle);
- Estabelecer um modelo de diagnóstico aplicando algoritmos aos metabólitos identificados.

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1 Amostras biológicas**

Amostras de sangue e de raspado dérmico dos pacientes com diagnóstico de hanseníase e do grupo controle (sem hanseníase) foram coletadas no Centro Nacional de Referência em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), do Hospital de Clínicas (HC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG, Brasil. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFU (nº 099/2003 e nº 499/2008) (Anexos 1 e 2).

As amostras foram organizadas em 3 grupos:

1 grupo controle de 37 indivíduos não hansenianos, 2 grupos de pacientes com hanseníase classificados de acordo com a OMS: 39 MB e 42 PB. Neste trabalho, os pacientes também são subdivididos de acordo com os critérios de R&J: MB: V e DV; PB: T e DT. Os critérios de inclusão e exclusão foram analisados e para os pacientes que preencheram todos os critérios foi solicitado o consentimento por meio de leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **5.2 Critérios de inclusão/exclusão**

Os critérios de inclusão para formação dos grupos caso e controle, foram:

- Indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos;
- Pacientes diagnosticados como portadores de hanseníase sem a utilização do esquema da PQT; e
- Pacientes sem evidências clínicas e/ou laboratoriais de diagnóstico de hanseníase para formação do grupo controle.

Sobre os critérios de exclusão, esses consistiram em:

- Pacientes em uso da PQT; e
- Indivíduos portadores de outras doenças crônicas ou que potencialmente afetariam os parâmetros clínicos e imunológicos das análises laboratoriais dessa pesquisa.

### 5.3 Dados clínicos e epidemiológicos

Os principais dados clínicos e epidemiológicos abordados nessa pesquisa foram:

- A forma clínica da doença baseado na classificação de R&J (1966), subdivididos em T, DT, DV, V;
- Foi utilizadas amostras Controle (CO), PB e MB fundamentada nos critérios da OMS e demais características clínicas, imunológicas e moleculares;
- Momento de diagnóstico;
- Sexo;
- Faixa etária;
- Os pacientes são submetidos ao exame clínico epidemiológico, sorologia ELISA IgM anti-PGL-1, qPCR da amostra do raspado dérmico; e
- Somente após investigação diagnóstica, realizou-se a definição da forma clínica conforme descrita anteriormente.

### 5.4 Coleta de sangue periférico

Foram utilizadas amostras de soro de 81 casos e 37 controles para determinação dos níveis de anticorpos IgM. Coletou-se sangue venoso por meio de punção venosa periférica para obtenção de soro utilizando-se os tubos *BD Vacutainer*® que não continha anticoagulante, cujo volume de material para cada amostra foi de 3,5 a 5 mL, conforme especificações do fabricante para cada tamanho de tubo. O soro foi separado por centrifugação a 4000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos, aliquotado e armazenado a -80 °C.

### 5.5 Dosagem de anticorpos por ELISA

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com antígenos específicos (PGL-I) em tampão carbonato-bicarbonato e incubadas por 1 hora a 37°C e *overnight* a 4°C. Após a incubação, lavaram-se as placas com tampão lavagem (*phosphate buffered saline* -PBS, 0,05% Tween), promoveu-se bloqueio das mesmas com soro bovino de albumina (BSA) 5% e essas foram incubadas por 1 hora a 37° C.

Em outra etapa, executou-se nova lavagem e adicionou o soro dos pacientes incubando-se novamente por 1 hora a uma temperatura de 37° C. Passado esse período,

as placas foram lavadas por 3 vezes e adicionou-se o anticorpo de detecção (anti-IgM para o PGL-I) conjugado com peroxidase e ocorreu nova incubação a 37°C por 1 hora. Enfim, as placas foram novamente submetidas à lavagem por 3 vezes e posteriormente a reação foi revelada pela adição do substrato contendo tampão citrato, cromógeno Orto-Fenileno-Diamina (OPD) e água oxigenada por 7 minutos. Para interrupção da reação utilizou-se ácido sulfúrico 2N e as placas foram lidas a 492nm com o auxílio de um espectrofotômetro da marca *SpectraMax® Plus 384* da molecular devices, determinando a intensidade da coloração e os níveis de anticorpos em cada grupo para o antígeno PGL-I.

## **5.6 Coleta de amostras para extração de DNA**

As coletas dos raspados dérmicos foram realizadas no CREDESH/HC-UFU. Os pacientes foram submetidos a coleta de esfregaço térmico sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia com o registro de nº 099/2003 e nº 499/2008.

Uma alíquota de cada esfregaço dérmico dos seis sítios (lóbulos das duas orelhas, os dois cotovelos e os dois joelhos), coletada para exame baciloscópico, foi depositada em um único tubo estéril contendo 800 µl de tampão de lise nuclear (TLN - NaCl 400mM, EDTA, pH 8,0 50 mM e Tris-HCl pH 8,0 25 mM).

A amostra foi processada no Laboratório de Pesquisa do Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária/Hanseníase (CREDSH), Hospital de Clínicas de Uberlândia, UFU/SUSMG.

## **5.7 Extração de DNA**

Para a extração do DNA de amostras de raspado, as mesmas foram incubadas com SDS 10% (*sodium dodecyl sulfate*) 37°C/ 1h, e posteriormente a 65°C/ 5h em uma solução de Proteinase K (10 mg/mL). Após adicionado 1/3 V(µl) de NaCl sturado (6 M) o tubo foi agitado manualmente com vigor. Centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 600 µl de etanol absoluto. Os tubos foram agitados e centrifugados por 15 minutos a 10.000 rpm. O etanol absoluto foi descartado e adicionado 600 µl de etanol 70%, invertendo-se os tubos diversas vezes para lavar o *pellet*. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Repetiu-se a lavagem com etanol 70% mais uma vez.

O pellet enriquecido em DNA foi dissolvido em 30 uL de tampão de eluição (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM) e estocados a -20 °C até a hora do uso.

A concentração e a qualidade do DNA precisa ser determinada em eletroforese por meio da razão 260/280 nm (onde o comprimento de onda de 260 nm quantifica o DNA e 280 nm quantifica o contaminante proteico) em espectrofotômetro *NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific)*, e amostras com pureza ideal (~1,8) foram selecionadas.

### **5.8 Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)**

Para a detecção do DNA de *M. leprae* em amostras, um par de iniciadores na concentração de 10 µM cada; (*forward*: 5'-GCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCA-3' e *reverse*: 5'-CGCTAGAAGGTTGCCGTATGTGC-3'), e 5 µM de sonda *taqman*® VIC-TCGATGATCCGGCCGTCGGCG-TAMRA, tendo como alvo a região gênica RLEP3 (X17153) do genoma do *M. leprae*, foi utilizado para amplificar um fragmento de 70 pb, utilizando condições previamente descritas (TRUMAN et al., 2008).

As reações foram realizadas na plataforma ABI7300 (*Applied Biosystems*) com o seguinte programa: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O resultado foi analisado utilizando o programa *7300 System SDS Software vs. 1.4*.

### **5.9 Análise Quantitativa (qPCR)**

Para realizar a análise do qPCR, foi utilizado curva padrão com pelo menos 10 pontos de diluições seriadas do produto de PCR de sequência com 819 pb da região RLEP3 de *M. leprae*. O *software SDS 7300 (Applied Biosystems)* forneceu o melhor ajuste entre os pontos, calculando a regressão linear e fornecendo o R-quadrado ( $R^2$ ), o *slope* (inclinação da curva) e o *y-intercept*. O  $R^2$  mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de *cycle-threshold* (Ct) das amostras padrão. O *slope* indica a eficiência da amplificação para o ensaio (um valor de 3,32 representa 100% de eficiência), e o *y-intercept* indica o valor esperado Ct para uma amostra com quantidade 1. Utilizando-se o *slope* pode se calcular a eficiência de cada reação, por meio da fórmula:  $E = 10^{-(-1/slope)} - 1$  (APPLIED BIOSYSTEMS, 2014).

### **5.10 Preparo dos metabólitos**

Para a análise do metaboloma do soro foram utilizadas 118 amostras, sendo 42

PB, 39 MB e 37 do grupo controle. Para a extração dos metabólitos foram adicionados 100 µL de amostra (Soro) em 1000 µL de metanol grau espectroscópicos e incubados por 4 h a -80 °C. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 minutos, a 13000 g, e o sobrenadante transferido para um microtubo; o qual foi submetido à concentração em uma centrífuga concentradora a vácuo e, posteriormente, liofilização. O armazenamento do material foi feito a -80 °C até o momento das análises.

### 5.11 Metabolômica por MS

As análises metabolômicas foram realizadas em um sistema de *high-performance liquid chromatography* (HPLC) (*Infinity 1260, Agilent*) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo-de-vôo (Q-TOF - *quadrupole time-of-flight*) (*6520 B, Agilent*) com *electrospray* (ESI) por injeção em fluxo. As amostras foram ressuspensas em 500 µL de metanol grau espectroscópica e filtradas em filtro de ponta de seringa com poro de 0,22 µm. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL. Os parâmetros cromatográficos foram: 0,2 mL.min<sup>-1</sup> de fluxo constante da fase móvel com a composição de 90 % metanol e 10 % de água acidificada com ácido fórmico (0,1 %). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20psi, gás secante a 8 L.min<sup>-1</sup>, temperatura de 220 °C e energia de 4,5 kVa aplicada no capilar. Os dados foram adquiridos nos modos de ionização positivo e negativo e cada amostra de soro foi injetada 3 vezes.

### 5.12 Análise estatística do metaboloma

Os espectros de massas foram submetidos ao *software Mass Profiler Professional (Agilent)* para alinhamento, normalização, teste de significância, *fold change* e análise multivariada. Os metabólitos foram filtrados utilizando abundância absoluta mínima de 5.000 contagens, frequência de 50% e 75% (apenas os compostos encontrados em 50% e 75% das amostras biológicas dentro de pelo menos um grupo foram considerados),  $p < 0,05$  e *fold change*  $> 2$ .

Os dados foram transformados em escala de log<sub>2</sub> e a abundância dos metabólitos foi analisada usando o teste ANOVA, com  $p < 0,05$  como critério de significância. Para identificar a diferença significativa entre os grupos foi utilizado o teste *post hoc Tukey*.

Para identificação dos metabólitos diferencialmente expressos entre os grupos,

os metabólitos foram injetados por infusão direta no mesmo espectrômetro de massas citado anteriormente, Q-TOF 6520 *B Agilent*. As amostras foram solubilizadas em metanol/água (4:1) e introduzidas diretamente no espectrômetro de massas utilizando uma seringa (100,0 µL), adaptada a uma bomba de infusão direta, com fluxo de 200,0 µL.h<sup>-1</sup>, sob as mesmas condições de ionização citadas acima. A identificação dos compostos foi realizada utilizando a massa de alta resolução (considerando o erro com a massa exata menores que 10 ppm), e os espectros de fragmentação (MS/MS), comparando com os bancos de dados *Human Metabolome Database* (HMDB) e *MassBank of North America* (MoNA).

#### 5.14 Algoritmos de classificação

Os metabólitos encontrados por LC-MS também foram analisados por meio de técnicas de Aprendizado de Máquina (AM), utilizando os algoritmos J48 ou C4.5 (SALZBERG, 1994) e *Random Forest* (RF) (BREIMAN, 2001). Ambos os algoritmos são métodos baseados em árvores de decisão, que contém ramificações, nós e folhas. Nessas árvores, as amostras são distribuídas nos grupos fenotípicos por meio de um conjunto de regras de decisão, que nesse caso são os valores médios de m/z (os nós) e intensidade dos metabólitos.

Enquanto o J48 gera apenas uma árvore, o RF gera randomicamente centenas de árvores variando os atributos (m/z) utilizados para dividir as árvores enquanto essas são construídas, resultando então em uma floresta de árvores de decisão. O consenso de classificação dessas várias árvores de decisão é utilizado para gerar médias estatísticas sobre o desempenho do preditor final. Geralmente são árvores extensas (muitas folhas e nós), difíceis de serem lidas por humanos, mas facilmente processadas por computador.

Foi utilizado o pacote de *software Weka*, uma biblioteca de algoritmos de aprendizado de máquina escrita na linguagem Java, com dezenas funções de aprendizado de máquina incluindo o J48 e o RF, bem como um algoritmo *CfsSubsetEval* para determinar quais metabólitos possuem maior correlação com a classificação dos dados de treinamento. Para a execução dos algoritmos do *software Weka* foram utilizados os parâmetros padronizados pela própria biblioteca. A validação cruzada (VC) foi utilizada para estimar a taxa de erro esperado pelos preditores para dados não utilizados no treinamento. Com a VC, as observações foram divididas em 10 partes de tamanhos aproximadamente iguais para o treinamento, sendo uma parte

reservada para teste e as outras nove como treinamento. O processo foi repetido 10 vezes, de forma que cada parte foi utilizada como teste uma vez. O valor médio dos erros obtidos nos 10 testes da VC foi computado como o erro médio do modelo treinado, ou seja, as quantias obtidas pela soma dos elementos fora da diagonal principal da matriz de confusão gerada ao término de cada treinamento.

### **5.15 Análise estatística das variáveis clínicas e epidemiológicas**

A análise estatística dos dados referentes às variáveis que caracterizaram os diferentes grupos, assim empregou-se o teste t de *Student* para amostras independentes (teste t não pareado) comparando as médias entre dois grupos em relação às variáveis selecionadas de maior importância como os marcadores antigênicos (anti-PGL-I) e o qPCR com auxílio do programa estatístico *GraphPad Prism 8.0®* (*GraphPad Software Inc.*), com  $p < 0,05$  como critério de significância.

## 6. RESULTADOS

A população desse estudo foi constituída por 2 grupos de pacientes diagnosticados com hanseníase e um grupo controle, não doentes. A amostra de pacientes doentes foi composta por indivíduos classificados operacionalmente como PB e com as formas clínicas T e DT; e indivíduos classificados operacionalmente como MB e com as formas clínicas DV e V.

### 6.1 Caracterização clínica e epidemiologia

A caracterização clínica e epidemiológica de ambos os grupos (doente e não doentes) pode ser observada na tabela 4. Da amostra total (118 amostras), 68.65% (81/118) eram indivíduos com hanseníase, sendo que o grupo composto por pacientes classificados DT e T (PB) foi de 35.6 % (42/118); o grupo composto por paciente classificados DV e V (MB) foi composto por 33.05% (39/118); o grupo controle (não doentes) foi composto por 31.1% (37/118) indivíduos.

A faixa etária foi dividida em 5 estratos. As faixas etárias mais frequentes foram de 40 a 59 anos (42 indivíduos; 35,3%) e de 60 a 79 anos (35 indivíduos; 29,4%). Na faixa etária entre 0 a 19 anos de idade (10.1%), 2 indivíduos eram PB (1.7%) e 10 eram controle (8.4%); na faixa etária entre 20 a 39 anos (21.8%), 8 indivíduos eram PB (6.7%), 8 MB (6.7%) e 10 eram controle (8.4%); na faixa etária entre 40 a 59 anos (35.3%), 16 indivíduos eram PB (13.4%), 13 MB (10.9%) e 13 controle (10.9%); na faixa etária entre 60 a 79 anos (29.4%), 15 indivíduos eram PB (12.6%), 16 MB (13.4%) e 4 controle (3.4%); na faixa etária entre 80 a 89 anos (2.5%), 1 indivíduo era PB (0.8%), 2 MB (1.7%) e 3 controle (2.5%).

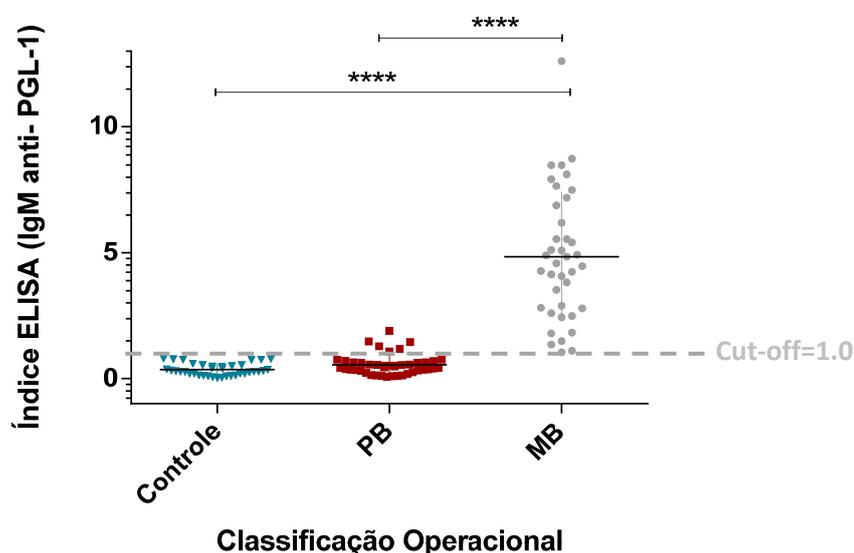
O sexo masculino foi maior na amostra total quando comparado ao feminino; sendo 64 (54,6%), dos quais 23 indivíduos são PB, 25 MB (21.0%) e 16 controle (13.4%); e 54 indivíduos são do sexo feminino, desses 19 são PB (16.0%), 14 MB (11.8%) e 21 controle (17.6%) (**Tabela 4**).

	Classificação Operacional	Forma Clínica	Sexo		Faixa Etária					Total
			Masculino	Feminino	0-19	20-39	40-59	60-79	80-99	
Doentes	PB	T & DT (n)	23	19	2	8	16	15	1	42
		%	19,3	16,0	1,7	6,7	13,4	12,6	0,8	35,6
Doentes	MB	DV & V(n)	25	14	0	8	13	16	2	39
		%	21,0	11,8	0,0	6,7	10,9	13,4	1,7	33,05
Controle		Não doente(n)	16	21	10	10	13	4	0	37
		%	13,4	17,6	8,4	8,4	10,9	3,4	0,0	31,35
Total	%		64	54	12	26	42	35	3	118
			54,6	45,4	10,1	21,8	35,3	29,4	2,5	100,0

**Tabela 4.** Variáveis clínicas e epidemiológicas dos pacientes e controle (não doentes) conforme classificação operacional, forma clínica, sexo e faixa etária.

## 6.2 Diferenças do índice ELISA anti PGL-1 entre pacientes com hanseníase e controles

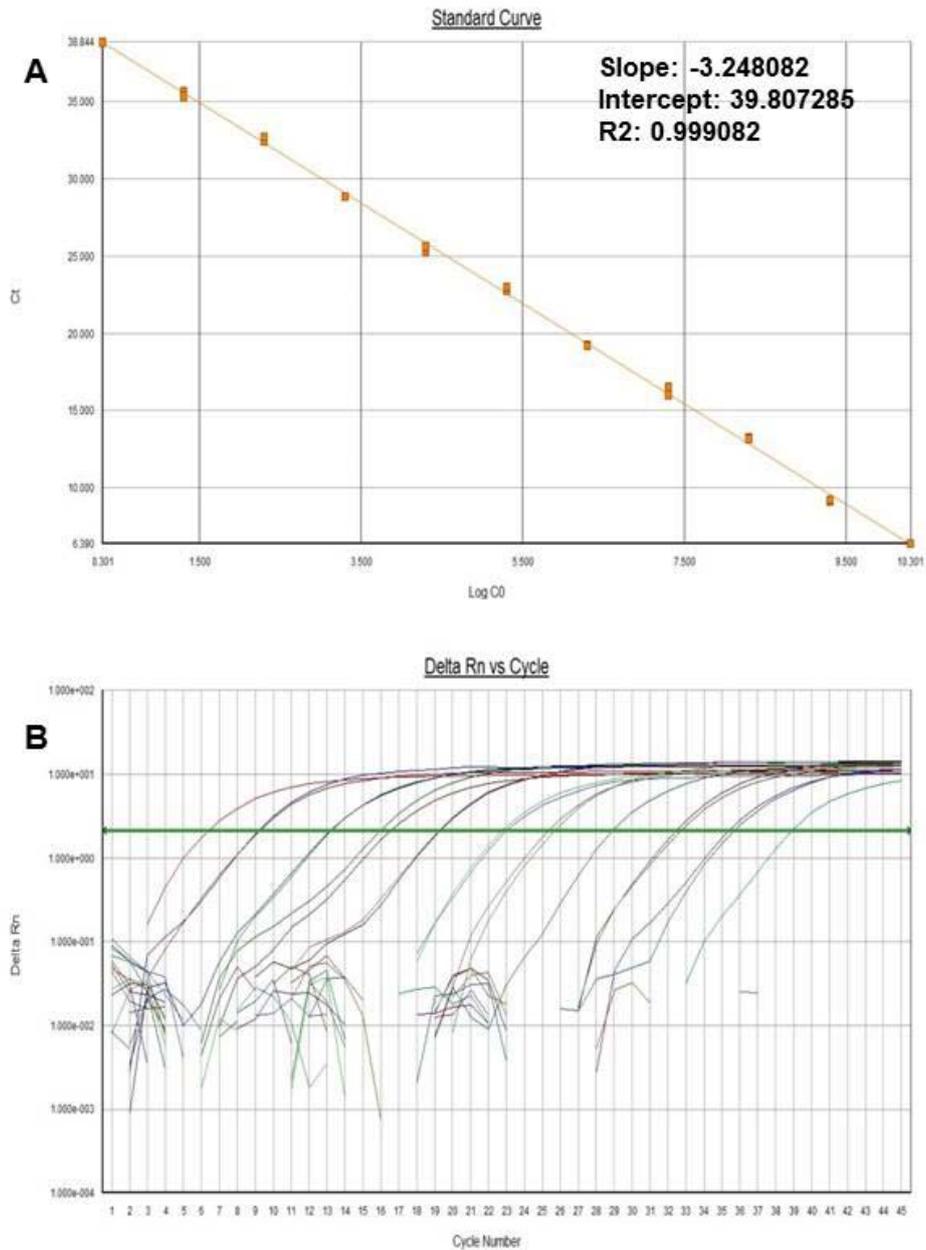
Foram comparados os Índices ELISA para os anticorpos anti-PGL-I em ambos os grupos, indivíduos doentes (PB e MB) e grupo controle, as comparações múltiplas das médias dos grupos nos vários momentos foram feitas utilizando o Teste de *Tukey*. De acordo com os valores de IE, foi encontrada diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os grupos PB versus MB ( $p < 0,0001$ ) e entre MB e o grupo controle ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos PB e controle (**Figura 12**).



**Figura 12.** Representação gráfica dos valores de Índice Elisa (IE) para anticorpos IgM anti-PGL1 de *Mycobacterium leprae* em três grupos de pacientes: Controle (não infectados); PB: paucibacilar (infectados com baixa carga de micobactéria) e multibacilar (infectados com alta carga de micobactéria). Valores de IE  $\geq 1$  foram considerados reagentes. Linha pontilhada: cut-off (IE=1). \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 6.3 Sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para o ensaio qPCR baseado em curva padrão

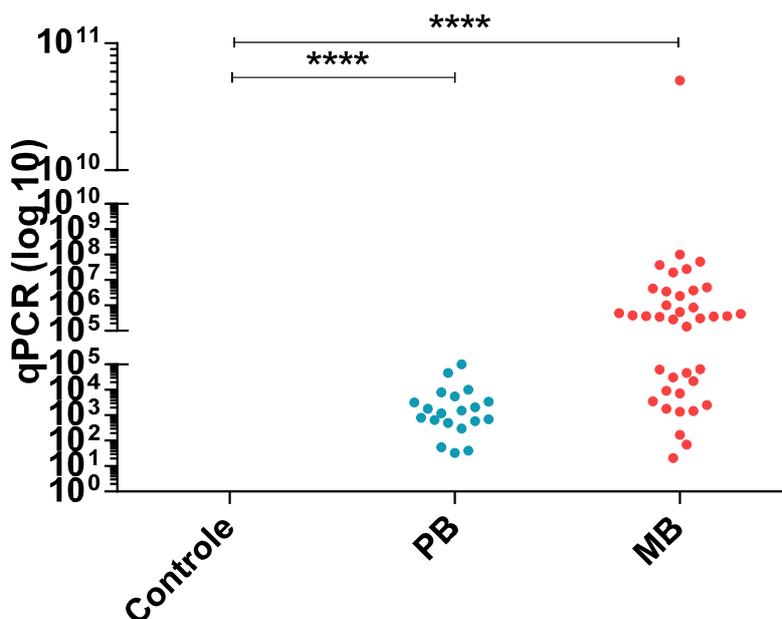
A linearidade obtida nas diferentes diluições da curva de quantificação absoluta demonstra a estabilidade da reação. A curva apresentou um *slope* de -3,24; eficiência da reação de 103,54% e  $R^2 = 0,99$ . Esses valores demonstram que o teste oferece alta sensibilidade (**Figura 13**).



**Figura 13.A.** Curva padrão da qPCR.

**Figura 13.B.** Gráfico de amplificação da qPCR em Tempo Real.

A qPCR foi a que apresentou maior positividade; porém somente 22 dos pacientes PB tiveram resultado positivos para a metodologia. Todos os pacientes MB tiveram resultados positivos para a qPCR. Também foi observado neste grupo uma carga bacilar mais elevada em comparação ao PB. Nenhuma das amostras dos indivíduos controles foram positivas (Figura 14).



**Figura 14.** Quantificação da carga bacilar em amostras de esfregaço dérmico de pacientes e de indivíduos do grupo controle. \*\*\*\*  $P < 0,0001$ .

Ao analisar os indicadores dos testes de diagnóstico, foi verificado que o teste de qPCR é uma ferramenta excelente de diagnóstico de indivíduos MB (100% de positividade), mas a positividade dos doentes diminui no grupo de PB (47.61%).

Teste	PB%	MB %	Controle %	Sensib.	Espec.	Acur.	Efici.	VP	VN
<b>PCR</b>									
Positivo	47.61% (20/42)	100% (39/39)	0% (0/37)	72.8%	100%	81.4%	86.4%	100%	62.7%
Negativo	52.39% (22/42)	0% (0/39)	100%(37/37)						
<b>IE</b>									
Positivo	14.28% (6/42)	100% (39/39)	0% (0/37)	55.6%	100%	69.5%	77.8%	100%	50.7%
Negativo	85.72% (36/42)	0% (0/39)	0% (37/37)						

**Tabela 5.** Indicadores do teste diagnóstico. PB- paucibacilar. MB-multibacilar, IE- índice Elisa, VP- valores Preditivos Positivos e VN- valores Preditivos Negativos.

A sorologia ELISA anti-PGL-I apresentou uma sensibilidade de 55.6% (45/81) e uma especificidade de 100% (37/37) com acurácia de 69.5%. Já a qPCR, utilizada para quantificar os níveis de bacilo, teve os melhores indicadores em comparação ao ELISA, conforme mostrado na tabela 5, com sensibilidade de 72,8% (59/81), especificidade de 100% (37/37) e acurácia de 74,97% (Tabela5).

## 6.4 Análise do metaboloma do soro

### Análise de significância

Os metabólitos do soro foram identificados por meio de MS nos modos de ionização negativos e positivos. Para as análises de significância e identificação dos compostos, seguiu-se somente com os dados provenientes dos espectros de massas obtidos no modo de ionização positivo. Após o processamento dos dados adquiridos, foram encontrados 1.280 compostos no soro das amostras.

Na primeira análise foi utilizado o filtro de frequência de 75% e aplicado um filtro de abundância (1.0E4). Dos 1280 metabólitos, 98 foram diferentemente expressos significativamente entre os grupos (valor de  $p < 0,05$ ). Nesta análise, 20 metabólitos foram diferencialmente expressos entre os grupos MB vs PB.

Em uma segunda análise utilizou-se o filtro de frequência de 100% e aplicado um filtro de abundância (1.0E4). Dos 1280 metabólitos, 14 metabólitos foram diferentemente expressos significativamente entre os grupos (valor de  $p < 0,05$ ) (**Tabela 6**).

S. No.	(a) Metabólito ou m/z	p (Corr)	Log FC (Controle vs Paucibacilar)	Log FC (Controle vs Multibacilar)	Log FC (Paucibacilar vs Multibacilar)
1.	<u>287.277</u>	0	21,531282	21,531282	0
2.	<u>287.2831</u>	5,34E-12	16,529676	12,5100155	-4,019661
3.	<u>315.3082</u>	0	20,478783	19,973553	-0,50522965
4.	<u>148.0162</u>	4,29E-09	9,557352	15,107552	5,5501995
5.	<u>402.2189</u>	5,11E-19	19,231655	16,96394	-2,267716
6.	<u>521.3507</u>	5,37E-17	-14,041386	-13,053219	0,9881668
7.	<u>333.1639</u>	4,88E-09	-9,072563	-10,809572	-1,737009
8.	<u>270.257</u>	0	-21,661545	-20,820747	0,8407974
9.	<u>337.3363</u>	0	-20,461102	-21,437302	-0,9762001
10.	<u>296.2729</u>	0	-21,60703	-21,62972	-0,02268982
11.	<u>298.289</u>	0	-20,918058	-20,12171	0,7963486
12.	<u>535.1605</u>	1,04E-26	-16,32299	-21,039637	-4,716646
13.	<u>609.1801</u>	6,15E-29	-18,642426	-22,938702	-4,296276
14.	<u>702.570</u>	1,91E-23	-7,276098	-20,327116	-13,051018

**Tabela 6.** Lista dos 14 metabólitos diferencialmente expressos no soro de pacientes MB, PB e controle. Filtro de frequência: 100%. FC = fold change. Valor de  $p < 0,05$ .

### Teste de significância e *Fold Change*

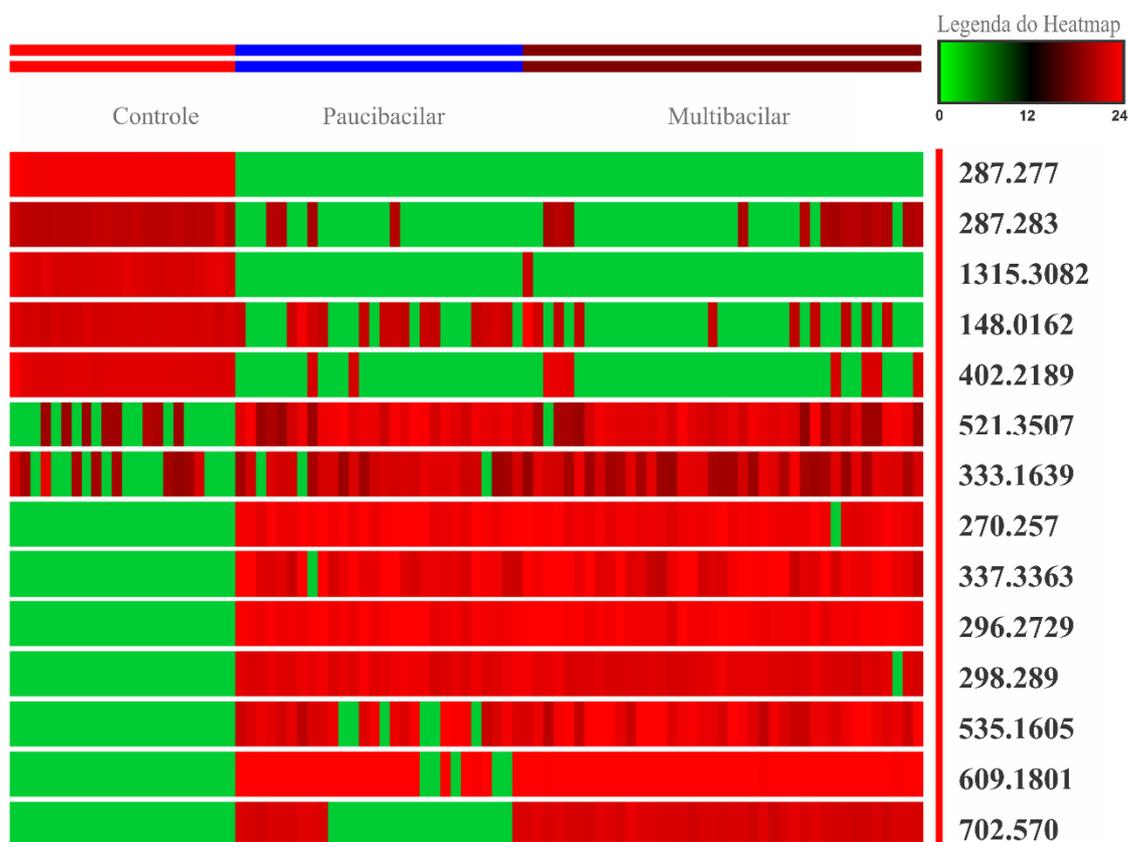
O pós-teste *Tukey* possibilitou identificar entre quais grupos esses metabólitos estavam alterados (**Tabela 7**). Dentre esses 14 metabólitos, todos foram responsáveis pelas diferenças do grupo PB e controle. Da mesma forma, 14 metabólitos foram expressos de forma distinta entre o grupo MB e controle; e 4 metabólitos diferencialmente expressos foram responsáveis pela diferença entre o grupo PB e MB. Dentre os 4 metabólitos que diferenciam os grupos PB e MB, um (massa~148) é regulado positivamente em relação ao grupo controle e 3 são regulados negativamente (massa ~ 535,609 e 702).

Grupo	Paucibacilar	Controle	Multibacilar
Paucibacilar	14	0	10
Controle	14	14	0
Multibacilar	4	14	14

**Tabela 7.** Matriz dos metabólitos do soro gerada após o teste *Tukey*. Os metabólitos que foram significativamente diferentes estão apresentados nos retângulos brancos, enquanto os que não foram diferentes estão apresentados nos retângulos cinza escuro. Em preto está o número total de metabólitos analisados.

### Mapa de calor (*heat map*) dos metabólitos diferencialmente expressos

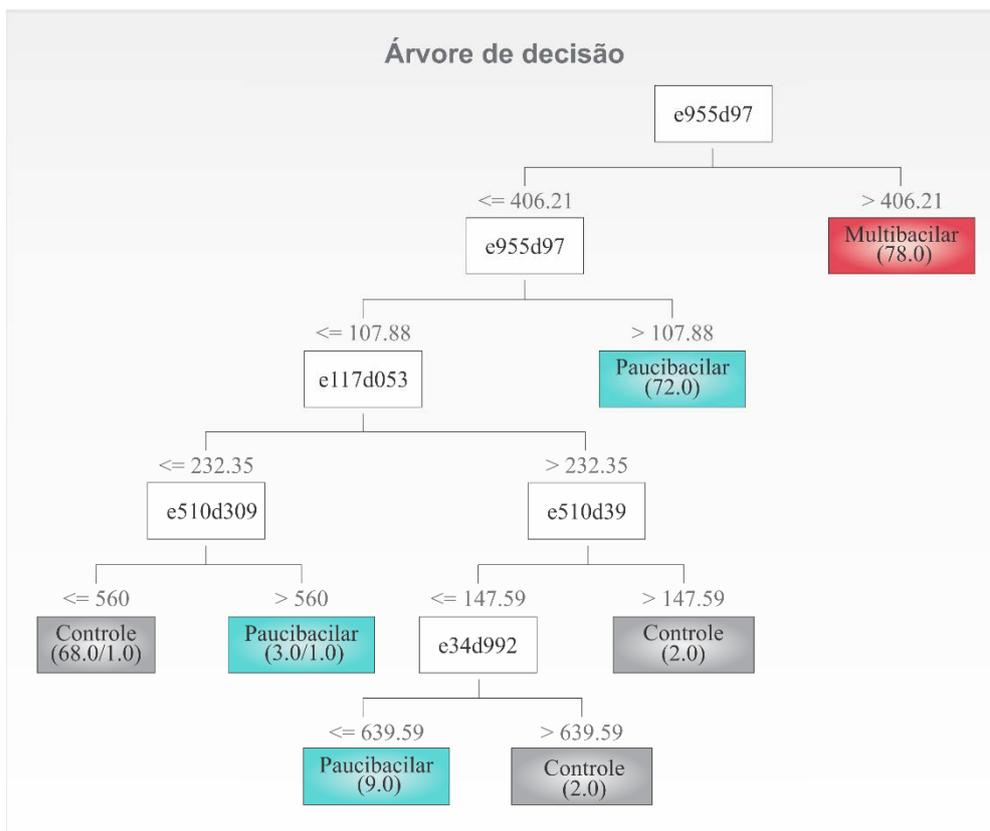
O mapa de calor da metabolômica do LC-MS, considerando os indivíduos separadamente, mostra os 14 principais metabólitos diferencialmente expressos (**Figura 15**). Para permitir a comparação dos dados obtidos a partir de LC-MS, a abundância de metabólitos foi normalizada. O código de cores indica a abundância de metabólitos. As linhas no mapa de calor representam a abundância relativa de metabólitos nas amostras individuais de cada grupo controle, PB e MB. Cada metabólito é indicado na coluna do lado direito da figura. Cada coluna corresponde às amostras individuais dos pacientes. Os resultados mostram claramente que o perfil do grupo de controle é significativamente diferente dos outros dois, pois os metabólitos significativamente diferenciados são comparativamente maiores na hanseníase. Os metabólitos significativamente diminuídos foram exibidos em verde, enquanto os metabólitos significativamente aumentados foram exibidos em vermelho. O brilho de cada cor correspondeu a magnitude da diferença quando comparada com o valor médio.



**Figura 15.** Heat map mostrando a intensidade normalizada dos metabólitos significantes dos 3 grupos (PB, MB e controle). A quantidade de cada metabólito em amostras individuais é expressa como valor relativo obtido pelo método de auto escala sendo representada pelo esquema de cores em que vermelho e verde indicam altas e baixas concentrações de metabólitos, respectivamente.

Outro *Heat map* foi feito utilizando a média de intensidade normalizada dos metabólitos significantes dos 3 grupos (PB, MB e controle). As linhas no mapa de calor representam a média de abundância relativa de metabólitos de cada grupo: controle, PB e MB. Cada metabólito é indicado na linha do lado direito da figura e cada coluna corresponde as médias do grupo (**Figura 16**). Os metabólitos regulados positivamente são mostrados na cor vermelha, enquanto os metabólitos regulados negativamente são apresentados na cor verde.





**Figura 17. Modelo de predição por J48.** Árvore de decisão gerada a partir da análise dos dados do soro pelo algoritmo J48.

A árvore de decisão obteve precisão de 98.71 %, com estatística *kappa* 0,9807; erro absoluto 0,0548 e raiz do erro médio quadrático 0,1149, resultando na matriz de classificação representada na Figura 17. A matriz de confusão obtida pelo J48, mostra que o algoritmo classificou todas as 78 instâncias provenientes do grupo MB corretamente, sendo o melhor grupo classificado pelo algoritmo. Ao analisar o grupo PB, o algoritmo classificou 7 casos incorretamente, classificando 1 como MB e 6 como controle. Já a análise do grupo controle, foram classificados incorretamente 6 dos 72 casos, classificando-os como PB (**Tabela 8**).

	Multibacilar	Paucibacilar	Controle
Multibacilar	78	0	0
Paucibacilar	1	77	6
Controle	0	6	66

**Tabela 8.** Matriz de confusão do modelo J48 das amostras de soro comparando os três grupos (MB, PB e controle).

Ao utilizar o algoritmo *CfsSubsetEval* para determinar os metabólitos mais significativos, a análise retornou 25 metabólitos do conjunto de dados negativos. Foi possível selecionar os metabólitos que possuem alta relação com o resultado da classificação e fraca dependência entre os demais metabólitos. Assim, foram selecionados e utilizados para construir as árvores de decisão do algoritmo *Random Forest*.

Essas árvores de decisão são grandes, dificultando suas análises e reproduzidas por humanos como as resultantes do algoritmo J48, mas são facilmente processadas por computador. A partir dos 25 metabólitos selecionados no soro, foram geradas as árvores de decisão utilizando o algoritmo *Random Forest*, sendo usado como resultado a média dessas árvores.

A matriz de confusão obtida pelo RF mostra que de 78 instâncias provenientes do grupo MB, o algoritmo classificou apenas 1 incorretamente como grupo PB, sendo classificado como melhor grupo pelo algoritmo. Ao analisar o grupo PB, o algoritmo classificou 2 casos incorretamente, classificando 1 como MB e outro como controle. Já a análise do grupo controle classificou todos os casos de forma correta. Dessa forma, por meio desse algoritmo foi possível classificar os fenótipos com uma excelente precisão, de 98,62 %, estatística *kappa* 0,9816, erro absoluto 0,0913 e raiz do erro médio quadrático 0,1407 (**Tabela 9**).

	Multibacilar	Paucibacilar	Controle
Multibacilar	77	1	0
Paucibacilar	1	82	1
Controle	0	0	72

**Tabela 9.** Matriz de confusão gerada a partir da análise dos dados do soro pelo algoritmo *Random Forest*.

Os valores massa/carga (*m/z*) dos metabólitos selecionados para a classificação utilizando o *Random Forest* serão incluídos em uma plataforma online de fácil acesso, que será aprimorada para a validação do método. Dessa forma, após realizar o teste de metabolômica para novas amostras, os dados extraídos serão submetidos a essa plataforma, e de acordo com os valores estabelecidos pelo algoritmo os pacientes serão classificados em não doentes e doentes (PB e MB).

Por último, foi utilizado os dados do arquivo de treinamento do *Random Forest* para gerar um *Heat map* de todas as amostras (eixo Y) contra todos os 25 metabólitos (eixo X). O *cluster* hierárquico presente no *Heat map* caracteriza a maior parte das amostras nas três classes da hanseníase que estamos analisando, sendo possível perceber a intensidade do sinal dos metabólitos nas classes da hanseníase (**Figura 18**).

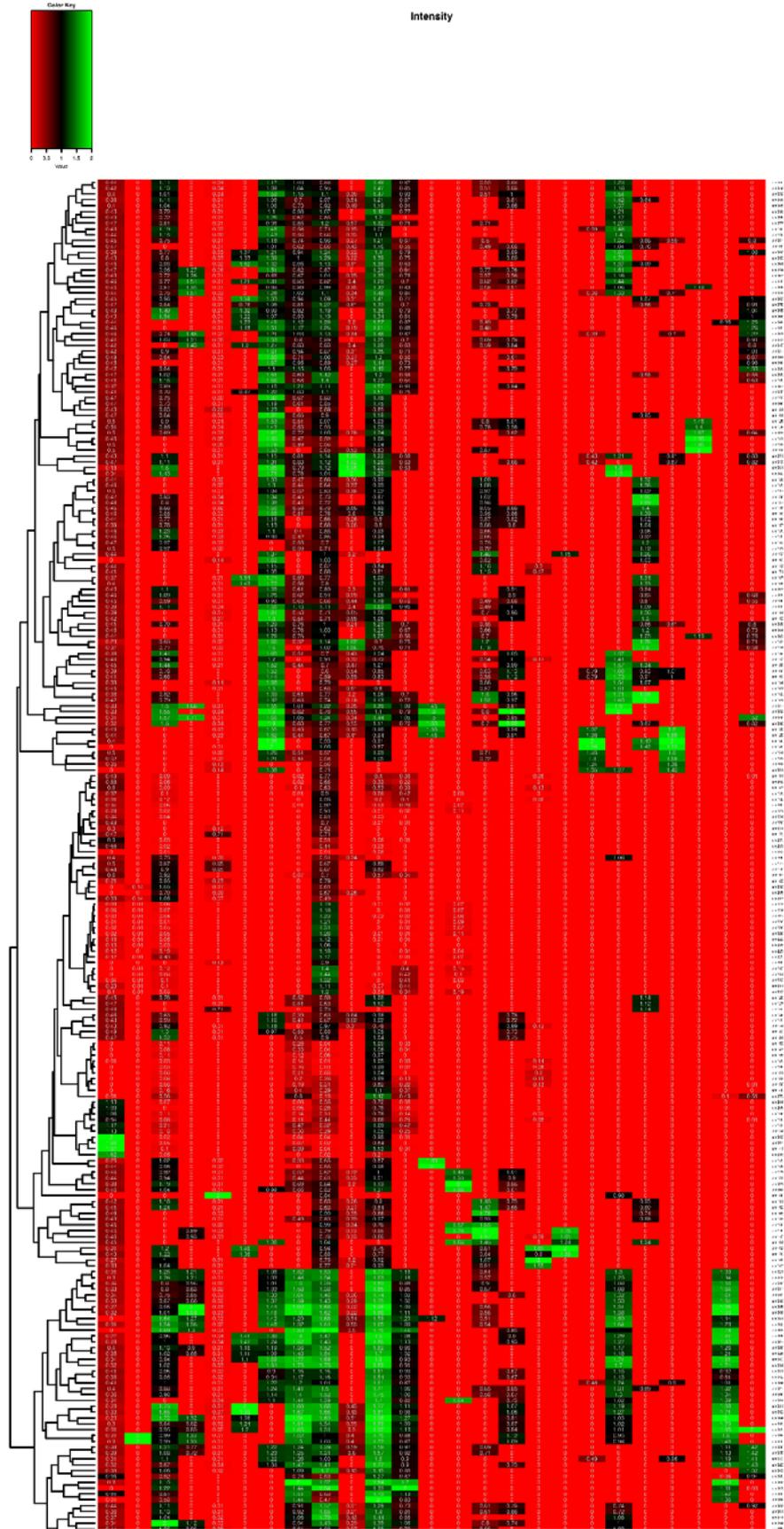


Figura 18. Heat map utilizando os 25 metabólitos expressos diferencialmente pelo Random Forest.

## 7. DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica, manifestada principalmente através de sinais e sintomas dermatoneurológicos como: lesões na pele e nos nervos periféricos, principalmente nas mãos e pés, dando-lhe um grande potencial para provocar incapacidades físicas que podem de modo inclusivo evoluir para deformidades. As incapacidades físicas na hanseníase têm grande impacto socioeconômico, contribuindo para o estigma e isolamento social determinados pela doença. Por isso mesmo, ratifica-se que a detecção precoce e o tratamento adequado são abordagens importantes para a descontinuidade da transmissão da doença (GARBINO et al., 2013; PIRIS; LOBO; MOSCHELLA, 2010).

As restrições ao se usar um sistema puramente clínico à classificação de pacientes com hanseníase sem considerar exames laboratoriais, podem levar a condutas inapropriadas nos tratamentos destes, de modo que, alguns podem usar drogas potencialmente tóxicas indevidamente e outros adotarem esquemas terapêuticos ineficazes, expondo a comunidade a uma fonte de infecção e mantendo a transmissão da doença (CRIPPA et al., 2004; CROFT et al., 1998). Esforços têm sido feitos para desenvolver metodologias de diagnóstico e de compreensão da fisiopatologia da doença. Neste cenário, este estudo apresenta metabólitos diferencialmente expressos no soro de pacientes com hanseníase que podem se tornar essenciais na busca de biomarcadores para serem usados no diagnóstico precoce, alvos terapêuticos e acompanhamento do tratamento na hanseníase.

No perfil epidemiológico do estudo, foi possível observar o predomínio da hanseníase no sexo masculino (57,6%) em relação ao sexo feminino (45,4%). Estudos anteriores demonstraram essa predominância do sexo masculino. Brito et. al., (2014), demonstrou que em 2010, dos 761 casos notificados de hanseníase, 396 casos (52%) eram do sexo masculino. Em outro estudo com 1.072 casos de hanseníase, envolvendo indivíduos maiores que 15 anos de idade, demonstrou a predominância do gênero masculino (51%) numa população com predominância de mulheres (GROSSI et al., 2008). Segundo autores, o aumento da predominância de casos no sexo masculino pode ser explicado pelo fato destes apresentarem uma exposição maior a ambientes de risco, além do fato dos homens apresentarem menor preocupação em relação a estética, o que acaba dificultando o diagnóstico (BRITO et al., 2015; FERREIRA; ALVAREZ, 2005;

MELÃO et al., 2011). Outro autor evidencia que no nível subclínico no sexo feminino, pode haver uma resposta imune mais efetiva contra a infecção por *M. leprae*. (OPROMOLLA, 2000).

Com relação aos dados relacionados à faixa etária, verificamos que 68 indivíduos (37.7%) tinham idade entre 20 e 59 anos, o que permite pressupor que a faixa economicamente ativa é a mais afetada pela infecção por *M. leprae*. Miranzi et al. (2010), afirmaram que pode haver prejuízos para a economia da região afetada; uma vez que essa população economicamente ativa pode desenvolver múltiplas incapacidades físicas, como deformidades, reações hansênicas e, por fim, a exclusão do mercado de trabalho, portanto gerando um grande prejuízo social. Outros estudos corroboram esses achados (BRITO et al., 2015; LANZA et al., 2012; MIRANZI; PEREIRA; NUNES, 2010; WENGER et al., 2005).

Atualmente, as principais aplicações da sorologia anti-PGL-I são para auxiliar na CO dos pacientes com hanseníase (aliada aos critérios clínicos) e identificar contatos de alto risco de desenvolvimento de hanseníase (GOULART et al., 2008). Em nosso estudo, os níveis de IE anti-PGL-I foram maiores no grupo de MB quando comparado ao grupo PB. Outros estudos sobre sorodiagnóstico da hanseníase, enfatizam essa predominância da soropositividade anti-PGL-I em indivíduos com hanseníase MB, confirmando que a titulação dos anticorpos (IgM) é diretamente proporcional à carga bacilar (BENJAK et al., 2018; FABRI et al., 2015; NAVES et al., 2009; PARKASH et al., 2006). Outros estudos demonstram que a repetição do teste de ELISA pode ser uma ferramenta adicional para medir a eficácia do tratamento de pacientes MB (MOET et al., 2008; OSKAM; SLIM; BÜHRER-SÉKULA, 2003). Estudos tem demonstrado que os resultados da sorologia anti-PGL-I podem ser úteis para a diferenciação de pacientes MB/PB e podem contribuir para decisões terapêuticas adequadas (DE MOURA et al., 2008).

A sorologia para detecção de anticorpos IgM específicos para o PGL-I, representa o teste sorológico mais bem avaliado e padronizado para hanseníase. Contudo, o nível de anticorpos em pacientes PB pode ser muito baixo ou indetectável, fazendo a sorologia anti-PGL-I ter utilidade limitada nesses pacientes (LOBATO et al., 2011; MOURA et al., 2014; SPENCER; BRENNAN, 2011). É importante destacar que a sorologia anti-PGL-I não permite distinguir entre infecção antiga ou recente e não deve ser utilizada de forma isolada como ferramenta de diagnóstico. Estudos demonstraram que em geral, os resultados da sorologia anti-PGL-I refletem a carga

bacilar do paciente: onde pacientes MB apresentam alta taxa de soropositividade (70-90%), enquanto apenas uma minoria dos pacientes PB (15-40%) tem sorologia positiva (DE MOURA et al., 2008; OSKAM; SLIM; BÜHRER-SÉKULA, 2003; VAN HOOIJ et al., 2018).

Os testes para diagnóstico de indivíduos sintomáticos em contextos epidêmicos devem apresentar sensibilidade e a especificidade alta (> 99%), pois um resultado falso negativo particularmente pode resultar em uma alta taxa de morbimortalidade, além de aumentar a transmissão e o risco de perpetuação da doença (CROFT et al., 1998). O qPCR em tempo real é uma plataforma de análise altamente sensível que oferece alta especificidade de detecção em comparação com outras plataformas quando segue os parâmetros de padronização ideais (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016). Neste estudo, avaliamos a carga bacilar pela técnica molecular qPCR, sendo essencial para rastreio dos doentes. O uso da metodologia molecular também provou ser particularmente útil na identificação da resistência medicamentosa do bacilo à medicamentos usados no tratamento da hanseníase, diagnósticos usados para distinguir entre processos reacionais e recidivos por análises de viabilidade do bacilo e no uso para diagnóstico em casos difíceis (BARBIERI et al., 2014; CAMBAU et al., 2018; E. et al., 2002; MARTINEZ et al., 2014b).

Nos últimos anos, métodos de PCR foram desenvolvidos para amplificar diferentes regiões de *M. leprae*, como o antígeno de 36 kDa (KAMPIRAPAP et al., 1998), o antígeno de 18 kDa (SCOLLARD; GILLIS; WILLIAMS, 1998) ou o antígeno de 65 kDa (PLIKAYTIS; GELBER; SHINNICK, 1990), Ag 85B (MARTINEZ et al., 2011), 16S rRNA (RUDEEANEKSIN et al., 2008) e sequências repetitivas (RLEP) (MARTINEZ et al., 2009). Outros estudos mostraram a excelente sensibilidade em verificar a alta carga bacilar em pacientes MB. No entanto, quando analisaram a carga bacilar dos pacientes PB, pesquisadores encontraram intervalos de sensibilidade da qPCR de 34% –80% (KRAMME et al., 2004; MARTINEZ et al., 2014a; RUDEEANEKSIN et al., 2008; SILVA et al., 2013). Em concordância aos estudos mencionados anteriormente, nosso trabalho mostrou uma alta sensibilidade na detecção do bacilo nos pacientes MB. Analisando a sensibilidade em pacientes PB foi demonstrado que o qPCR tem uma sensibilidade boa em comparação a sensibilidade do ELISA. Podemos considerar o teste molecular um passo à frente para o diagnóstico da hanseníase no estágio inicial. Isso demonstra que na prática clínica, a detecção do *M. leprae* por qPCR em pacientes PB com carga bacilar negativa ou baixa, seria de grande

valor para limitar a subjetividade no diagnóstico da hanseníase PB. Porém, ainda está longe de ser uma ferramenta utilizada como padrão-ouro no diagnóstico da hanseníase. Embora essa tecnologia esteja se tornando acessível e rápida, a infra-estrutura como equipamentos e profissionais treinados ainda é uma barreira a melhorar para a implementação de qPCR em ambientes com recursos limitados (BARBIERI et al., 2019; KRAMME et al., 2004; MARQUES et al., 2018).

Diante do importante papel do diagnóstico nas fases clínicas iniciais, o presente estudo propôs investigar biomarcadores metabólicos clinicamente úteis, que podem permitir a detecção precoce da doença se tornando uma ferramenta crucial para evitar a transmissão e lesões neurais incapacitantes, alcançando a meta de um mundo sem hanseníase.

A análise do metaboloma dos fluidos corporais está evoluindo rapidamente, fornecendo uma base tecnológica para a descoberta abrangente de vários biomarcadores associada a doenças (BANALES et al., 2019; JACOBS et al., 2019; MAYBORODA et al., 2016; VAN HOOIJ et al., 2019). Metabólitos fornecem uma impressão bioquímica dos eventos que ocorrem nas células e no corpo como um todo. As assinaturas geradas por perfis metabólicos associados a doenças podem ser exploradas como correlatos de doença, proteção ou eficácia do tratamento (BOLLARD et al., 2005; MAYBORODA et al., 2016; SPENCER et al., 2012).

Como já citado, a metabolômica é uma ótima ferramenta para estudar essa doença na busca de novos biomarcadores e no entendimento da patofisiologia da hanseníase; uma vez que os metabólitos são extremamente sensíveis a alterações na resposta celular (MAYBORODA et al., 2016; PACCHIAROTTA; DEELDER; MAYBORODA, 2012). Além disso, pelo metaboloma é possível identificar respostas celulares a exposições anteriores, o que torna essas pequenas moléculas mais proximais dos processos da doença (SETHI et al., 2017).

A análise metabolômica dos pacientes com hanseníase classificados de acordo com critérios clínicos permitiu identificar mudanças no perfil metabólico deles. Neste estudo, foram identificados 14 metabólitos diferencialmente expressos entre esses grupos, sendo que alguns estavam superexpressos e outros subexpressos. Esses 14 metabólitos foram responsáveis pelas diferenças do grupo PB e controle. Da mesma forma, os 14 metabólitos foram expressos de forma distinta entre o grupo MB e controle; 4 metabólitos diferencialmente expressos foram responsáveis pela diferença entre o grupo PB e MB. Esses metabólitos devem ser mais bem estudados, uma vez que

podem ser estabelecidos como biomarcadores não só para classificar as formas clínicas, mas também para avaliar a progressão da doença ou serem utilizados como alvos terapêuticos.

A metabolômica tem proporcionado um aumento na compreensão em nível molecular de diversas patologias. Inúmeras são as áreas de aplicações clínicas e o número de publicações relacionadas ao tema que vem crescendo a cada dia, especialmente no que tange à detecção de biomarcadores (ANDREAS et al., 2020; CHO et al., 2020; DUTTA et al., 2020; LAU et al., 2015; MAMAS et al., 2011). A importância na descoberta de biomarcadores foi evidenciada na revisão de Mass et. al., (2011), onde ele discute a aplicação da metabolômica na descoberta e aplicação de biomarcadores no diagnóstico e tratamento de erros inatos do metabolismo, doenças cardiovasculares e câncer. Outro importante estudo foi realizado por Lau et.al., (2015), onde eles estudaram perfil do metaboloma de amostras de plasma para identificar biomarcadores potenciais para o diagnóstico de Tuberculose. Eles compararam os perfis do metaboloma do plasma de pacientes com Tuberculose, de pacientes com Pneumonia adquirida na comunidade e controles sem infecção ativa usando MS, revelando novos biomarcadores para diagnóstico.

A ferramenta da metabolômica também pode ser usada no desenvolvimento de novos tratamentos (MASTRANGELO et al., 2015). Mastrangelo et. al., (2015) publicou uma revisão onde ele mostra a importância dos efeitos das drogas no metaboloma. Autores descreveram a importância da metabolômica e farmacometabolômica para monitorar a cinética alterada e descobrir biomarcadores metabólicos durante a intervenção terapêutica, ajudando na compreensão e redução nas variações farmacocinéticas de medicamentos em pacientes com câncer, como um passo em frente na direção da medicina personalizada (ABOEL DAHAB et al., 2016).

A via metabólica celular na relação parasita/hospedeiro consiste em uma rede de proteínas, genes em interação e reações metabólicas que são controladas por estruturas regulatórias intrincadas. A infecção por *M. leprae* também resulta alterações metabólicas importantes (LAU et al., 2015; MIRSAEIDI et al., 2015; VAN HOOIJ et al., 2019). Infelizmente, a maioria dos estudos em relação à doença não explora a metabolômica. A maior parte das pesquisas para entendimento da hanseníase, tem como objetivo compreender a relação de manifestações clínicas utilizando técnicas moleculares e imunológicas, como a expressão gênica e/ou resposta imune utilizando

técnicas como PCR e ELISA (BANALES et al., 2019; GELLER, 2015; LAVANIA et al., 2018; RUMONDOR et al., 2019).

Estratégias baseadas em metabolômica nos estudos clínicos contemporâneos, estão permitindo um melhor entendimento das condições fisiopatológicas e mecanismos de doença, bem como fornecendo metodologias inovadoras para novas abordagens diagnósticas e prognósticas (MASTRANGELO; BARBAS, 2017; PACCHIAROTTA; DEELDER; MAYBORODA, 2012; SETHI et al., 2017). Devido a esse crescimento, a metabolômica clínica está sendo reconhecida como uma ferramenta essencial na área da saúde. A medicina tem como objetivo desenvolver estratégias de prevenção de doenças e cuidados clínicos levando alteração individual no ambiente, estilo de vida, genética e fenótipo molecular. As impressões digitais metabólicas são únicas para cada indivíduo; quando alteradas oferecem novos caminhos para entender melhor a biologia dos sistemas, detectar ou identificar riscos potenciais para várias doenças (BELINATO et al., 2019; CLISH, 2015). Complementarmente, o fato de a metabolômica fazer uso de uma variedade de amostras biológicas como sangue, urina e suor, torna um aspecto favorável para reduzir custos e tempo de análise, facilitando a aplicação em um grande número amostral (DELGADO-POVEDANO et al., 2018).

Um grande problema da metabolômica é a análise dos dados que requer modelos estatísticos distintos dos convencionais. Dessa maneira, a escolha dos métodos para analisar os dados é um passo fundamental. Nossos dados da metabolômica foram aplicados a métodos de árvore de decisão, como o J48 e o RF. O algoritmo RF é um modelo robusto para examinar dados discrepantes, pois ele produz uma avaliação imparcial da distribuição de erro generalizada (GROMSKI et al., 2015). Outro ponto positivo é que esse modelo funciona de forma eficaz se alguns dados estiverem ausentes, o que auxilia na análise já que normalmente não se sabe a origem da ausência devido à quantidade de dados (KOKLA et al., 2019; WEBB-ROBERTSON et al., 2015). De fato, a aplicação do RF nos dados de metabolômica obtidos nesse trabalho, resultou em melhor acurácia para discriminação dos grupos analisados em relação ao J48. O RF foi capaz de separar os grupos com acurácia excelente de 98,62 % no soro com erro absoluto extremamente baixo. Dentre os algoritmos de classificação aplicados no estudo, o RF foi o mais eficiente para separar os 3 grupos. Porém, é interessante salientar que apesar dos algoritmos apresentarem resultados de acurácia diferentes, todos foram eficientes em diferenciar o grupo controle dos demais grupos.

Até agora, os perfis dos metabólitos na hanseníase só foram explorados por metodologias que não foram capazes de diferenciar adequadamente as formas clínicas da doença. Essas técnicas tornam-se limitadas em termos de rendimento da amostra, sensibilidade à detecção da doença e precisão de identificação dos compostos (MAYBORODA et al., 2016; SILVA et al., 2013). Metabólitos que modulam a imunidade favorecendo ou prejudicando a micobactéria sobrevivência foram descritos na literatura. Esses estudos incluem colesterol (derivado de HDL ou LDL) e triglicérides (CRUZ et al., 2008). Em outro estudo a análise metabolômica não direcionada foi capaz de identificar uma coorte de pacientes com hanseníase por seus índices bacterianos. A metabolômica foi capaz de distinguir aqueles com um índice baciloscópio menor que 1 daqueles com índice bacteriano maior que 4. A metabolômica do soro também mostrou aumentos nos metabólitos, como ácidos graxos poliinsaturados, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico, em pacientes virchovianos (AL-MUBARAK et al., 2011).

Nos últimos anos, estudos metabolômicos foram conduzidos para obter novos conhecimentos biológicos sobre a patogênese. Poucos trabalhos foram feitos sobre a hanseníase e os metabólitos descobertos esses metabólitos não foram usados como uma ferramenta de diagnóstico ou como um alvo de tratamento (MIRSAEIDI et al., 2015). Usando uma abordagem metabolômica baseada em espectrometria de massa, fomos capazes de descobrir vários metabólitos no soro com níveis diferenciais em grupos de pacientes. Neste estudo, foram identificados 14 metabólitos diferencialmente expressos entre os grupos, 4 metabólitos foram expressos apenas no grupo paucibacilar. Focamos exclusivamente na identificação de compostos com níveis diferenciais de metabólitos em pacientes PB e MB. A impressão digital metabolômica que identificamos pode lançar luz permitindo o objetivo final de melhorar os diagnósticos, proporcionar opções de tratamento e criar uma compreensão da patogênese da hanseníase.

## **8. CONCLUSÃO**

Em virtude do que foi exposto, esse estudo mostrou que, por meio da análise metabolômica de soro foi possível identificar metabólitos capazes de diferenciar os 3 grupos (pacientes controle e pacientes PB e MB). Nossos resultados permitirão estudos adicionais para abordar os metabólitos de funções biológicas, como aqueles que podem determinar o estabelecimento da doença. Além disso, uma maior compreensão dos perfis metabólicos de pacientes com hanseníase resultará na descoberta de biomarcadores para detectar infecções iniciais; uma área que urgentemente precisa de atenção dada à falta de sensibilidade das abordagens diagnósticas atualmente utilizadas nos primeiros estágios clínicos.

Os esforços futuros devem se concentrar na identificação e purificação dos principais metabólitos e investigação aprofundada de suas funções. Essas informações são extremamente importantes para complementar a compreensão fisiopatológica da doença. Da mesma forma, os metabólitos serão validados em uma população maior. Em conclusão, o sistema de classificação RF será aprimorado para que a plataforma online seja didática, e por fim, uma população externa deve ser utilizada para validação.

## 9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABOEL DAHAB, A. et al. Pharmacokinetic variations in cancer patients with liver dysfunction: applications and challenges of pharmacometabolomics **Cancer hemotherapy and Pharmacology**. Springer Verlag, , 1 set. 2016. <https://doi.org/0.1007/s00280-016-3028-4>
- AL-MUBARAK, R. et al. Serum metabolomics reveals higher levels of polyunsaturated fatty acids in lepromatous leprosy: Potential markers for susceptibility and pathogenesis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 9, set. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001303>
- AL-QAHTANI, W. et al. Dried Blood Spot-Based Metabolomic Profiling in Adults with Cystic Fibrosis. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 6, p. 2346–2357, 5 jun. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00031>
- ALVES, E. D.; FERREIRA, T. L.; NERY, I. Hanseníase: avanços e desafios. **NESPROM**, v.1, p 492, 2014. ISBN 978-85-64593-22-0
- ANDREAS, N. J. et al. Performance of metabolomic serum analysis for diagnostics in paediatric tuberculosis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64413-6>
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-time PCR handbook**. 3. ed. . Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2020
- ARAUJO, S. et al. Molecular evidence for the aerial route of infection of Mycobacterium leprae and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 11, p. 1412–1420, 2016. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw570>
- BAKKER, M. I. Epidemiology and prevention of leprosy : a cohort study in Indonesia **Op Donderdag**, 2005. ISBN 9068320726, 9789068320725
- BANALES, J. M. et al. Serum Metabolites as Diagnostic Biomarkers for Cholangiocarcinoma, Hepatocellular Carcinoma, and Primary Sclerosing Cholangitis. **Hepatology**, v. 70, n. 2, p. 547–562, 1 ago. 2019. <https://doi.org/10.1002/hep.30319>
- BARBIERI, R. R. et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 944–947, 1 nov. 2014. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140212>
- BARBIERI, R. R. et al. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 147, 5 mar. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147>
- BELINATO, J. R. et al. Metabolômica microbiana: inovações e aplicações. **Química Nova**. v. 42, n. 5, p. 546-559, 18 Jul 2019 2019. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170324>
- BENJAK, A. et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus Mycobacterium leprae. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02576-z>

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. **Leprosy: An overview of pathophysiology.***Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v 1, n 6, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/181089>

BOLLARD, M. E. et al. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. **NMR in Biomedicine**, v 18, n 3, 143–162, 2005. <https://doi.org/10.1002/nbm.935>

BORENSTEIN, M. S. et al. Leprosy: stigma and prejudice lived by institucionalized patients in Santa Catarina State, Brazil (1940-1960). **Revista brasileira de enfermagem**, v. 61 S, p. 708–712, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672008000700009>

BRASIL. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.** Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2010. p 09-10. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_procedimentos\\_tecnicos\\_corticosteroides\\_hanseniose.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseniose.pdf)> Acesso em: 16 dez. 2020. ISBN 978-85-334-1678-9

BRASIL. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2016. ISBN 978-85-334-2348-0

BRASIL. **Estratégia Nacional para Enfrentamento da Hanseníase 2019-2022 | Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis.** 2019. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/estrategia-nacional-para-enfrentamento-da-hanseniose-2019-2022>>. Acesso em: 16 dez. 2020. ISBN 978-85-334-0520-9

BREIMAN, L. Random forests. **Machine Learning**, v. 45, n. 1, p. 5–32, out. 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>

BRITO, K. K. RYSTIN. G. DE et al. Epidemiological analysis of leprosy in an endemic state of northeastern Brazil. **Revista gaúcha de enfermagem / EENFUFGRS**, v. 36, n. spe, p. 24–30, 2015. <https://doi.org/10.1590/1983-1447.2015.esp.55284>

CAMBAU, E. et al. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in Mycobacterium leprae. **Lancet (London, England)**, v. 349, n. 9045, p. 103–4, 11 jan. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)60888-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)60888-4)

CAMBAU, E. et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009–15. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 12, p. 1305–1310, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.022>

CAMBAU, E. et al. “Molecular detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy.” *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. v. 34, n. 1, p. 39–45, 2002. <https://doi.org/10.1086/324623>

CANUTO, G. A. B. et al. **METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS** *Química Nova* Sociedade Brasileira de Química, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>

CHAUFFOUR, A. et al. Prospective study on antimicrobial resistance in leprosy cases diagnosed in France from 2001 to 2015. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 11, p. 1213.e5-1213.e8, 1 nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.004>

CHO, K. et al. Combined untargeted and targeted metabolomic profiling reveals urinary biomarkers for discriminating obese from normal-weight adolescents. **Pediatric Obesity**, v. 12, n. 2, p. 93–101, 1 abr. 2017. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12114>

CHO, Y. et al. Identification of serum biomarkers for active pulmonary tuberculosis using a targeted metabolomics approach. **Scientific Reports**, v. 10, n. p. 47, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60669-0>

CLISH, C. B. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. **Molecular Case Studies**, v. 1, n. 1, p. a000588, out. 2015. <https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>

CONTRERAS MEJÍA, M. D. C. et al. Identificação da resistência primária à Rifampicina em Espécies de Mycobacterium leprae de pacientes com hanseníase no Amazonas Estado, Brasil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4359–4360, 2014. <https://doi.org/10.1128/JCM.01688-14>

CRIPPA, I. L. F. et al. Correlação clínico-laboratorial baseada em dados secundários dos casos de hanseníase atendidos no período de 01/2000 a 03/2001 na Fundação Alfredo da Matta, Manaus-AM, Brasil\*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 5, p. 547–554, set. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000500004>

CROFT, R. P. et al. Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skin-smear examination. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 66, n. 4, p. 445–450, 1998. PMID: 10347564

CRUZ, D. et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 8, p. 2917–2928, 1 ago. 2008. <https://doi.org/10.1172/JCI34189>

DA COSTA MARTINS, A. C. et al. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, n. 5, p. 579–587, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1808-86942010000500008>

DA SILVA ROCHA, A. et al. Drug and multidrug resistance among Mycobacterium leprae isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1912–7, jun. 2012. <https://doi.org/10.1128/JCM.06561-11>

DE ARAÚJO, A. E. R. E. A. et al. Complicações neurais e incapacidades em hanseníase em capital do nordeste brasileiro com alta endemicidade. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 4, p. 899–910, 1 out. 2014. <https://doi.org/10.1590/1809-45032014000400009>

DE LEPROLOGÍA (6o. 1953. MADRID, S. **Memoria del VI Congreso Internacional de Leprología. 1953. p.1279-1320**, Alicante : Biblioteca Virtual Miguel de Cervantes, 2019.

DE MOURA, R. S. et al. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: Revisão sistemática **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical SBMT**, v. 4, n. 2, p. 11-18, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000700004>

- DELGADO-POVEDANO, M. M. et al. Metabolomics analysis of human sweat collected after moderate exercise. *Talanta*, v. 177, p. 47–65, 15 jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.028>
- DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 26, n. 1, p. 51-78, 2007. <https://doi.org/10.1002/mas.20108>
- DOS SANTOS, D. F. et al. Peripheral nerve biopsy: a tool still needed in the early diagnosis of neural leprosy? *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 114, n. 11, p. 792–797, 6 nov. 2020. <https://doi.org/10.1093/trstmh/traa053>
- DUTTA, N. K. et al. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals novel biomarkers in the blood for tuberculosis diagnosis in children. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75513-8>
- EARLA, P. Long Lasting Disease: Leprosy. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*, v. 3, p. R1-001 mar. 2015. <https://doi.org/10.4172/2332-0877-R1-001>
- EIDT, L. M. 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*, v. 13, n. 2, p. 76–88, ago. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0104-12902004000200008>
- FABRI, A. DA C. O. C. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, 30 maio 2015. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0962-4>
- FERREIRA, I. N.; ALVAREZ, R. R. A. Hanseníase em menores de quinze anos no município de Paracatu, MG (1994 a 2001). *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 8, n. 1, p. 41–49, mar. 2005. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2005000100006>
- FISCHER, M. Leprosy – an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, v. 15, n. 8, p. 801–827, 1 ago. 2017. <https://doi.org/10.1111/ddg.13301>
- FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *An. bras. dermatol*, v. 74, n. 2, p. 113-9, 1999. ID: lil-262956
- FRAGA-CORRAL, M. et al. Analytical Metabolomics and Applications in Health, Environmental and Food Science. *Critical Reviews in Analytical Chemistry Taylor and Francis Ltd.* v.1, n. 1-23, 2020. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1823811>
- GARBIN, C. A. S. et al. The stigma and prejudice of leprosy: Influence on the human condition. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 2, p. 194–201, 2015. <https://doi.org/0037-8682-0004-2015>
- GARBINO, J. A. et al. Hanseníase neural primária: Revisão sistemática. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. Associação Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v.71, n. 6, 2013. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130046>
- GARCÍA, C. J. et al. Can we trust biomarkers identified using different non-targeted metabolomics platforms? Multi-platform, inter-laboratory comparative metabolomics profiling of lettuce cultivars via UPLC-QTOF-MS. *Metabolomics*, v. 16, n. 8, p. 85, 1 ago. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01705-y>

GELLER, M. S. Diagnostico e tratamento das doenças imunológicas. **Elsevier Mosby**, . v. 2, 2015. ISBN: 9788535260953

GOULART, I. M. B. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 1, p. 101–105, jan. 2008. <https://doi.org/10.1128/CVI.00372-07>

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 363–375, ago. 2002. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000400014>

GROMSKI, P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, v. 879, p. 10–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>

GROSSI ARAÚJO, M. Leprosy in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373–382, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000300010>

GROSSI, M. A. D. F. et al. Fatores de risco para a soropositividade do ML Flow em pacientes com hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 39–44, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000700009>

GUPTA, R. et al. Clinico-Epidemiological Profile of Leprosy in Post Elimination Era: A Hospital Based Study. **Indian J Lepr**. v.91, n. 3, p. 197-205, 2019. ID: sea-195050

GUTIERREZ, M. C.; SUPPLY, P.; BROSCHE, R. Pathogenomics of Mycobacteria. In: **Microbial Pathogenomics**. Basel: KARGER, 2009. v. 6p. 198–210. <https://doi.org/10.1159/000235772>

JACOBS, K. R. et al. Correlation between plasma and CSF concentrations of kynurenine pathway metabolites in Alzheimer’s disease and relationship to amyloid- $\beta$  and tau. **Neurobiology of Aging**, v. 80, p. 11–20, 1 ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.03.015>

JUCKER-KUPPER. Gerhard Henrik Armer Hansen biography. **Who Named It**. Disponível em: <<https://www.whonamedit.com/doctor.cfm/596.html>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

- KAMPIRAPAP, K. et al. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, v. 66, n. 1, p. 16–21, mar. 1998. PMID: 9614835

KOKLA, M. et al. Random forest-based imputation outperforms other methods for imputing LC-MS metabolomics data: A comparative study. **BMC Bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 492, 11 out. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3110-0>

KRAMME, S. et al. Detection and quantification of Mycobacterium leprae in tissue samples by real-time PCR. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 193, n. 4, p. 189–193, nov. 2004. <https://doi.org/10.1007/s00430-003-0188-8>

LANZA, F. M. et al. Perfil epidemiológico da hanseníase no município de Divinópolis,

Minas Gerais. **Revista de Enfermagem da UFMS**, v. 2, n. 2, p. 365–374, 14 ago. 2012.

ABOEL DAHAB, A. et al. Pharmacokinetic variations in cancer patients with liver dysfunction: applications and challenges of pharmacometabolomics *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Springer Verlag, , 1 set. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27061417/>>. Acesso em: 18 dez. 2020

AL-MUBARAK, R. et al. Serum metabolomics reveals higher levels of polyunsaturated fatty acids in lepromatous leprosy: Potential markers for susceptibility and pathogenesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 9, set. 2011.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001303>

AL-QAHTANI, W. et al. Dried Blood Spot-Based Metabolomic Profiling in Adults with Cystic Fibrosis. *Journal of Proteome Research*, v. 19, n. 6, p. 2346-2357, 5 jun. 2020.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00031>

ALVES, E. D.; FERREIRA, T. L.; NERY, I. Hanseníase : avanços e desafios. *NESPROM*, v.1, p 492, 2014.

ANDREAS, N. J. et al. Performance of metabolomic serum analysis for diagnostics in paediatric tuberculosis. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64413-6>

APPLIED BIOSYSTEMS. Real-time PCR handbook. 3. ed. . Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2020

ARAUJO, S. et al. Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 63, n. 11, p. 1412-1420, 2016.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw570>

BAKKER, M. I. Epidemiology and prevention of leprosy : a cohort study in Indonesia Op Donderdag, 2005.

BANALES, J. M. et al. Serum Metabolites as Diagnostic Biomarkers for Cholangiocarcinoma, Hepatocellular Carcinoma, and Primary Sclerosing Cholangitis. *Hepatology*, v. 70, n. 2, p. 547-562, 1 ago. 2019.

<https://doi.org/10.1002/hep.30319>

BARBIERI, R. R. et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 7, p. 944-947, 1 nov. 2014.

<https://doi.org/10.1590/0074-0276140212>

BARBIERI, R. R. et al. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 3, p. 147, 5 mar. 2019.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147>

BELINATO, J. R. et al. Metabolômica microbiana: inovações e aplicações. *Química Nova* [online]. v. 42, n. 5, p. 546-559, 18 Jul 2019 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170324>>. Acesso em: 15 dez. 2020

BENJAK, A. et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

BHAT, R. M.; PRAKASH, C. Leprosy: An overview of pathophysiology. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v 1, n 6, 2012.

<https://doi.org/10.1155/2012/181089>

BOLLARD, M. E. et al. NMR-based metabolomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR in Biomedicine*, v 18, n 3, 143-162, 2005.

<https://doi.org/10.1002/nbm.935>

BORENSTEIN, M. S. et al. Leprosy: stigma and prejudice lived by institutionalized patients in Santa Catarina State, Brazil (1940-1960). *Revista brasileira de enfermagem*, v. 61 S, p. 708-712, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0034-71672008000700009>

BRASIL. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2010. p 09-10. Disponível em:

<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_procedimentos\\_tecnicos\\_corticosteroides\\_hanseníase.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseníase.pdf)> Acesso em: 16 dez. 2020.

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

BRASIL. Estratégia Nacional para Enfrentamento da Hanseníase 2019-2022 | Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. 2019. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/estrategia-nacional-para-enfrentamento-da-hanseniase-2019-2022>>. Acesso em: 16 dez. 2020.

BREIMAN, L. Random forests. *Machine Learning*, v. 45, n. 1, p. 5-32, out. 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>

BRITO, K. K. RYSTIN. G. DE et al. Epidemiological analysis of leprosy in an endemic state of northeastern Brazil. *Revista gaúcha de enfermagem / EENFUFGRS*, v. 36, n. spe, p. 24-30, 2015.

CAMBAU, E. et al. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *Lancet (London, England)*, v. 349, n. 9045, p. 103-4, 11 jan. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)60888-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)60888-4)

CAMBAU, E. et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009-15. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 24, n. 12, p. 1305-1310, 1 dez. 2018.

CAMBAU, E. et al. "Molecular detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. v. 34, n. 1, p. 39-45, 2002. <https://doi.org/10.1086/324623>

CANUTO, G. A. B. et al. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. *Química Nova* Sociedade Brasileira de Química, , 1 jan. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>>. Acesso em: 14 dez. 2020 <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>

CHAUFFOUR, A. et al. Prospective study on antimicrobial resistance in leprosy cases diagnosed in France from 2001 to 2015. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 24, n. 11, p. 1213.e5-1213.e8, 1 nov. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.004>

CHO, K. et al. Combined untargeted and targeted metabolomic profiling reveals urinary biomarkers for discriminating obese from normal-weight adolescents. *Pediatric Obesity*, v. 12, n. 2, p. 93-101, 1 abr. 2017.  
<https://doi.org/10.1111/ijpo.12114>

CHO, Y. et al. Identification of serum biomarkers for active pulmonary tuberculosis using a targeted metabolomics approach. *Scientific Reports*, v. 10, n. p. 47, 1 dez. 2020.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-60669-0>

CLISH, C. B. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Molecular Case Studies*, v. 1, n. 1, p. a000588, out. 2015.  
<https://doi.org/10.1101/mcs.a000588>

CONTRERAS MEJÍA, M. D. C. et al. Identificação da resistência primária à Rifampicina em Espécies de *Mycobacterium leprae* de pacientes com hanseníase no Amazonas Estado, Brasil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 12, p. 4359-4360, 2014.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01688-14>

CRIPPA, I. L. F. et al. Correlação clínico-laboratorial baseada em dados secundários dos casos de hanseníase atendidos no período de 01/2000 a 03/2001 na Fundação Alfredo da Matta, Manaus-AM, Brasil\*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 5, p. 547-554, set. 2004.  
<https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000500004>

CROFT, R. P. et al. Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skin-smear examination. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, v. 66, n. 4, p. 445-450, 1998.

CRUZ, D. et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 8, p. 2917-2928, 1 ago. 2008.

<https://doi.org/10.1172/JCI34189>

DA COSTA MARTINS, A. C. et al. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 76, n. 5, p. 579-587, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S1808-86942010000500008>

DA SILVA ROCHA, A. et al. Drug and multidrug resistance among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. *Journal of clinical microbiology*, v. 50, n. 6, p. 1912-7, jun. 2012.

<https://doi.org/10.1128/JCM.06561-11>

DE ARAÚJO, A. E. R. E. A. et al. Complicações neurais e incapacidades em hanseníase em capital do nordeste brasileiro com alta endemicidade. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 17, n. 4, p. 899-910, 1 out. 2014.

DE LEPROLOGÍA (6o. 1953. MADRID, S. Memoria del VI Congreso Internacional de Leprología. 1953. p.1279-1320, Alicante : Biblioteca Virtual Miguel de Cervantes, 2019.

DE MOURA, R. S. et al. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: Revisão sistemática *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* SBMT, , 2008.

Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822008000700004&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000700004&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 17 dez. 2020

DELGADO-POVEDANO, M. M. et al. Metabolomics analysis of human sweat collected after moderate exercise. *Talanta*, v. 177, p. 47-65, 15 jan. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.028>

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 26, .n. 1, p. 51-78, 2007.

<https://doi.org/10.1002/mas.20108>

DOS SANTOS, D. F. et al. Peripheral nerve biopsy: a tool still needed in the early diagnosis of neural leprosy? *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 114, n. 11, p. 792-797, 6 nov. 2020.

<https://doi.org/10.1093/trstmh/traa053>

DUTTA, N. K. et al. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals novel biomarkers in the blood for tuberculosis diagnosis in children. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75513-8>

EARLA, P. Long Lasting Disease: Leprosy. *Journal of Infectious Diseases and Therapy*, v. 3, p. R1-001mar. 2015.

EIDT, L. M. 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*, v. 13, n. 2, p. 76-88, ago. 2004.

<https://doi.org/10.1590/S0104-12902004000200008>

FABRI, A. DA C. O. C. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, n. 1, 30 maio 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12879-015-0962-4>

FERREIRA, I. N.; ALVAREZ, R. R. A. Hanseníase em menores de quinze anos no município de Paracatu, MG (1994 a 2001). *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 8, n. 1, p. 41-49, mar. 2005.

<https://doi.org/10.1590/S1415-790X2005000100006>

FISCHER, M. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, v. 15, n. 8, p. 801-827, 1 ago. 2017.

<https://doi.org/10.1111/ddg.13301>

FOSS, N. T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *An. bras. dermatol*, v. 74, n. 2, p. 113-9, 1999.

FRAGA-CORRAL, M. et al. Analytical Metabolomics and Applications in Health, Environmental and Food Science. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* Taylor and Francis Ltd. v.1, n. 1-23, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=batc20>>. Acesso em: 15 dez. 2020

<https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1823811>

GARBIN, C. A. S. et al. The stigma and prejudice of leprosy: Influence on the human condition. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 2, p. 194-201, 2015.

GARBINO, J. A. et al. Hanseníase neural primária: Revisão sistemática. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria. Associação Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v.71, n. 6, 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-282X2013000600397&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2013000600397&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 14 dez. 2020

GARCÍA, C. J. et al. Can we trust biomarkers identified using different non-targeted metabolomics platforms? Multi-platform, inter-laboratory comparative metabolomics profiling of lettuce cultivars via UPLC-QTOF-MS. *Metabolomics*, v. 16, n. 8, p. 85, 1 ago. 2020.

<https://doi.org/10.1007/s11306-020-01705-y>

GELLER, M. S. *Diagnostico e tratamento das doenças imunologicas*. Elsevier Mosby, . v. 2, 2015.

GOULART, I. M. B. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, n. 1, p. 101-105, jan. 2008.

<https://doi.org/10.1128/CVI.00372-07>

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 4, p. 363-375, ago. 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000400014>

GROMSKI, P. S. et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, v. 879, p. 10-23, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.012>

GROSSI ARAÚJO, M. Leprosy in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 3, p. 373-382, 2003.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000300010>

GROSSI, M. A. D. F. et al. Fatores de risco para a soropositividade do ML Flow em pacientes com hanseníase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 39-44, 2008.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000700009>

GUPTA, R. et al. Clinico-Epidemiological Profile of Leprosy in Post Elimination Era: A Hospital Based Study. *Indian J Lepr.* v.91, n. 3, p. 197-205, 2019. Disponível em: <<http://www.ijl.org.in>>. Acesso em: 24 fev. 2020.

GUTIERREZ, M. C.; SUPPLY, P.; BROSCH, R. Pathogenomics of Mycobacteria. In: *Microbial Pathogenomics*. Basel: KARGER, 2009. v. 6p. 198-210.

<https://doi.org/10.1159/000235772>

JACOBS, K. R. et al. Correlation between plasma and CSF concentrations of kynurenine pathway metabolites in Alzheimer's disease and relationship to amyloid- $\beta$  and tau. *Neurobiology of Aging*, v. 80, p. 11-20, 1 ago. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2019.03.015>

JUCKER-KUPPER. Gerhard Henrik Arm auer Hansen biography. *Who Nam ed It*. Disponível em: <<https://www.whonamedit.com/doctor.cfm/596.html>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

KAMPIRAPAP, K. et al. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association*, v. 66, n. 1, p. 16-21, mar. 1998.

KOKLA, M. et al. Random forest-based imputation outperforms other methods for imputing LC-MS metabolomics data: A comparative study. *BMC Bioinformatics*, v. 20, n. 1, p. 492, 11 out. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3110-0>

KRAMME, S. et al. Detection and quantification of *Mycobacterium leprae* in tissue samples by real-time PCR. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 193, n. 4, p. 189-193, nov. 2004.

<https://doi.org/10.1007/s00430-003-0188-8>

LANZA, F. M. et al. Perfil epidemiológico da hanseníase no município de Divinópolis, Minas Gerais. *Revista de Enfermagem da UFSM*, v. 2, n. 2, p. 365-374, 14 ago. 2012.

<https://doi.org/10.5902/217976925343>

- LASTÓRIA, J. C.; DE ABREU, M. A. M. M. Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>
- LAU, S. K. P. et al. Metabolomic profiling of plasma from patients with tuberculosis by use of untargeted mass spectrometry reveals novel biomarkers for diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 3750–3759, 1 dez. 2015. <https://doi.org/10.1128/JCM.01568-15>
- LAVANIA, M. et al. Emergence of primary drug resistance to rifampicin in *Mycobacterium leprae* strains from leprosy patients in India. **Clinical microbiology and infection** : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology and Infection*. v. 21, n. 12, p. e85–e86, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.08.004>
- LAVANIA, M. et al. Molecular detection of multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* from Indian leprosy patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 214–219, 1 mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.010>
- LIMA, P. O. LAV. D. P. AUL. et al. Correlation between clinical tests and electroneuromyography for the diagnosis of leprosy neuropathy. **Leprosy review**, v. 87, n. 1, p. 60–70, 1 mar. 2016. <https://doi.org/10.47276/lr.87.1.60>
- LIU, P. T. et al. Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against *Mycobacterium tuberculosis* Is Dependent on the Induction of Cathelicidin . **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2060–2063, 15 ago. 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2060>
- LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Leprosy Review**, v. 82, n. 4, p. 389–401, 4 dez. 2011. <https://doi.org/10.47276/lr.82.4.389>
- MACHADO, A. S. et al. Novel PCR primers for improved detection of *Mycobacterium leprae* and diagnosis of leprosy . **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1814-1819, 2020. <https://doi.org/10.1111/jam.14592>
- MAMAS, M. et al. The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 1, p. 5–17, 16 jan. 2011. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0609-6>
- MARKLEY, J. L. et al. The future of NMR-based metabolomics *Current Opinion in Biotechnology*. **Elsevier Ltd.** v. 43, p. 34-40, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>
- MARQUES, L. É. C. et al. Evaluation of 16S rRNA qPCR for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in nasal secretion and skin biopsy samples from multibacillary and paucibacillary leprosy cases. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 2, p. 72–78, 17 fev. 2018. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1415736>
- MARTINEZ, A. N. et al. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2124–2130, jul. 2009. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-09>
- MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of qPCR-Based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 10, out.

2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001354>

MARTINEZ, A. N. et al. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, 2014a. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002655>

MARTINEZ, A. N. et al. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, 2014b. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002655>

MASTRANGELO, A. et al. Metabolomics as a Tool for Drug Discovery and Personalised Medicine. A Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 23, p. 2627–2636, 4 jan. 2015. <https://doi.org/10.2174/1568026614666141215124956>

MASTRANGELO, A.; BARBAS, C. Chronic diseases and lifestyle biomarkers identification by metabolomics. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2017. v. 965p. 235–263. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47656-8_10)

MAYBORODA, O. A. et al. Exploratory urinary metabolomics of type 1 leprosy reactions. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 45, p. 46–52, 1 abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.012>

MELÃO, S. et al. Epidemiological profile of leprosy patients in the extreme south of Santa Catarina between 2001 and 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 79–84, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000100018>

MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Sociedade Brasileira de Dermatologia; v. 83, n 4, p.343-350 , jul. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962008000400010>

MIRANZI, S. DE S. C.; PEREIRA, L. H. DE M.; NUNES, A. A. Epidemiological profile of leprosy in a Brazilian municipality between 2000 and 2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 62–67, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000100014>

MIRSAEIDI, M. et al. Metabolomics: Applications and promise in mycobacterial disease. **Annals of the American Thoracic Society**. American Thoracic Society, v. 12, n. 9, p.1278–1287, 2015. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201505-279PS>

MOET, F.J.; MEIM A, A.; OSKAM, I.; RICHARDUS, J.H. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Lepr Rev**, v. 75, p. 310-26, 2004. <https://doi.org/10.47276/lr.75.4.310>

MOET, F. J. et al. The prevalence of previously undiagnosed leprosy in the general population of northwest Bangladesh. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 2, p. e198–e198, 27 fev. 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000198>

MOHANTY, P. S. et al. Ribonucleotide reductase as a drug target against drug resistance Mycobacterium leprae: A molecular docking study. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 60, p. 58–65, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.013>

MOURA, A. D. A. et al. Perfil dos portadores de hanseníase de um centro de referência de um estado Brasileiro. **Revista Enfermagem**, v. 24, n. 6, 2016. <https://doi.org/10.12957/reuerj.2016.9625>

- MOURA, R. S. et al. Evaluation of a rapid serological test for leprosy classification using human serum albumin as the antigen carrier. **Journal of Immunological Methods**, v. 412, p. 35–41, 1 out. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.06.014>
- NAVES, M. M. et al. Contribution of nasal biopsy to leprosy diagnosis. **American Journal of Rhinology and Allergy**, v. 23, n. 2, p. 177–180, 2009. <https://doi.org/10.2500/ajra.2009.23.3301>
- NUNES SARNO, E. Hansen's disease in the laboratory. **História, ciências, saúde--Manguinhos**, v. 10, n. Suppl 1, p. 277–290, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702003000400013>
- OKADA, S. Classification of leprosy types. **Nihon Rai Gakkai zasshi**. v. 58. p. 224-34. 1989. PMID: 2489280
- OPROMOLLA, D.V.A. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. ID: lil-642153
- OSKAM, L.; SLIM, E.; BÜHRER-SÉKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: A state of the art overview. **Lepr Rev**, v. 74, n. 3, p. 196-205, 2003. PMID: 14577464
- PACCHIAROTTA, T.; DEELDER, A. M.; MAYBORODA, O. A. **Metabolomic investigations of human infections**. **Bioanalysis Future Science Ltd** London, UK , v. 4, n. 8, p. 919 - 925 , 26 abr. 2012. <https://doi.org/10.4155/bio.12.61>
- PARKASH, O. et al. Evaluation of recombinant serine-rich 45-kDa antigen (ML0411) for detection of antibodies in leprosy patients. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 64, n. 4, p. 450–455, out. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01824.x>
- PIRES, C. et al. A Demanda de uma unidade de referência estadual em Hanseníase no Norte do Brasil. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto (TÍTULO NÃO-CORRENTE)**, v. 10, n. 1, 2011. ISSN: 1983-2567
- PIRIS, A.; LOBO, A. Z. C.; MOSCHELLA, S. L. Global dermatopathology: Hansen's disease - Current concepts and challenges. **Journal of Cutaneous Pathology** J Cutan Pathol, , 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2010.01522.x>
- PLIKAYTIS, B. B.; GELBER, R. H.; SHINNICK, T. M. Rapid and sensitive detection of Mycobacterium leprae using a nested-primer gene amplification assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 9, p. 1913–7, set. 1990. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.9.1913-1917.1990>
- POSTI, J. P. et al. Metabolomics profiling as a diagnostic tool in severe traumatic brain injury. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. AUG, p. 398, 18 ago. 2017. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00398>
- POUDEL, A. et al. Clinico-Pathological Correlation in the Classification of Leprosy. **Journal of Universal College of Medical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 21–24, 31 dez. 2019. <https://doi.org/10.3126/jucms.v7i2.27130>
- RAO, P. N.; SUNEETHA, S. Pure neuritic leprosy: Current status and relevance Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology. **Medknow Publications**, v. 8, n. 3, p. 252–261, 1 maio 2016. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.179086>
- REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy **Medecine et Maladies Infectieuses** Elsevier Masson SAS, v. 45, n.

9, p. 383–393., 1 set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.09.002>

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 34, n. 3, p. 255–273, jul. 1966. PMID: 5950347

RUDEEANEKSIN, J. et al. LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 263–270, nov. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00472.x>

RUMONDOR, B. B. et al. Immunoglobulin AMG anti natural disaccharide octyl - Leprosy IDRI diagnostic (NDO-LID) serologic test for leprosy diagnosis: A pilot study. **Dermatology Reports**, v. 11, n. S1, 29 mar. 2019. <https://doi.org/10.4081/dr.2019.8025>

SANDLERS, Y. The future perspective: metabolomics in laboratory medicine for inborn errors of metabolism. *Translational Research* Mosby Inc., v. 189, p. 65–75, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.06.005>

SANTOS, D. F. DOS et al. Molecular, immunological and neurophysiological evaluations for early diagnosis of neural impairment in seropositive leprosy household contacts. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, 21 maio 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006494>

SCOLLARD, D. M.; GILLIS, T. P.; WILLIAMS, D. L. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. **American journal of clinical pathology**, v. 109, n. 5, p. 642–6, maio 1998. <https://doi.org/10.1093/ajcp/109.5.642>

SCOLLARD, D. M.; TRUMAN, R. W.; EBENEZER, G. J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 46–54, 1 jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.07.008>

SETHI, S. et al. *Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications*. **Springer International Publishing** v. 965, p. 350-375, 2017 ISBN: 978-3-319-47656-8.

SHIMIZU, H. et al. Serum Metabolomic Profiling of Patients with Non-Infectious Uveitis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 12, p. 3955, 6 dez. 2020. <https://doi.org/10.3390/jcm9123955>

SILVA, C. A. M. et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: Adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 7, p. 2645–2659, jul. 2013. <https://doi.org/10.1128/IAI.00147-13>

SILVA, T. P. DA et al. Morphological and functional characterizations of Schwann cells stimulated with *Mycobacterium leprae*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 363–369, jun. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000400009>

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. **Leprosy Review**, v. 82, n. 4, p. 344–357, 4 dez. 2011. <https://doi.org/10.47276/lr.82.4.344>

SPENCER, J. S. et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 79–89, dez. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0074->

[02762012000900014](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000328)

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Real-time PCR: understanding Ct. 2016. Disponível em: < [https://www.ffclrp.usp.br/divulgacao/emu/real\\_time/manuais/Apostila%20qPCR-Handbook.pdf](https://www.ffclrp.usp.br/divulgacao/emu/real_time/manuais/Apostila%20qPCR-Handbook.pdf)> Acesso em: 4 dez. 2020

TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, p. e328, nov. 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000328>

VAN BRAKEL, W. H. et al. Early Diagnosis of Neuropathy in Leprosy? Comparing Diagnostic Tests in a Large Prospective Study (the INFIR Cohort Study). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, p. e212, abr. 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000212>

VAN HOOIJ, A. et al. Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil, China and Ethiopia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36323-1>

VAN HOOIJ, A. et al. Application of new host biomarker profiles in quantitative point-of-care tests facilitates leprosy diagnosis in the field. **EBioMedicine**, v. 47, p. 301–308, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.009>

VEDITHI, S. C. et al. Structural Implications of Mutations Conferring Rifampin Resistance in *Mycobacterium leprae*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23423-1>

VIDAL PESSOLANI, M. C. et al. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: Do mycobacterial adhesins play a role? **Microbes and Infection**. Elsevier Masson SAS. v.5, n. 7, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00098-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00098-4)

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: A minimal mycobacterial gene set. **Genome Biology**. **BioMed Central**. v. 2, n.8, 2001. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-8-reviews1023>

WANG, Y. et al. Current state of the art of mass spectrometry-based metabolomics studies - a review focusing on wide coverage, high throughput and easy identification. **RSC Advances Royal Society of Chemistry**. v.5, p. 5,78728–78737, 2015. <http://doi.org/10.1039/C5RA14058G>

WEBB-ROBERTSON, B. J. M. et al. **Review, evaluation, and discussion of the challenges of missing value imputation for mass spectrometry-based label-free global proteomics**. **Journal of Proteome Research**. American Chemical Society, , 1 maio 2015. <https://doi.org/10.1021/pr501138h>

WENGER, A. et al. Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. **Cells, tissues, organs**, v. 181, n. 2, p. 80–8, jan. 2005. <https://doi.org/10.1159/000091097>

WERNECKE, G. et al. Using Magnetic Resonance Imaging to Predict Adequate Graft Diameters for Autologous Hamstring Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 27, n. 8, p. 1055–1059, 1 ago. 2011. <https://doi.org/10.1159/000091097>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemotherapy of leprosy for control**

**programmes.** Geneva, Technical Report Series, N° 675, 1982. ISBN 9241206756

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Leprosy [meeting held in Geneva from 17 to 24 November 1987]: sixth report: **World Health Organization technical report series** ; no. 768, 1988. ISBN 924120768X

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for global surveillance of drug resistance in Leprosy**, 2009. Disponível em: <[http://www.searo.who.int/leprosy/documents/SEA\\_GLP\\_2009\\_2/en/](http://www.searo.who.int/leprosy/documents/SEA_GLP_2009_2/en/)>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Leprosy Strategy 2016-2020: Accelerating towards a leprosy-free world. **WHO Regional Office for South-East Asia, Nova Delhi**, 2016. ISBN 9789290225881

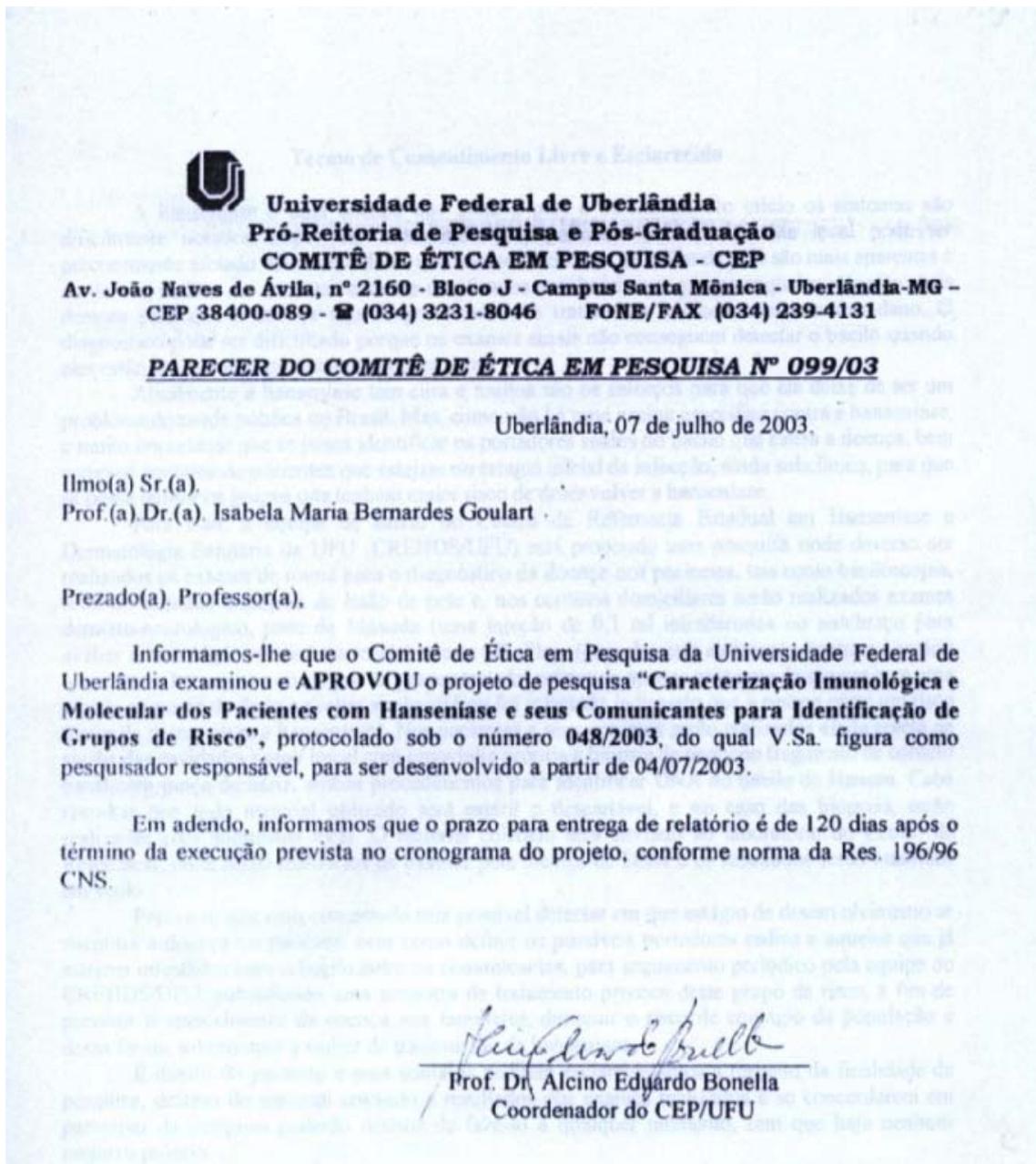
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 94, n. 35-36, p. 389-412, 2019.

WILLIAMS, D. L.; GILLIS, T. P. Drug-resistant leprosy: monitoring and current status. **Leprosy review**, v. 83, n. 3, p. 269–81, set. 2012. <https://doi.org/10.47276/lr.83.3.269>

YAMANOUCHI, A. A. et al. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. **Anais brasileira de dermatologia**, v. 68, n. 6, p. 396–404, 1993. ID: lil-140984

ZENHA, E. M. R.; FERREIRA, M. A. N.; FOSS, N. T. Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 968–972, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009001000016>

ZHA, H. et al. SWATHtoMRM: Development of High-Coverage Targeted Metabolomics Method Using SWATH Technology for Biomarker Discovery. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 6, p. 4062–4070, 20 mar. 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05318>





Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: [cep@propp.ufu.br](mailto:cep@propp.ufu.br); [www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

ANÁLISE FINAL Nº. 499/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO  
REGISTRO CEP/UFU 138/08

Projeto Pesquisa: "Caracterização imunológica e molecular de pacientes com hanseníase e seus comunicantes para identificação do grupo de risco".

Pesquisador Responsável: Isabela Maria Bernardes Goulart

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega dos relatórios parciais: Dezembro de 2008.

Dezembro de 2009.

Dezembro de 2010.

Dezembro de 2011.

Data para entrega do relatório final: março de 2012.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 10 de outubro de 2008.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
Coordenadora do CEP/UFU