

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

RICARDO SANDRI CARVALHO

COMPARATIVO DA PRESENÇA DO *Mycobacterium leprae* ENTRE MUCOSA NASAL E O PALATO DURO

BAURU
2014

RICARDO SANDRI CARVALHO

COMPARATIVO DA PRESENÇA DO *Mycobacterium leprae* ENTRE MUCOSA NASAL E O PALATO DURO

Tese apresentada à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Oral, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Sara Nader Marta

BAURU

2014

ATA DA DEFESA DE TESE DE RICARDO SANDRI CARVALHO, ALUNO DO PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOLOGIA ORAL – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – BIOLOGIA ORAL, DA UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

No dia 03 de junho de 2014, em sessão pública, na Universidade Sagrado Coração, na presença da Banca Examinadora, composta pelos(as) docentes: *Prof.ª Dr.ª Márcia Aparecida Nuevo Gatti*, Universidade Sagrado Coração; *Prof.ª Dr.ª Patrícia Pinto Saraiva*, Universidade Sagrado Coração; *Prof.ª Dr.ª Graziela de Almeida Prado Piccino Marafioti*, Secretaria da Saúde Bauru; *Prof.ª Dr.ª Nildiceli Leite Melo Zanella*, Secretaria da Saúde Bauru; e *Prof.ª Dr.ª Sara Nader Marta*, Universidade Sagrado Coração, tiveram início os trabalhos de julgamento da Prova de Tese para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Oral – Área Concentração: Biologia Oral, pelo doutorando *Ricardo Sandri Carvalho*. Os examinadores, observando o tempo regulamentar, arguíram o candidato sobre a Tese que o mesmo havia apresentado, intitulada *Comparativo da presença do Mycobacterium Leprae entre swab nasal e raspado da mucosa do palato em casos de hanseníase e de seus contatos intradomiciliares*, tendo o candidato procurado explicar e/ou rebater as críticas formuladas pelos arguidores. Após a conclusão da Prova de Tese, foi suspensa a sessão pública e, em sessão secreta, os arguidores atribuíram seus conceitos. Reaberta a sessão pública, foram anunciados os resultados: *Prof.ª Dr.ª Márcia Aparecida Nuevo Gatti: Aprovado*; *Prof.ª Dr.ª Patrícia Pinto Saraiva: Aprovado*; *Prof.ª Dr.ª Graziela de Almeida Prado Piccino Marafioti: Aprovado*; *Prof.ª Dr.ª Nildiceli Leite Melo Zanella: aprovado*; *Prof.ª Dr.ª Sara Nader Marta: Aprovado*. Conceito Final: *Aprovado*, fazendo jus, portanto, ao título de Doutor em Biologia Oral – Área de Concentração: Biologia Oral, de acordo com o artigo 35 do Regulamento da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Nada mais havendo a registrar, foi lavrada a presente Ata, que vai por mim assinada, Prof.ª Dr.ª Sandra de Oliveira Saes e pelos(as) Senhores(as) Membros da Comissão Examinadora.

Prof.ª Dr.ª Márcia Aparecida Nuevo Gatti

Prof.ª Dr.ª Patrícia Pinto Saraiva

Prof.ª Dr.ª Graziela de Almeida Prado Piccino Marafioti

Prof.ª Dr.ª Nildiceli Leite Melo Zanella

Prof.ª Dr.ª Sara Nader Marta

Presidente da Banca e Orientadora

Prof.ª Dr.ª Sandra de Oliveira Saes

Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação

Dedico, primeiramente a Deus, tão onipresente em minha vida, que muitas vezes o pedimos um pouco de força, um pouco de luz. E então a resposta vem, de alguma forma!

Aos meus pais, Geraldo e Maria Laura, exemplos de vida a ser seguido, pelos grandes esforços e sacrifícios ao longo de suas vidas num ímpeto desejo de nos proporcionar as melhores escolas. A eles que muito me influenciaram numa incansável busca por mais conhecimento e por me estimular cada vez mais em meus estudos.

Aos meus irmãos Maurício e José Maria que sempre apostaram em meu potencial, incentivando-me na busca do crescimento pessoal e profissional, fazendo com que despertasse em mim a habilidade de acreditar.

À minha esposa Cleiner por ter compartilhado, apesar das dificuldades, dos momentos bons ou ruins, cuidando principalmente das nossas filhas, com muito carinho, atenção e amor. Obrigado por ser um super-herói em minha vida, pela força e paciência com que tolerou minha ausência em alguns momentos dos estudos. Obrigado por existir e fazer dos meus sonhos uma realidade.

Às minhas filhas Bruna e Mariana, que num ato de carinho de seus beijos, abraços e sorrisos, me conferiram o afago nas horas em que mais precisava, dando-me ainda mais forças pra continuar minha dedicação aos estudos.

Agradeço eternamente a Deus por todos vocês fazerem parte de minha vida e terem me ajudado a vencer mais uma etapa da minha vida. Cada um de vocês está em meu coração e contribuem muito pra eu ser, a cada dia, mais realizado.

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof^a. Dr^a. Sara Nader Marta e ao Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond pela inteligência, grandiosa competência, empenho, sabedoria e, acima de tudo, paciência. Agradeço a eles pelas sugestões adequadas, por ter depositado confiança em mim e por proporcionar-me oportunidade de crescimento.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Sandra Fiorelli e Solange Franzolin que tanto contribuíram na parte estatística, facilitando a tabulação dos dados e esclarecendo dúvidas pertinentes, no intuito de se obter a excelência.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), instituição altamente renomada e de referência para a Hanseníase, com relevantes contribuições e incentivos ao desenvolvimento e avanço da pesquisa, tecnologia e inovação. O meu agradecimento a todos os seus funcionários que contribuíram para esta pesquisa.

Agradeço especialmente às pesquisadoras do ILSL, Dr^a. Maria Renata Sales Nogueira Costa, Dr^a. Ida Maria Foschiani e Dr^a. Maria Esther Salles Nogueira, apaixonadas pela pesquisa, que engrandecem a ciência em nível nacional e internacional, desenvolvendo estudos na área da Hanseníase. Sem a contribuição de vocês para a metodologia, o processamento e análise das amostras esta pesquisa não seria possível.

À Fundação Paulista Contra a Hanseníase instituição que sempre acreditou e nos apoiou financeiramente, dando-nos oportunidade para o desenvolvimento desta pesquisa. É este Instituto que engrandece à pesquisa, sendo de grande importância para a prevenção, cura e erradicação da Hanseníase através de incentivos regionais.

A todos os professores do curso do Doutorado e seus convidados pelo carinho, dedicação e paciência.

Aos colegas de classe que prontamente colaboraram na troca de informações e materiais durante as aulas, enriquecendo ainda mais o conhecimento.

A todos os autores que aqui contribuíram para que este trabalho pudesse ter sido concluído.

Ao Escritório Regional de Saúde e Secretaria Municipal de Saúde de Tangará da Serra - MT, que não mediram esforços para que eu pudesse dar continuidade a este Doutorado.

A toda equipe do setor de Hanseníase e do Laboratório municipal de Tangará da Serra, pela cooperação e empenho, em especial, à Edna e Aninha, por sua dedicação e colaboração essencial na busca incessante por mais amostras, não me deixando abater nos momentos mais difíceis, sendo profissionais extremamente competentes e responsáveis.

A todos os usuários das Unidades de Saúde, pacientes e contatos intradomiciliares que participaram da pesquisa, e àqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A hanseníase no Brasil é uma enfermidade ainda endêmica e o país ocupa o segundo lugar no mundo em número absoluto de doentes. Combatê-la é prioridade na saúde pública, entretanto, um dos maiores entraves é sem dúvida o de auferir um diagnóstico precoce do enfermo e principalmente dos seus contatos intradomiciliares. O *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) é o agente causador da hanseníase e sua principal via de transmissão se faz de forma direta, sendo a mais provável o trato respiratório. O bacilo pode ser encontrado na mucosa bucal sem apresentar qualquer alteração morfológica, sendo que somente métodos laboratoriais mais sensíveis detectam sua presença. O objetivo desta pesquisa foi o de verificar se a mucosa do palato duro pode ser um sítio de importância na detecção precoce e fidedigna para a presença do *M. leprae* e se há correlação dos resultados obtidos em swab nasal com os do raspado da mucosa do palato na busca de contribuir para os estudos de prevenção e controle da doença, principalmente em contatos intradomiciliares de pacientes recém-diagnosticados. Para tal, o método utilizado foi o uso da técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e a sorologia de detecção de anticorpos anti glicolípido fenólico-1 (anti PGL-1) específico para o *M. leprae*, realizado por ELISA. Participaram deste estudo 78 pacientes com hanseníase que não haviam iniciado tratamento (G1); seus 54 contatos intradomiciliares (G2) e 80 indivíduos livres da doença, para o controle negativo (G3). Nos resultados entre os exames de coleta de células através da swab nasal e do raspado da mucosa do palato, foi constatado a presença do bacilo em ambos os sítios (tanto no G1 como no G2) e demonstrado que a sensibilidade entre os exames de qPCR Rlep são equivalentes, sem diferenças estatisticamente significantes (positividade no G1 de 35% na mucosa do palato duro e 44% para a nasal, $p=0,3731$ e para o G2 de 31% e 38%, respectivamente, $p=0,6674$). Conclui-se que os resultados podem ser considerados de relevância para a área médica e odontológica, possibilitando que novas estratégias de detecção precoce, prevenção e tratamentos venham a surgir. Assim, a cavidade bucal pode ser uma via de infecção e transmissão da hanseníase e os contatos intradomiciliares podem estar envolvidos ativamente na sua transmissão, em regiões de alta endemicidade.

Unitermos: Hanseníase. Palato duro. Swab nasal. PCR tempo real.

ABSTRACT

Leprosy in Brazil is still endemic disease and the country ranks second in the world in absolute number of patients. Fighting it is public health priority, however, one of the biggest obstacles is undoubtedly of obtaining an early diagnosis of the patient and especially their household contacts. *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) is the causative agent of leprosy and its main route of transmission is done directly, most likely the respiratory tract. The bacillus can be found in the oral mucosa without showing any morphological change, and only the most sensitive laboratory methods to detect its presence. The objective of this research was to determine if the mucosa of the hard palate can be a place of importance in the early and reliable detection for the presence of *M. leprae* and the correlation of results obtained in nasal swab with shaved mucosa of the palate in seeking to contribute to the studies of prevention and control of disease, especially in newly diagnosed household contacts of patients. To this end, the method used was the technique of polymerase chain reaction quantitative (qPCR) and serological detection of antibodies specific phenolic glycolipid-1 (anti PGL-1) for *M. leprae*, performed by ELISA. The study included 78 patients with leprosy who had not started treatment (G1); its 54 household contacts (G2) and 80 individuals free of the disease for the negative control (G3). In results between the tests of collecting cells by nasal swabs and scraping the mucosa of the palate, it was found the presence of the bacillus in both sites (both G1 and G2) and demonstrated that the sensitivity of the exams qPCR RLEP are equivalent, with no statistically significant differences (positive in 35% of G1 in the mucosa of the hard palate and 44% for nasal, $p = 0.3731$ for G2 and 31% and 38%, respectively, $p = 0,6674$). We conclude that the results can be considered relevant for the medical and dental field, enabling new strategies for early detection, prevention and treatments emerge. Thus, the oral cavity may be a route of infection and transmission of leprosy and household contacts may be actively involved in its transmission in highly endemic regions.

Key words: Leprosy. Hard palate. Nasal swab. Real-time PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag - Antígeno

B – Borderline

BB – Borderline-Borderline

BT - Borderline-Tuberculóide

BV - Borderline-Virchowiana

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

I - Indeterminada

MB - Multibacilar

NDO - Natural Dissacarídeo-Octil

OMS – Organização Mundial de Saúde

PB - Paucibacilar

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PGL-1 - Glicolípídeo Fenólico-1

PQT - Poliquimioterapia

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

RLEP – Gene Repetitive Element

ROC - Receiver Operator Characteristic

TT - Tuberculóide

VV – Virchowiana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
3 OBJETIVOS.....	20
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	21
4.1 POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA	21
4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	21
4.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	25
4.4 SALVAGUARDAS ÉTICAS	25
5 RESULTADOS.....	26
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO 1.....	56
ANEXO 2.....	58

1 INTRODUÇÃO

O agente etiológico da hanseníase – *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) – foi descoberto pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, em 1873¹. É bacilo álcool-ácido resistente, imóvel, não formador de esporos, parasita intracelular obrigatório, com predileção por células de Schwann e macrófagos². Dentre as micobactérias patogênicas, é a que apresenta tempo de multiplicação mais lento (11 a 13 dias)³, o que resulta no longo período de incubação e na cronicidade da doença^{4, 5}, podendo apresentar sua manifestação clínica após 2 a 7 anos^{3, 6-8} a mais de 10 anos⁷ da sua infecção inicial pelo bacilo.

O *M. leprae* ainda não foi cultivado *in vitro*, o que constitui grande desafio para os microbiologistas. No entanto, consegue-se sua multiplicação pela inoculação no coxim plantar de camundongos imunocompetentes, naqueles irradiados e timectomizados ou em camundongos atímicos. Os bacilos também se reproduzem em tatus e macacos^{5, 9}.

A principal via de transmissão se faz de forma direta, sendo a mais provável o trato respiratório¹⁰⁻¹³, necessitando predisposição para adquirir a doença e ter contato íntimo e prolongado com o doente sem tratamento^{6, 7}, embora possa ocorrer pelo contato com a pele não íntegra⁸. Foram encontrados bacilos sobreviventes por até nove dias fora do hospedeiro humano em condições tropicais¹⁰, entretanto apesar de ter a capacidade de infectar um grande número de pessoas, somente 10% das que vivem em situações de alta prevalência adoecem^{2, 14, 15}. Assim, tem alta infectividade e baixa patogenicidade, isto é, infecta muitas pessoas no entanto só poucas adoecem⁶.

A detecção e o tratamento precoce de casos são fundamentais para controlar os focos de infecção, contribuindo para a eliminação da hanseníase como problema de saúde. Sua investigação tem como objetivo romper a cadeia epidemiológica da doença procurando identificar a fonte de contágio do doente, descobrir novos casos de hanseníase entre as pessoas que convivem com o doente no mesmo domicílio

(contatos intradomiciliares), pois estas correm um maior risco de serem contaminadas do que a população em geral e prevenir a contaminação de outras pessoas^{6, 10, 14, 16}.

A confirmação diagnóstica da hanseníase ainda continua sendo um desafio. O agente etiológico não pode ser cultivado em meios sintéticos ou em culturas de células, e nem sempre é encontrado em exames bacterioscópicos, como a baciloscopia do raspado dérmico e a histopatologia, principalmente em casos paucibacilares (PB), onde o número de bacilos é baixo¹⁷. Dentre os exames laboratoriais, destaca-se o do glicolípido fenólico-1(PGL-1) e o de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O *M. leprae* sintetiza um fenólico glicolípido (PGL-I), que tem uma porção de trissacárido único¹⁸, 3,6-di-o-metil- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4) - 2,3-di-o-metil- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-o-metil- α -L-ramnopiranosose (trissacárido natural)^{19, 20}. Este componente está em sua parede celular, que constitui cerca de 2% da massa total bacteriana e caracteriza-se por ser um antígeno específico do bacilo^{18, 21}, que pode ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares (MB)²¹. Reflete a carga bacilar em pacientes com hanseníase²² e pode identificar indivíduos com maior risco de desenvolver a doença²³. Para tal, o teste de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) pode ser utilizado para detectar a infecção subclínica em hanseníase^{24, 25}.

Para fins de terapêutica, o teste sorológico também pode reorientar uma classificação auxiliando a reformular os tratamentos possivelmente insuficientes em casos clinicamente PB que apresentam sorologia positiva, e possivelmente excessivos em pacientes clinicamente MB com sorologia negativa²⁶⁻²⁸.

Dentre os exames de alta sensibilidade, a PCR, método da Biologia Molecular, amplifica sequências do genoma bacilar, identificando o fragmento de ácido desoxirribonucleico ou ribonucleico amplificado. É específica e sensível, podendo ser realizada em várias amostras²⁹. Estudo utilizando biópsias de pele de pacientes com hanseníase têm demonstrado que a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta maior sensibilidade na detecção do bacilo, sugerindo

vantagem quando comparada aos exames histopatológico e baciloscópico convencionais³⁰. Outros trabalhos utilizaram PCR em material, além do colhido da pele^{31, 32}, o da mucosa nasal^{33, 34} e do escarro³⁵ em pacientes com hanseníase.

Em um estudo onde os sítios de coleta de material foram os palatos duro e mole a sequência de nucleotídeos do *Mycobacterium leprae* foi identificado pela reação em cadeia da polimerase em pequenas peças da mucosa bucal de pacientes com o diagnóstico de hanseníase biopsiados pela técnica de *punch*³⁶. A PCR provou ser método rápido, fácil e confiável para a investigação de rotina da infecção por micobactéria, mesmo quando a doença ainda é assintomática. O *Mycobacterium leprae* pode estar presente na mucosa bucal sem apresentar qualquer alteração morfológica, e somente métodos laboratoriais mais sensíveis detectam sua presença³⁶.

Foi detectado DNA de *M. leprae* por PCR em amostras da mucosa bucal de pacientes com hanseníase multibacilar³⁶, mas a literatura é escassa em relação à detecção de DNA de bacilos em formas de hanseníase paucibacilar. Os resultados do estudo de Silva Martinez³⁷ demonstraram a grande importância de um sistema de detecção de bacilos por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) em amostras da mucosa bucal de pacientes PB como auxiliar no diagnóstico e também para a classificação clínica de hanseníase. Recentemente, tem sido sugerido que a mucosa bucal pode ser uma fonte secundária na infecção e transmissão de *M. leprae*³⁸.

Na hanseníase, a detecção molecular do *Mycobacterium leprae* por meio de coletas com *swab* nasal é um método bem sucedido. O estudo da participação da mucosa bucal na transmissão dessa doença infecciosa pode contribuir para o controle epidemiológico em indivíduos infectados sem qualquer alteração clínica significativa, em pacientes com a doença em fase precoce e em seus contatos domiciliares. A citologia esfoliativa pode revelar-se útil para tal propósito³⁹.

Nesse sentido, a avaliação da mucosa do palato duro como um sítio de importância na detecção precoce e fidedigna para a presença do *M. leprae*, poderá contribuir para os estudos de prevenção e controle da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A hanseníase é uma doença universal, endêmica em determinadas regiões como as Américas e Ásia. Destas, a Índia ocupa o primeiro lugar em número de novos casos (127.295) em 2011 e o Brasil continua sendo o 2º país com o maior número de casos novos (33.955). Dos 36.817 casos novos das Américas, 92% são casos notificados no Brasil⁴⁰, com casos distribuídos, em ordem de detecção, nas regiões Norte, Centro-Oeste, Nordeste e, com menor prevalência, no Sudeste e Sul^{41, 42}.

Através das ações de controle o Brasil conseguiu reduzir importantes indicadores que refletem a gravidade da endemia, como o coeficiente de detecção de casos novos de hanseníase em menores de 15 anos⁴³ que em 2012 foi de 4,8 casos novos para 100 mil habitantes, representando 6,7% da detecção geral do Brasil (33.303). Segundo parâmetros deste indicador, a endemia é considerada “muito alta” neste grupo de idade. Apesar disto, este indicador também apresentou redução contínua na última década, passando de 7,9 a 4,8 casos novos por 100 mil habitantes no período de 2003 a 2012⁴², entretanto, diminuindo muito lentamente^{44, 45}. Este indicador epidemiológico é considerado o principal por expressar a força de transmissão recente e a tendência da endemia⁴³.

A hanseníase pode atingir pessoas de todas as idades, de ambos os sexos, no entanto, raramente ocorre em crianças⁶. Há um alto grau de imunidade na criança confirmada pelo grande número de casos de formas tuberculóides e, desde que não sofram reinfecção, por casos de cura espontânea⁴⁶. Observa-se que crianças, menores de quinze anos, adoecem mais quando há uma maior endemicidade da doença. Há uma incidência maior da doença nos homens do que nas mulheres, na maioria das regiões do mundo⁶.

Opromolla et al. realizaram estimativa da prevalência da hanseníase pela investigação em demanda inespecífica de unidades de saúde⁴⁷. A principal discussão foi voltada para a busca da base do iceberg epidemiológico pelo qual se

designa o fato de que o número de casos conhecidos da doença é sempre a extremidade visível de contingente muito mais numeroso⁴⁸.

A educação em saúde é um importante instrumento de controle da hanseníase, que visa: eliminar falsos conceitos relativos à contagiosidade da doença, à incurabilidade e à necessidade de regime de isolamento para o seu tratamento; bem como, orientar quanto à importância do exame periódico dos contatos, à conveniência do tratamento precoce e à possibilidade de prevenção de incapacidades; estimular a assiduidade do doente, proporcionando atenção individualizada; incentivar a apresentação voluntária de doentes e contatos⁴. Conforme parecer de estudiosos, membros do Ministério da Saúde, o estigma social associado à hanseníase contribuiu para o agravamento do problema no país⁴⁹.

Além das condições individuais, outros fatores podem estar relacionados aos níveis de endemia como as condições socioeconômicas desfavoráveis, onde as moradias precárias, com falta de higiene, com famílias numerosas dividindo pequenos espaços, facilita a relação do contato íntimo e prolongado entre seus membros. Assim, as condições precárias de vida e de saúde, influenciam no risco de adoecer^{6, 14, 16, 50}. Essa situação de exclusão também está evidenciada na falta de acesso à educação que os doentes possuem, elemento que dificulta muitas vezes a adesão ao tratamento, e o próprio entendimento sobre a doença e suas complicações⁵⁰.

Uma das propostas de atingir as metas de eliminação é a de controlar os contatos intradomiciliares, representados pelas pessoas que residem na mesma casa ou por aquelas que tenham um convívio contínuo e prolongado com o doente¹⁴. Noordeen¹⁰ já apontava o elevado risco de hanseníase para os contatos intradomiciliares, ressaltando assim a importância da prática do exame dos comunicantes para o controle da doença.

Segundo o estudo de Vieira¹⁴, apesar dos esforços no sentido de resgatar a população do estudo, por meio da busca ativa, em um curto espaço de tempo, encontrou-se dificuldades para atingir a meta de 100%. Isto demonstra o quanto é complexo desenvolver as ações de controle de contatos, principalmente quando as

consultas dos mesmos devem ser mantidas por um período maior do que o estabelecido para o controle dos doentes.

Nos casos diagnosticados, no início da década de 1980, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a recomendar o uso do esquema da poliquimioterapia (PQT) e tal medida teve como resultado o tratamento e a cura de mais de onze milhões de pacientes com hanseníase⁵¹.

O tratamento é indispensável ao paciente para que possa se curar, fechando a fonte de infecção e interrompendo a transmissão da doença, sendo então estratégico no controle da endemia e para a eliminação da hanseníase⁶. O acompanhamento é ambulatorial na rede de serviço público, onde o doente deve comparecer para consulta médica e de enfermagem, receber a dose supervisionada do tratamento poliquimioterápico, e avaliação de prevenção de incapacidades⁵².

A detecção precoce de casos é fundamental para prevenir as incapacidades causadas pela doença e para controlar os focos de infecção, contribuindo para a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública. Por isso mesmo ratifica-se que a hanseníase é doença curável, e quanto mais precocemente diagnosticada e tratada mais rapidamente se cura o paciente⁶.

A OMS criou, para fins de tratamento, uma classificação operacional baseada no número de lesões cutâneas: paucibacilares (PB) - pacientes com até cinco lesões cutâneas, e multibacilares (MB) - pacientes com seis ou mais lesões^{6, 53, 54}. Têm-se outra forma de classificação, baseada na clínica, onde pode-se identificar duas formas polares estáveis, tuberculóide (TT) e virchowiana (VV), e duas formas instáveis, indeterminada (I) e borderline (B), que, dependendo da imunidade do indivíduo, evoluem para um dos pólos⁵⁵.

Os paucibacilares são os doentes nas formas clínicas indeterminadas e tuberculóides e têm baciloscopia negativa. Já os Multibacilares, têm baciloscopia positiva e são classificados como virchowianos e borderlines, sendo os que não estão em tratamento considerados fontes de transmissão e infecção⁵⁶.

Não existe padrão ouro de diagnóstico em hanseníase, pois seu agente etiológico não pode ser cultivado em meios sintéticos ou em culturas de células, e nem sempre é encontrado em exames bacterioscópicos, como a baciloscopia do raspado dérmico e a histopatologia. Nas formas PB, os bacilos dificilmente são detectados¹⁷. A confirmação diagnóstica da hanseníase, portanto, continua um desafio, especialmente em casos paucibacilares.

A baciloscopia é o exame complementar de maior utilidade, de fácil execução e de baixo custo na identificação do *M. leprae* diretamente de raspado dérmico das lesões ou de outros locais de coleta selecionados, como lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos⁶. Sua especificidade é próxima a 100%, entretanto, apresenta baixa sensibilidade, uma vez que é negativo em até 70% dos pacientes com hanseníase⁵⁷⁻⁵⁹.

Em indivíduos borderlines, sobretudo nos borderlines-tuberculóides (BT), a disseminação difusa do bacilo pelo tegumento e vísceras não ocorre⁴. Os bacilos estão preferencialmente no interior dos ramos nervosos dérmicos e por isso estão bem representados na baciloscopia da biópsia⁶⁰, mas não o são na baciloscopia do esfregaço⁶¹.

Portanto, são necessários testes laboratoriais de fácil execução que auxiliem na classificação correta dos pacientes com poucas lesões, para se evitar tratamento inadequado⁶¹. Os ensaios de qPCR, que são baseados em detecção em tempo real (quantitativa) estão substituindo a PCR convencional em muitos laboratórios. Eles têm melhorado a sensibilidade e especificidade para a quantificação de DNA bacteriano diretamente nas amostras clínicas, com tempo de resposta mais rápido, que supera a técnica de PCR convencional, usando o gel ou a sensibilidade de detecção colorimétrica⁶²⁻⁶⁵.

O *M. leprae* é um parasita obrigatoriamente intracelular que cresce melhor a 27° - 30°C, o que é consistente com as características principais dos órgãos-alvo da doença em seres humanos como a pele, os nervos periféricos, a mucosa nasal, do trato respiratório superior e os olhos³. Em temperaturas baixas de – 4°C há uma conservação metabólica e de 26°C a 33°C, atividade⁶⁶.

Os troncos nervosos mais acometidos são o ulnar, radial, o fibular, o nervo mediano (no túnel do carpo), auricular (na parte lateral do pescoço) e do músculo tibial posterior, todos eles acessíveis para exame clínico^{67, 68}. Estes locais anatômicos são superficiais e têm uma temperatura inferior do corpo entre 33 °C a 36 °C⁶⁹.

O bacilo da hanseníase parece ser altamente dependente da temperatura, pois produz lesões principalmente nas partes mais frias do corpo^{70, 71}. Esta declaração é atualmente reconhecida pela maioria dos hansenólogos como sendo verdade. Na primeira metade do século XX, a teoria da temperatura, como citada, foi baseada principalmente em observações clínicas. Em 1959, Brand⁷¹ fez um excelente resumo de observação clínica que favoreceu a teoria de temperatura.

Em um estudo clínico em 1968, Hastings, et al.⁷² reforçaram os argumentos a favor da teoria da temperatura por meio de relatórios em que eles encontraram um índice bacteriano significativamente maior em pele com uma temperatura média de 32,05 °C quando comparado à pele com uma temperatura de superfície média de 33,46 °C.

Shepard⁷³ também mensurou a temperatura que seria a mais indicada para poder multiplicar mais rapidamente o *M. leprae* em coxim plantar, onde concluiu ser uma temperatura do tecido em torno de 27 °C a 30 °C.

A neuropatia periférica hansênica é causada pela invasão dos nervos periféricos superficiais por bacilos da hanseníase. Isto reduz o fluxo sanguíneo, resultando em temperaturas mais baixas na pele, especialmente nas extremidades⁷⁴. Estas temperaturas mais baixas estimulam a invasão e proliferação de *M. leprae*. Ao invadir a fria mucosa nasal, massas de *M. leprae* (105-107 organismos por dia) são excretadas por espirros nasais⁷³.

Assim, a distribuição de lesões bucais tem sido atribuída à preferência do bacilo para temperaturas inferiores a 37 °C^{37, 75}. Isto corrobora com a maior frequência de lesões se localizarem ao longo da linha média do palato, uma vez que

esta é uma estrutura atravessada por duas correntes de ar, nasal e bucal e, portanto, continua a ser de 1-2 ° C abaixo da temperatura do corpo^{11, 71}.

A respiração bucal é um achado muito comum em pacientes com hanseníase virchowiana devido ao envolvimento nasal causando congestão e obstrução nasal^{76, 77}. O fluxo frio do ar da inspiração, bem como o efeito de resfriamento da evaporação, diminui as temperaturas médias da superfície, especialmente sobre o dorso da língua e sobre os palatos duro e mole^{76, 78}. Nestes locais próximos à entrada de ar, como a região anterior da boca, facilitando o alojamento de bacilo^{13, 79, 80}.

Um estudo mostrou que, mesmo quando a boca está fechada a região pré-maxilar (região de incisivos) permanece fria. Concluiu-se que a baixa temperatura desta região é alcançada principalmente pela corrente de ar nasal. Quando esta rota é eliminada pelo uso de um clipe nasal, a baixa temperatura do processo alveolar pré-maxilar é mantida pelo efeito direto da corrente de ar por via bucal, e a região do incisivo inferior desce para uma temperatura semelhante. Considerando que a baixa temperatura do processo de pré-maxilar alveolar pode ser mantida diretamente pelo calor latente de evaporação a partir do piso do nariz, é importante notar que a parte de fornecimento de sangue da região é derivada do ramo septal posterior da artéria esfenopalatina em cada lado. Estas correm pelo septo nasal, um conhecido local fresco, para chegar ao canal incisivo, podendo, assim, contribuir para o efeito de resfriamento⁸⁰.

Estas afirmações acima podem estar corretas uma vez que em pacientes que sofreram traqueostomia, indiretamente, aumentou-se a temperatura da mucosa nasal, contribuindo com uma redução na carga bacilar^{76, 77}.

Nos estudos de Scheepers¹³ com exceção da área lingual da mucosa gengival dos incisivos inferiores, todos os locais com temperatura de superfície menor que 33,8 °C apresentou alguma lesão de hanseníase. A língua, relativamente quente, recobre a gengiva dos dentes anteriores inferiores o que pode explicar a ausência de lesões nessa região. O palato anterior foi envolvido, com frequência, por lesão de hanseníase (75,7%). Isto pode ser explicado pela sua temperatura fria

de superfície de 27,4 °C. Os bacilos podem invadir o palato a partir da mucosa nasal, fortemente infiltrada, através do canal nasopalatino.

Assim, lesões bucais de hanseníase ocorrem mais frequentemente em áreas da boca com temperaturas de superfície mais baixas^{13, 80}. Os principais locais da cavidade bucal para o desenvolvimento de lesões são a mucosa gengival na porção anterior da maxila, palato duro e mole, úvula e língua^{81, 82}.

Em todos os pacientes com hanseníase que apresentaram lesões bucais, autores demonstraram que o palato duro estava envolvido em 100% dos casos^{75, 83}. Nesta região, um sítio especialmente propício ao desenvolvimento do bacilo é a papila incisiva, situada logo atrás dos incisivos centrais superiores, onde a temperatura média se mantém em torno de 27,4 °C¹³. A posição mais fria da maxila é o próstio, e há um aumento gradual da temperatura a partir deste ponto, em ambas direções laterais e ascendente. Com estes fatos, há possibilidade do bacilo migrar da cavidade nasal, via ducto nasopalatino, para a porção anterior do palato duro⁸⁰.

O canal nasopalatino, também conhecido como o canal incisivo ou canal palatino anterior, é um longo trajeto fino presente na linha média da porção anterior da maxila acima da papila retroincisiva palatina⁸⁴ que liga a boca ao soalho da cavidade nasal. O canal continua na cavidade bucal como um único forame incisivo, posterior aos incisivos centrais e na cavidade nasal, como o forame de Stenson, que geralmente são em número de dois. Através de cada um deles passa o ramo terminal da artéria palatina descendente e o nervo nasopalatino para se comunicar com o ramo septal posterior da artéria esfenopalatina e nervo palatino maior, respectivamente⁸⁵.

A inervação da cavidade nasal é fornecida indiretamente através do gânglio pterigopalatino pelos nervos nasal posterior superior, palatino maior, e nasopalatino. Este último representa o maior dos nervos nasais posteriores superiores medial. Ele passa ântero-inferiormente numa ranhura no vômer para atingir o piso da cavidade nasal. A partir disto, ele passa através da fossa incisiva do palato duro e comunica-se com o nervo palatino maior para fornecer a mucosa do palato duro⁸⁶. O canal

nasopalatino possui uma grande variabilidade no que diz respeito às suas dimensões, bem como à sua aparência morfológica⁸⁵.

O envolvimento de nervos periféricos é uma característica da hanseníase e a disseminação de bacilos ao longo do nervo nasopalatino a partir da cavidade nasal, fortemente infectada, para o terço anterior do palato duro pode também ser de importância. Finalmente, a propagação pode ser ao longo das vias linfáticas⁸⁰.

A região anterior da cavidade bucal é particularmente afetada em hanseníase com a destruição severa em alguns pacientes, muitas vezes envolvendo a maxila⁸⁷. Em estudos de Taheri⁸⁸ destacaram que a deformidade facial atingiu 44% dos pacientes com hanseníase analisados. Núñez-Martí⁸⁷ encontraram, em 76 pacientes com hanseníase, grande número de ausência dos incisivos superiores e caninos (média de 2,91 por paciente). O índice de placa médio, profundidade e perda média de inserção à sondagem foram todas estatisticamente maiores nos pacientes do que nos controles. Não houve diferenças detectadas nos índices de acordo com a presença ou ausência de destruição facial ou do tipo de hanseníase^{87, 89}.

As gengivas normalmente são afetadas na palatina dos incisivos centrais superiores, muitas vezes por contiguidade de lesões do palato duro¹¹. Pode ocorrer gengivite crônica, periodontite e periodontoclasia⁹⁰.

Os contatos domiciliares com pacientes multibacilares apresentaram risco quatro vezes maior de contrair a doença quando comparados com os não-contatos⁹¹ e, os da forma virchowiana, de oito a 10 vezes⁵⁷. A condição de ser comunicante de indivíduos com hanseníase representa risco de duas vezes de retratamento por recidiva em relação ao grupo controle⁹².

Assim, a vigilância de contatos, facilitada pela descentralização das ações para a rede básica, precisa ser intensificada com o objetivo de identificar e tratar novos casos e interromper a cadeia de transmissão⁴¹.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar se a mucosa do palato pode ser um sítio de importância na detecção precoce e fidedigna para a presença do *M.leprae*.

Objetivos específicos

- Avaliar o perfil sócio-demográfico dos pacientes com hanseníase e de seus contatos intradomiciliares.
- Identificar o *Mycobacterium Leprae* em mucosa do palato.
- Comparar o nível de detecção do *Mycobacterium Leprae* em mucosa do palato com a mucosa nasal em:
 - indivíduos com hanseníase.
 - seus contatos intradomiciliares.
- Comparar o nível de detecção do *Mycobacterium Leprae* entre os genes alvos RLEP e 85B.
- Verificar o índice de positividade para o exame de anti PGL-1, correlacionando-o também com os resultados da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA

A escolha do local a serem realizados os exames foi de acordo com os índices Estaduais de prevalência da hanseníase no Brasil, onde o Mato Grosso, região hiperendêmica, ocupa o primeiro lugar no ranking com 80 casos novos a cada 100 mil habitantes⁴².

Participaram deste estudo 212 pessoas residentes em Tangará da Serra - MT e região. Destas, foram formados três grupos em que 78 pertenciam ao grupo dos que tiveram a hanseníase diagnosticada e não tinham iniciado o tratamento (G1), 54 eram contatos intradomiciliares destes pacientes (G2) e 80 indivíduos livres da doença (controle negativo) (G3). Entretanto, efetivamente foram utilizadas nos exames laboratoriais para o grupo G1 66 amostras para a qPCR, pois houve prejuízo na coleta com dificuldades técnicas na análise dos mesmos e, não se teria a possibilidade de repetição dos exames uma vez que um dos critérios de exclusão seria pacientes com o tratamento já iniciado. Já para o G2 48 amostras foram utilizadas nos exames, visto que foram excluídos 6 pessoas por já terem tido hanseníase no passado.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para os grupos G1 e G2 foram realizados entrevistas com preenchimento de formulários e os indivíduos foram submetidos à coleta de swab nasal e raspado da mucosa do palato. Para o grupo G3 foi realizada somente a swab nasal, para o controle negativo. Para todos os grupos foram realizadas a coleta sanguínea para detecção de anticorpos anti glicolipídio fenólico-1 específico para o *M. leprae* e foram analisadas através de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) para a sorologia e da qPCR no gene do DNA específico. O intuito da utilização da qPCR foi

detectar a presença ou ausência do *M. leprae* pela amplificação, não levando em consideração sua quantificação.

As entrevistas e as coletas (swab nasal, raspado da mucosa bucal e coleta de sangue) foram de responsabilidade do pesquisador e realizadas no município de Tangará da Serra – MT e região. Os exames laboratoriais foram realizados no Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru - SP.

4.2.1 Detecção do *M. leprae* através da qPCR

Na coleta da secreção nasal foi utilizado um swab estéril que foi introduzido cuidadosamente na porção ântero-superior de uma das narinas com movimento giratório delicado e com deslizamento lateral pela asa nasal interna. O procedimento foi repetido na outra narina com o mesmo swab, após o que o mesmo foi inserido em um microtubo com o conservante TE 1X, a haste foi cortada com uma tesoura, o suficiente para fechar o microtubo. Os microtubos foram mantidos a -20°C até serem processados.

Já para a citologia esfoliativa da mucosa bucal, a técnica utilizada é a mesma da coleta de material para análise microscópica das células epiteliais da mucosa bucal. Consiste em um procedimento pouco invasivo frequentemente empregado na triagem diagnóstica de neoplasias e processos infecciosos das mucosas. Entretanto, nossa citologia esfoliativa foi um pouco mais profunda na coleta do material (raspado), como descrito a seguir.

Primeiramente, houve a utilização do anestésico benzocaína tópica na porção média do palato duro na região do forame nasopalatino (papila incisiva) com o auxílio de uma haste de algodão estéril e posterior limpeza com uma gaze estéril. Aguardou-se alguns minutos até a difusão do anestésico e com a lâmina de bisturi estéril nº 15c posicionada verticalmente ao tecido iniciou-se o raspado do palato no sentido lateral, a fim de coletar células, até atingir um leve sangramento. Removeu-se o produto raspado da lâmina de bisturi ao agitá-la de encontro ao microtubo com o conservante TE 1X e após, foi acondicionado a -20°C até o seu processamento.

Para a extração de DNA do *M. leprae* os microtubos contendo os swabs nasal/citologia esfoliativa do palato em tampão TE 1X foram agitados vigorosamente em vortex após o que o conteúdo foi esgotado na parede do microtubo. Em seguida, foi adicionado 50 µl de lisozima (10 mg/ ml) em cada tubo e incubado a 37 °C por 90 minutos. Retirado da incubação, adicionou-se 70 µl de SDS 10% + 50 µl PK (10 mg/ ml) seguido da incubação a 60 a 65 °C overnight. Antes do início da etapa seguinte, foi inativado a PK durante 5 min a 94°C. Esperou-se esfriar e então adicionou-se 600 µl de fenol + clorofórmio + álcool isoamílico (25:24:1). Procedeu-se uma centrifugação por 15 minutos (T.A.) e colocação do volume recuperado (sobrenadante) em outro tubo limpo. Foi adicionado 500 µl de isopropanol, misturado por inversão e colocado -20 °C overnight. Foi centrifugado por 10 minutos a 13.200 rpm a -4 °C, em seguida desprezado cuidadosamente o sobrenadante com a pipeta em 450 µl. Ao ser adicionado 1000 µl de etanol absoluto gelado foi misturado por inversão e centrifugado por 5 minutos a 13.200 rpm a -4 °C. Desprezado novamente o sobrenadante e deixado o “pellet” secar, foi ressuspendido o “pellet” em água estéril em volumes de 60 a 100 µl.

Na Amplificação de DNA de *M. leprae*, os genes alvos e sequência de primers utilizados foram os seguintes^{62, 64}: para o gene RLEP (sequência repetitiva) utilizou um conjunto de primers (sense, 5'- GCA GCA GTA TCG TGT TAG TGA A - 3', e antisense, 5'- CGC TAG AAG GTT GCC GTA T - 3'), sonda TaqMan (5'- CGC CGA CGG CCG GAT CAT CGA - 3') (Applied Biosystems) e para amplificação do gene 85B os primers (sense, 5'-GTG GTC GGC CTC TCG AT-3', e antisense, 5'-CGA GCC AGC ATA GAT GAA CTG ATC-3 ') e sonda TaqMan (5'- CTC GGC CCT AAT ACT GG -3').

Os níveis de RLEP e 85B em amostras de DNA de *M. leprae* extraídas de swab nasal/citologia esfoliativa do palato foram determinados utilizando o sistema TaqMan ® por qPCR. Para garantir a confiabilidade e reprodutibilidade da qPCR, 0,5 µl do DNA purificado de *M. leprae* foi selecionado para esta proposta, como controle positivo da reação e TaqMan ® Mix Master 2X sem DNA para controle negativo. Às reações de qPCR, contendo TaqMan ® Mix Master 2X, em um volume total de 12,5 µl foi adicionado 2 µl de DNA de swab nasal/citologia esfoliativa do palato (quando

da amplificação da sequência repetitiva RLEP) e 5 μ l (para o gene 85B), 100 nM da sonda para a sequência repetitiva RLEP e o gene 85B e 300 nM de cada primer (todos os alvos). A mesma reação foi feita individualmente para o DNA purificado de *M. leprae*.

As reações foram submetidas ao seguinte programa: a 50 °C por 2 min., 95 °C por 10 min. e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min. usando o Sistema Step One Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). A curva de titulação padrão para o sistema qPCR foi gerada utilizando diluições de 10 vezes de DNA purificado do *M. leprae* a partir de um tatu infectado variando de 1 a 10 ng fg.

4.2.2 Quantificação dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 pelo teste de ELISA em soro humano

Após a coleta sanguínea e obtido o soro por centrifugação padrão (10 minutos a 1500rpm), este foi transferido para microtubos e congelado a -20°C até seu processamento.

O antígeno foi cedido pelo Professor Dr. John Spencer, do Laboratório de Pesquisas em Micobactérias da Universidade Estadual do Colorado, EUA. A técnica utilizada foi a desenvolvida por Brett et al.²⁵, modificada levemente por Silva et al.⁹³, como descrita resumidamente a seguir:

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação com 96 cavidades, previamente revestidas com 50 μ L do antígeno semissintético glicolípido fenólico 1 (PGL-1) natural dissacarídeo-octil-bovine serum albumin (ND-O-BSA), previamente diluído na concentração de 0,2mg/mL de tampão carbonato, e posteriormente incubadas por 24 horas em temperatura ambiente.

No momento do experimento foram realizadas em sequência as etapas de lavagem das placas em lavadora automática por quatro vezes seguidas com PBST (tampão fosfato + Tween 20); adição de 100 μ l por poço da solução bloqueadora (PBS a 1% de BSA) em todos os poços e incubação por 1 hora a 37°C; retirada da

solução bloqueadora, invertendo a placa em papel de filtro; adição de 50 µl dos soros teste diluídos a 1:500 em PBST a 10% de NGS (Normal Goat Serum - Gibco®) e dos soros controles positivo e negativo; incubação por 1 hora a 37°C seguida da lavagem por quatro vezes com PBST; adição de 50µl de conjugado anti-IgM humana (α IgM-H) ligado a peroxidase diluído a 1:10.000 em PBST a 10% com NGS em toda a placa; incubação por 1 hora a 37° C e nova seção de lavagem por quatro vezes.

Os valores de corte para soropositividade determinada no grupo de controle foram de 0-150. Assim, valores de absorvância maiores que 150 de densidade óptica (OD) foram considerados positivos.

4.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados coletados foram armazenados na planilha Excel e posteriormente analisados utilizando programa estatístico adequado (Bioestat®), considerando os seguintes processamentos:

ESTATÍSTICA DESCRITIVA – descrição da distribuição de ocorrência, envolvendo frequência absoluta e relativa percentual e respectivos tabelas e comparação dos resultados obtidos entre os 3 grupos experimentais.

As diferenças entre as proporções de alguns exames foram analisadas empregando-se tabelas de contingência e utilizando-se do teste de Qui-quadrado (χ^2) de Pearson, considerando-se para rejeição da hipótese de nulidade um nível de significância de 5%.

4.4 SALVAGUARDAS ÉTICAS

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade, e os procedimentos só tiveram início após sua aprovação (protocolo de número 157/11) e assinatura do termo de consentimento Livre e Esclarecido, pelos sujeitos da pesquisa.

5 RESULTADOS

Na seção dos anexos constam as tabelas com os dados referentes à entrevista realizada para os grupos G1 e G2. Segue a descrição com os resultados de maior frequência absoluta e suas respectivas porcentagens:

Para G1 (anexo 1), o sexo masculino predominou com 56% e a idade na faixa etária de 46 a 60 anos (45%). O ensino fundamental incompleto atingiu os 63% dos casos e a renda familiar com 47% para 1 a 2 salários mínimos. A maioria possui casa própria (76%) com três cômodos (45%, considerando apenas quarto e sala). O tipo de esgoto atingiu 85% como sendo fossa. No convívio fora da residência com alguém com hanseníase nos últimos 10 anos figurou o irmão com 22%. Dentro de sua residência 65% disseram nunca ter tido alguém que tivesse a hanseníase. A distribuição no que tange ao tempo dos primeiros sinais e sintomas, houve uma distribuição igualitária sobressaindo levemente a de 0 a 6 meses (38%) e depois de 1 a 5 anos (27%). A classificação operacional foi de 58% para multibacilares e para a classificação clínica, de 29% para BB.

Para G2 (anexo 2), o perfil dos comunicantes foi de 63% para o sexo feminino, com 30% deles na faixa etária de 0 a 15 anos (30%), de nível de escolaridade de fundamental incompleto e médio completo em igualdade (24%). O grau de parentesco girou em torno do filho (a) com 37% e esposo (a) com 28%. Em distribuição quase igual, sua moradia há um convívio de 3 a 5 pessoas, sobressaindo-se para a de 4 pessoas (28%). Mais de 10 anos (48%) é o tempo de convívio com o paciente com hanseníase.

As tabelas de 1 a 6 apresentam os resultados dos exames laboratoriais com a frequência absoluta e suas respectivas porcentagens:

Tabela 1 – Índices gerais dos exames laboratoriais para os grupos, incluindo a classificação operacional

		Anti PGL-1	RLEP m.p.	RLEP m.n.	85B m.p.	85B m.n.	IB
G1 (n = 66)	Positivo	10 (13%)	23 (35%)	29 (44%)	6 (9%)	14 (21%)	10 (38%)
P/ Anti PGL-1 (n = 78)	Negativo	68 (87%)	43 (65%)	37 (56%)	60 (91%)	52 (79%)	16 (62%)
P/ IB (n = 26)	χ^2	p = 0,3731			p = 0,0893		
G1 - PB (n = 33)	Positivo	1 (3%)	11 (33%)	12 (36%)	2 (6%)	6 (18%)	NR
	Negativo	32 (97%)	22 (67%)	21 (64%)	31 (94%)	27 (82%)	
	χ^2	p = 1			p = 0,25		
G1 - MB (n = 33) P/ Anti PGL-1 (n = 45)	Positivo	9 (20%)	12 (36%)	17 (52%)	4 (12%)	8 (24%)	
	Negativo	36 (80%)	21 (64%)	16 (48%)	29 (88%)	25 (76%)	
	χ^2	p = 0,3212			p = 0,3384		
G2 (n = 48)	Positivo	6 (13%)	15 (31%)	18 (38%)	6 (13%)	9 (19%)	
	Negativo	42 (88%)	33 (69%)	30 (63%)	42 (88%)	39 (81%)	
	χ^2	p = 0,6674			p = 0,5740		
G3 (n = 80)	Positivo	0 (0%)	NR	5 (6%)	NR	0 (0%)	
	Negativo	80 (100%)		75 (94%)		80 (100%)	

IB: índice bacilosscópico

RLEP m.p.: qPCR RLEP em mucosa do palato

RLEP m.n.: qPCR RLEP em mucosa nasal

85B m.p.: qPCR 85B em mucosa do palato

85B m.n.: qPCR 85B em mucosa nasal

NR: não realizado

De acordo com a tabela 1, no grupo G1 o anti PGL-1 foi positivo para 13% dos casos, o índice bacilosscópico foi positivo para 38% deles. Para a qPCR em todos os grupos a RLEP mostrou melhores e, em G1, obtivemos 35% de positivos para a mucosa do palato e 44% para mucosa nasal. Os resultados dos exames entre os dois sítios não mostraram diferenças significativas. Para os paucibacilares, a positividade para o anti PGL-1 foi de 3%, a qPCR RLEP na mucosa do palato foi de 33% e 36% na mucosa nasal. Nos multibacilares, o índice foi de 20%, 36% e 52%, respectivamente.

No grupo G2, obtivemos casos positivos para o anti PGL-1, qPCR RLEP em mucosa do palato e nasal, respectivamente, 13%, 31% e 38%. Para G3, nenhum caso foi positivo para o anti PGL-1 e 5 casos (6%) positivos para a qPCR em mucosa nasal.

Tabela 2 – Casos positivos registrados em exame de anti PGL-1, de acordo com a classificação clínica

	Indeter- minada (n=6)	Neural Primária (n=16)	TT (n=12)	BT (n=9)	BB (n=23)	BV (n=3)	VV (n=9)
Anti PGL-1 +	1 17%	0 0%	0 0%	3 33%	2 9%	0 0%	4 44%

A positividade do anti PGL-1 em relação à classificação clínica (tabela 2) foram maiores para os casos de hanseníase virchoviana (44%) e borderline-tuberculóide (33%).

Tabela 3 – Associação dos exames de anti PGL-1 e de qPCR RLEP

	G1	G2	Total
Anti PGL-1 - qPCR m.n. -	34 (52%)	27 (56%)	61 (54%)
Anti PGL-1 + qPCR m.n. -	3 (5%)	3 (6%)	6 (5%)
Anti PGL-1 - qPCR m.n. +	25 (38%)	14 (29%)	39 (34%)
Anti PGL-1 + qPCR m.n. +	4 (6%)	4 (8%)	8 (7%)
Total	66 (100%)	48 (100%)	114 (100%)
Anti PGL-1 - qPCR m.p. -	39 (59%)	28 (58%)	67 (59%)
Anti PGL-1 + qPCR m.p. -	4 (6%)	5 (10%)	9 (8%)
Anti PGL-1 - qPCR m.p. +	20 (30%)	13 (27%)	33 (29%)
Anti PGL-1 + qPCR m.p. +	3 (5%)	2 (4%)	5 (4%)
Total	66 (100%)	48 (100%)	114 (100%)

m.n.: mucosa nasal

m.p.: mucosa do palato

Vimos na tabela 3 que houve uma maioria de negatividade entre o anti PGL-1 e mucosa nasal e também para a do palato. Notamos que houve mais positivos para a mucosa nasal e do palato conjuntamente com os negativos para o anti PGL-1.

Tabela 4 – Associação dos dois sítios de exames em qPCR RLEP para os grupos G1 e G2

	m.n. - m.p. -	m.n. + m.p. -	m.n. - m.p. +	m.n. + m.p. +	Total	χ^2
G1	29 (44%)	12 (18%)	6 (9%)	19 (29%)	66 (100%)	p = 0,0006
G2	27 (56%)	6 (13%)	3 (6%)	12 (25%)	48 (100%)	p = 0,0002
Total	56 (49%)	18 (16%)	9 (8%)	31 (27%)	114 (100%)	

m.n.: mucosa nasal

m.p.: mucosa do palato

Uma associação significativa observamos na tabela 4, em que os resultados de positividade e negatividade em ambos os sítios foram equivalentes. Houveram casos positivos para a mucosa do palato e negativos para a nasal e vice-versa, em ambos os grupos analisados.

Tabela 5 – Análise dos casos positivos em qPCR

	Rlep m.p.	Rlep m.n.	85B m.p.	85B m.n.
G1 (n = 37)	23 (62%)	29 (78%)	6 (16%)	14 (38%)
G2 (n = 21)	15 (71,4%)	18 (85,7%)	6 (28,6%)	9 (42,9%)
χ^2	p = 0,9099		p = 0,7972	

m.n.: mucosa nasal

m.p.: mucosa do palato

Obs: houveram pacientes com positividade tanto em mucosa nasal quanto na do palato.

Ao se analisar somente os casos positivos em qPCR RLEP, notamos a semelhança dos sítios entre a mucosa do palato e a nasal visto que a diferença entre os resultados não foi significativa, para ambos os genes alvos (p>0,05).

Tabela 6 - Casos positivos registrados em exame de qPCR, de acordo com a classificação clínica

	Indeter- minada (n=6)	Neural primária (n=16)	TT (n=11)	BT (n=6)	BB (n=15)	BV (n=3)	VV (n=9)
Rlep - mucosa bucal +	4 (67%)	2 (13%)	4 (36%)	3 (50%)	7 (47%)	1 (33%)	2 (22%)
85A - mucosa bucal +	0 (0%)	1 (6%)	0 (0%)	1 (17%)	2 (13%)	1 (33%)	1 (11%)
Rlep - mucosa nasal +	3 (50%)	5 (31%)	4 (36%)	1 (17%)	9 (60%)	2 (67%)	5 (56%)
85A - mucosa nasal +	1 (17%)	1 (6%)	2 (18%)	2 (33%)	4 (27%)	2 (67%)	2 (22%)

Obs: houve no mesmo paciente positividade para testes diferentes.

Notamos na tabela 6 a tendência de positividade na RLEP de acordo com os pólos da hanseníase, onde a positividade da mucosa nasal tende a ser para o pólo virchoviano e da mucosa do palato tende para o tuberculóide e indeterminada. Já para a 85B, a tendência de ambos foi para o pólo virchoviano.

6 DISCUSSÃO

Através das entrevistas realizadas com os grupos, verificou-se que para G1 (anexo 1), 76% tem casa própria, com dois quartos e uma sala (45%) e com saneamento básico precário, sendo o esgoto realizado por meio de fossa (85%). O convívio maior com pessoas fora da sua residência se dá através do irmão (22%). Alguns autores já demonstraram esta problemática^{6, 14, 16, 50} em que os níveis de endemia e às condições socioeconômicas desfavoráveis, facilitam a relação do contato íntimo e prolongado entre os familiares, assim como condições precárias de vida e de saúde, influenciam no risco de adoecer.

Em relação à escolaridade a média foi de 63% para o ensino fundamental incompleto, a renda foi de 1 a 2 salários mínimos (47%) e de mais de 2 a 4 salários (24%). Essa situação de exclusão também está evidenciada na falta de acesso à educação que os doentes possuem, elemento que dificulta muitas vezes a adesão ao tratamento, e o próprio entendimento sobre a doença e suas complicações⁵⁰. Consequentemente, nos dias de hoje, a falta de educação se reflete numa baixa remuneração salarial.

Já para G2 (anexo 2) o grau de parentesco foi de filhos (37%) e esposa (o) (28%), sendo que em 48% dos casos o convívio foi de mais de 10 anos com o paciente recém-diagnosticado com hanseníase. Uma das propostas de atingir as metas de eliminação da hanseníase é o controle dos contatos intradomiciliares, que são representados pelas pessoas que residem na mesma casa ou que tenham um convívio contínuo e prolongado com o doente¹⁴. Há um elevado risco de contrair a hanseníase pelos contatos intradomiciliares, ressaltando assim a importância da prática do exame dos comunicantes para o controle da doença¹⁰.

Com relação ao gênero para o G2, a maior prevalência de feminino (em nosso caso, 63%) e a média de faixa etária poderiam ser explicadas pelo maior número de mulheres adultas que procuram os serviços de saúde quando são convocadas para fazerem a vigilância de contatos de hanseníase⁹⁴, além da maior exposição ao doente no ambiente domiciliar e de apresentarem um caráter materno

do autocuidado. Esta última característica se reflete na idade dos contatos que mais realizaram os exames, em que se sobressaem os mais jovens de 0 a 15 anos (30%) e de 16 a 30 anos (28%), sendo assim, os filhos a grande preocupação familiar.

Os achados clínicos e histopatológicos de Costa⁹⁵ confirmaram relatos anteriores de que há uma redução da incidência de alterações bucais, que é provavelmente devido ao tratamento precoce. O melhor controle da hanseníase, obtido com a introdução da multidrogaterapia, reduziu dramaticamente a frequência de lesões bucais nessa doença⁹⁶.

Corroborando a ideia de outros autores^{11, 97, 98}, acredita-se que as lesões da mucosa bucal são fontes de infecção em pacientes virchovianos que pode expulsar um grande número de bacilos, quando eles cospem, espirram, tosse ou falam, sendo que os bacilos viáveis^{11, 98} foram encontrados em algumas dessas lesões^{79, 81, 99, 100}. Uma vez libertados no ambiente, em condições favoráveis, o bacilo pode ser viável fora do hospedeiro humano por até nove dias¹⁰¹, aumentando a possibilidade de contato e propagação através da pele sem integridade.

Pacientes com hanseníase em estágio subclínico ou aqueles que evoluem para cura espontânea podem ser fontes de disseminação bacilífera, apresentando um período transitório de excreção do patógeno via nasal e/ou bucal^{102, 103}. Tais características são epidemiologicamente relevantes, já que praticamente todos os indivíduos de áreas endêmicas apresentam evidências imunológicas e moleculares de exposição ao *M. leprae*¹⁰².

Há poucos estudos publicados que tratam das manifestações bucais na hanseníase. A maioria das referências é antiga, da época em que os pacientes evoluíam ao longo dos anos pela falta de um tratamento eficaz para a doença. Na literatura recente, em plena fase da multidrogaterapia, faltam dados sobre o comprometimento da mucosa bucal pela hanseníase⁹⁶.

A mucosa nasal é comprometida nas fases iniciais da doença, frequentemente precedendo o aparecimento das manifestações cutâneas¹⁰⁴. Em dois terços dos pacientes com lepra BV e VV já foi demonstrado envolvimento

histopatológico da mucosa bucal e palato na ausência de lesões clínicas¹⁰⁵. A mucosa bucal pode ser contaminada por bacilos presentes na secreção que desce pelo nariz indo até a faringe, mas, apesar dessa contaminação, verifica-se uma resistência da mucosa bucal ao surgimento de lesões⁹⁶, o que sugere que a invasão desta mucosa é decorrente da bacilemia pela disseminação e multiplicação bacteriana^{106, 107}.

Já foi estabelecido que as lesões bucais geralmente aparecem no estágio avançado da hanseníase^{83, 107, 108}. Constatou-se que a mucosa bucal pode estar comprometida, mesmo na ausência de lesões aparentes^{98, 99, 105, 106}, sendo que o seu comprometimento permanece oculto sob o ponto de vista clínico, e somente uma busca histopatológica pode revelá-lo^{96, 106, 109}.

Assim, como resultado da utilização da poliquimioterapia em larga escala e detecção precoce dos casos de hanseníase, as lesões causadas pela proliferação do *Mycobacterium leprae* tiveram significativa redução^{39, 103, 110, 111}. Consequentemente, lesões avançadas da face, nasofaringe e orofaringe são agora raramente visto, mas os sinais de apresentação e sintomas da hanseníase ainda surgem ocasionalmente na mucosa nasal e bucal⁸⁹, mesmo com curto tempo de evolução da doença⁹⁶.

Morfologicamente as lesões bucais variam de enantemas para úlceras, perfurações e cicatrizes, passando por pápulas, nódulos (lepromas) e erosões superficiais⁹⁵.

A despeito de ser menos evidente, a infecção da cavidade bucal pelo *M. leprae* pode revelar detalhes importantes a respeito da transmissibilidade e imunopatogenia da hanseníase. A participação da resposta imune local na proteção contra a doença, ainda são tópicos de pesquisa não explorados totalmente³⁹. Fatores como a temperatura local, renovação epitelial acelerada em relação à pele e características imunológicas locais estão entre as prováveis justificativas para manutenção do bacilo da mucosa bucal³⁶.

Entretanto, a saliva, como barreira física, é um componente importante da defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos¹¹². A ação antimicrobiana inespecífica da saliva é um aspecto muito importante, pois permite estabelecer um equilíbrio no ecossistema bucal, controlando a ação e metabolismo de muitas das bactérias deste ambiente. Os constituintes responsáveis por esta ação são proteínas como a lisozima, lactoferrina e glicoproteínas ricas em prolina^{113, 114}.

O mediador humoral mais importante na imunidade bucal é a imunoglobina IgA secretora por estar presente em vários mecanismos de defesa imunológica na cavidade bucal e por ter grande resistência à degradação proteolítica de outras proteínas¹¹⁵.

A maior parte dos processos patológicos que afetam a cavidade bucal apresenta algum agente infeccioso. Entretanto, a microbiota residente bucal desempenha importante papel na resistência inespecífica do hospedeiro frente aos patógenos exógenos, além de estimular o sistema imunológico¹¹⁶.

Assim, ao ultrapassar todas estas barreiras o agente invasor tem a possibilidade de provocar um desequilíbrio fisiológico direto, ou permitindo a entrada de outros agentes agressores, dando origem a um desequilíbrio fisiológico indireto¹¹².

No que tange à identificação da invasão destes patógenos, várias abordagens têm sido utilizadas para identificar os primeiros casos de hanseníase, mas nas ferramentas de diagnóstico disponíveis faltam a sensibilidade e especificidade necessárias para atingir este objetivo. Estudos epidemiológicos têm sido realizados nas regiões endêmicas, a fim de identificar os contatos infectados e o uso de testes de ELISA e PCR demonstraram a possibilidade de melhoria da precisão diagnóstica e redução de transmissão^{34, 117-121}. A histopatologia ainda não é suficiente como um método alternativo para detectar paciente cujo índice bacilar é zero¹²².

Uma destas abordagens é o teste sorológico do anti PGL-1. Sua especificidade, segundo estudos de Chanteau¹⁹, foi de 93,1% para o antígeno NDO sem quaisquer reações falso-positivos. Em nossos casos, o grupo G3 (tabela 1) para

anti PGL-1 teve 100% de negatividade para o antígeno NDO. Entretanto, na qPCR RLEP, apesar de no ato da realização dos exames ter perguntado e excluído os que já tiveram contato familiar com hansenianos, obtivemos para este grupo 6% de positividade (5 casos) e que em entrevista posterior constatamos que estes pacientes tiveram este contato e que queriam apenas realizar os exames para comprovação, omitindo a informação. Este mesmo autor relatou que a sensibilidade do teste para detectar os pacientes que não tinham sido tratados, tinha sido de 100% para os doentes com lepra multibacilar, e de 21%, para pacientes com hanseníase paucibacilar, quando usados o NDO no ELISA¹⁹. Não foi o que presenciamos em nossa pesquisa, com positividade de 20% para a classificação operacional MB e 3% para PB, com diferenças não significantes entre eles.

Para Frota¹²³, a soropositividade do anti-PGL-I entre as diferentes formas clínicas de casos de hanseníase foi de 61% para virchowiana, de 25% para tuberculóide e 27% para indeterminada. Em nossos estudos (tabela 2), a positividade foi de 44%, 33% e de 17%, respectivamente, para virchowiano, borderline-tuberculóide e indeterminada.

A positividade de anti-PGL-1 sérico em contatos domiciliares representa um risco 7,5 vezes maior de desenvolvimento da doença¹²⁴. De acordo com Cruz¹²⁵, a prevalência do anticorpo anti-PGL-1 entre os contatos domiciliares foi de 15,0%, e para Frota¹²³ sendo semelhante (15,8%). Em concordância com estes autores verificamos 13% de positivos para o grupo G2 (tabela 1). Um fato interessante ocorreu em um dos nossos contatos, em que o teste de anti PGL-1 foi positivo mas o de qPCR foi negativo para todas as amostras. Após reavaliado pelo médico, foi constatado uma hanseníase do tipo BB com nervos comprometidos. Assim, nestes casos, verifica-se que para os genes estudados os esfregaços podem ser insuficientes e que uma abordagem de exames em seus nervos poderia resultar num maior sucesso. Com isso, neste quesito, obtivemos 5% para G1 e 6% para G2 em que a sorologia foi positiva e a mucosa nasal negativa e de 6% e 10% para a mucosa do palato, respectivamente (tabela 3).

Apesar dos riscos relativos de adoecimento entre os contatos intradomiciliares soropositivos para anti PGL-1 apresentarem uma taxa de 27 vezes maior que a dos

“não-expostos”, na situação de elevada endemicidade de hanseníase, 50% dos casos novos, para Brasil¹²⁶, surgiram entre os não-contatos soronegativos, ou seja, sem fonte de infecção conhecida. Portanto, segundo este autor, o teste anti-PGL-1 usado revela-se, na prática, de pouca aplicabilidade.

Outro aspecto que podemos analisar é referente aos idosos, em que menos calor do núcleo celular está disponível para transporte pela corrente sanguínea para partes periféricas do corpo devido ao baixo metabolismo, e o fluxo de sangue pode ser dificultada por alterações vasculares estenóticas. Por conseguinte, como um sinal geral de envelhecimento, uma temperatura reduzida pode ser esperada na cavidade bucal⁷⁸. Assim, podemos verificar que o nosso resultado de diagnóstico médico para G1 foi majoritariamente de 45% na faixa etária de 46 a 60 anos (anexo 1).

Verificamos também para o G1 (anexo 1) na faixa etária de 0 a 15 anos 8% de detecção, o que consideramos relativamente alta, uma vez que a região analisada gira em torno dos 100 mil habitantes. Sabe-se que a hanseníase raramente ocorre em crianças e quando observadas em maiores quantidades em menores de quinze anos, maior é a endemicidade da doença local⁶.

Há uma incidência maior da doença nos homens do que nas mulheres, na maioria das regiões do mundo⁶. Foi verificada em um estudo que as temperaturas em homens idosos foram menores do que nos jovens do sexo masculino, enquanto que as temperaturas em jovens e idosos fêmeas não diferiram. Este achado é interpretado principalmente como um sinal de deterioração das funções corporais e vascular, que é acreditado para ocorrer mais cedo nos homens do que nas mulheres⁷⁸. A prevalência de lesões bucais foi maior em homens que em mulheres (73%: 27%)⁷⁵. Ligeiramente com maior índice (56%) também verificamos esta característica em relação ao sexo masculino para o grupo G1 (anexo 1).

Com a observação no histórico das lesões da hanseníase observam-se relatos de envolvimento do palato duro, com destruição das suturas palatinas transversas e perfuração palatina juntamente com atrofia da espinha nasal anterior e o processo alveolar da maxila^{89, 127}. Assim, este fato é considerado de muita

importância epidemiológica, juntamente com o envolvimento da mucosa nasal, pois pode constituir uma importante fonte de transmissão do bacilo^{11, 38}.

Dos pacientes estudados por Costa⁹⁵, 69% apresentaram alterações clínicas bucais. Nos dois casos em que foram encontradas lesões específicas, o palato duro foi o local de envolvimento e tiveram mais numerosos bacilos nas lesões palatais do que em suas biópsias cutâneas, o que é incomum.

É seguindo esta linha de raciocínio por estas citações anteriores que propusemos este estudo, concentrando na região do palato duro, especificamente onde se aloja o nervo nasopalatino. Para tal identificação dos bacilos da hanseníase, lançamos mão da técnica de PCR em tempo real. Diferentemente de Martinez³⁷, realizamos uma citologia esfoliativa mais profunda nesta região com o intuito de coletar maior quantidade de células e obtermos maior índice de detecção da micobactéria.

Atualmente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – polymerase chain reaction) é uma técnica de amplificação *in vitro* de DNA utilizada principalmente onde as lesões de pele são de difícil avaliação ou quando a baciloscopia é negativa^{57, 121}. São de abordagens rápidas e potencialmente altas a sua sensibilidade e especificidade^{122, 128}, e detecta DNA do *M. leprae* em 95,6% nos MB e 44,2% nos PB nas biópsias, já para os esfregaços é de 52,9% nos MB e de 22% nos PB¹²⁸.

O método de PCR em tempo real é pelo menos 20 vezes mais sensível do que a técnica de coloração bacilos álcool-ácido resistentes com amostras clínicas. No estudo de Martinez, o número de cópias do genoma apresentadas por alguns pacientes PB de acordo com o sistema TaqMan foi tanto como 40 vezes maior do que o número de micobactérias necessária para a coloração AFB. A análise molecular é muito mais sensível e rigorosa do que esta coloração e também indica que o exame microscópico da linfa é incapaz de identificar corretamente os pacientes MB. Esta descoberta tem implicações clínicas, pois parece que uma série de pacientes foram diagnosticadas e não tratadas adequadamente⁶².

Além disso, a PCR em tempo real é cada vez mais utilizado para fins diagnósticos, devido ao seu formato semi-automatizado, flexibilidade e velocidade, proporcionando uma vantagem óbvia experimental em trabalho de laboratório de rotina e uma sensibilidade analítica consistentemente superior do que a de PCR convencional^{62, 65}. Entretanto, a amplificação do DNA por PCR também apresenta limitações porque só podem detectar material genético, detectando assim bactérias viáveis e também as não viáveis conjuntamente¹²⁹.

Já para a questão dos genes alvos para a PCR, a enumeração molecular de *M. leprae* usando o RLEP TaqMan PCR é um método rápido e mais preciso para quantificar a micobactéria em tecidos que podem ter uma ampla aplicabilidade na investigação. O RLEP TaqMan PCR permite a análise rápida de amostras com elevada reprodutibilidade e é especialmente valioso para a detecção de baixos números de bacilos. É altamente reprodutível e a aplicação da técnica pode facilitar o trabalho com este agente, em muitos laboratórios, sendo um substituto adequado para microscópica direta de contagem de bacilos⁶⁵.

O ensaio de qPCR RLEP tem provado ser mais sensíveis do que outros ensaios e tem também uma área de maior aproximação a curva ROC (receiver operator characteristic), o que demonstra um melhor compromisso entre a sensibilidade e especificidade para este ensaio¹³⁰.

Num estudo com um total de 62 pacientes não tratados, foram realizados ensaios de qPCR em amostras de biópsias de pele. Como resultado, verificou-se uma diminuição da sensibilidade para Ag 85B (66,1%), mas com especificidade máxima semelhante para o diagnóstico da hanseníase. Inversamente, o ensaio RLEP mostrou ser a mais sensível (87,1%) e, além disso, foi positivo para 3 amostras de pacientes originalmente não diagnosticados como tendo hanseníase, mas esses pacientes desenvolveram hanseníase 5-10 anos após a coleta da biópsia¹³⁰. Em relação ao gene alvo (tabela 1), há uma corroboração a estes dados, visto que a sensibilidade de detecção do *M. leprae* foi menor para os dois sítios estudados por 85B, com 9% de positivos para a mucosa do palato e 21% para a mucosa nasal, frente a 35% e 44% para RLEP, respectivamente, para o G1. Para o

grupo G2, a relação 85B / RLEP respondeu da mesma forma com detecções menores (13 / 31% para a mucosa do palato e de 19 / 38%).

Entre todos os marcadores de ácido nucléico para o diagnóstico da hanseníase na literatura, três apresentaram maior sensibilidade e especificidade (RLEP, Ag 85B e 16S rRNA)^{29, 130}. De fato, os resultados demonstraram que a análise de qPCR RLEP poderia ser usado para melhorar detecção do paciente devido à sua alta sensibilidade / confiança (100/88.9% para pacientes MB e 84.6/80.5% para pacientes PB), embora a especificidade de 73,3% deve ser levada em consideração, segundo Goulart. No entanto, os pacientes foram acompanhados por até 10 anos e não desenvolveram a doença. Assim, a positividade por PCR pode de fato representar transporte de bacilos ou infecção subclínica, o que não indica, por si só para a evolução da doença²⁹.

Envolvimento das mucosas é particularmente pendente no nariz, provavelmente devido à preferência do *M. leprae* para locais mais frios^{12, 13, 96}. Entretanto, há uma possibilidade das lesões nasais serem precursoras para o desenvolvimento de lesões bucais^{11, 81}. Em nossos resultados (tabela 4), com diferenças estatisticamente significantes, a relação de concomitância nos mostra que foram positivos na mucosa nasal e no raspado da mucosa do palato em qPCR RLEP para o G1 e G2, 29% e 25%, respectivamente, e que, positivos para a mucosa do palato e negativos para a mucosa nasal em 9% e 6%, respectivamente. Assim, verifica-se que há casos onde a via de infecção precursora pode ser a bucal.

Além disso, o estudo de Martinez³⁸ confirma esta informação ao analisar doentes que apresentaram 3,45% de positividade em PCR de swab bucal e negatividade para a detecção do bacilo em swab nasal, demonstrando que existem pacientes com carga bacilar na cavidade bucal e que a boca pode atuar como o local primário de infecção, além de contribuírem para a disseminação do bacilo por esta via.

Dentre os casos de hanseníase que tiveram os resultados positivos em qPCR por RLEP (tabela 5), 78% o tiveram positivos para swab nasal e 62% por raspado da mucosa do palato. E, para os contatos domiciliares, 85,7% e 71,4%,

respectivamente. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os exames de swab nasal e do raspado da mucosa do palato, demonstrando que a sensibilidade entre os dois exames são equivalentes.

Nos ensaios em swabs bucais (em mucosa de revestimento das bochechas e lábios) de Martinez³⁸, a positividade global da PCR para os pacientes foi de 18,26% e para os contatos de 6,83%. Esse estudo forneceu evidências de que a mucosa bucal pode ser um sítio secundário de transmissão e infecção por *M. leprae*, e contatos com DNA bacilar podem estar ativamente envolvidos na transmissão. Também mostraram que o DNA de bacilos é mais frequentemente encontrado na mucosa bucal de pacientes PB. Corroboramos e reafirmamos que a cavidade bucal pode ser uma fonte primária de infecção, visto que encontramos no resultado global (tabela 1) para a detecção nos grupos G1 de 35% de positivos para a mucosa do palato por qPCR RLEP e de 31% para o grupo G2.

Segundo Martinez³⁸, pacientes PB demonstraram 12,37% de positivos para detecção de DNA *M. leprae* em esfregaços bucais, o que não foi significativamente diferente dos pacientes MB, que demonstraram 20,2% de positividade. A nossa situação foi de não haver diferenças significativas entre os exames de swab nasal e raspado da mucosa do palato, em que obtivemos positividade nos casos de paucibacilares de 33% para raspado da mucosa do palato e de 36% para a swab nasal e, nos multibacilares, 36% e 52%, respectivamente (tabela 1).

Foram demonstradas na literatura que as taxas de positividade dos esfregaços nasais de pacientes eram superiores em todos os esfregaços bucais nas formas clínicas do espectro, com a exceção da forma de TT, corroborando os resultados que demonstraram a mucosa nasal, como o local preferencial para entrada e saída de *M. leprae*¹³¹. As positivities de swabs bucais, manchas de pele, biópsia de pele e testes de ELISA anti-PGL-I aumentaram para as formas MB, chegando a 42,86% em swabs bucais na forma LL. Também observou-se positividade para DNA do *M. leprae* na cavidade bucal em todas as formas clínicas da doença, inclusive nos pacientes PB, da forma TT. O DNA de *M. leprae* foi mais prevalente em swabs bucais de pacientes PB, enquanto que o DNA de bacilos foi mais frequentemente encontrado no swab nasal de pacientes MB³⁸. No que se

refere à classificação clínica (tabela 6), estes achados são consonantes com nossos resultados encontrados na qPCR por RLEP, com diminuição de detecção nos casos BV (33%) e VV (22%) para o raspado da mucosa do palato e maiores para indeterminada (67%) e BT (50%). E, inversamente para a swab nasal, com melhores índices para BB (60%), BV (67%) e VV (56%) e menores para indeterminada (17%), BT (33%).

Nos casos de neural primária (tabela 6) os bacilos estão presentes mais profundamente nos nervos, entretanto a detecção foi maior para a mucosa nasal (31%) que no palato (13%), sendo que, provavelmente com uma biópsia no nervo nasopalatino a detecção por qPCR poderia ter melhores resultados. A secção do nasopalatino não causa maiores transtornos, sendo que em raras vezes apenas 10% das pessoas sentem uma parestesia no local¹³².

Entretanto, para da Silva Martinez³⁷, num paciente dimorfo tuberculóide, de classificação operacional PB, a qPCR foi negativa em amostras de todos os swabs dérmicos, nervo e biópsias dos cornetos nasais inferiores, swab bucal, swab nasal e sangue periférico. A biópsia da lesão bucal do palato duro exibiu baciloscopia negativa, sem alterações patológicas evidentes, no entanto, a qPCR apresentou uma curva de amplificação do DNA do bacilo e detectou 1.126 cópias do DNA do *M. leprae* por miligramas de tecido biopsiado.

Por outro lado, recentemente Brito e Cabral¹³³ concluíram que a detecção de DNA de *M. leprae* nasal não é essencial para acompanhar contatos de hanseníase, devido à alta porcentagem de resultados negativos nos contatos, mesmo àqueles com sorologia positiva.

A relação de positividade para G1 e G2, em concomitância entre a sorologia e a qPCR RLEP na mucosa do palato foi de 5% e 4% e para PGL-1 e qPCR RLEP em mucosa nasal foi de 6% e 8%, respectivamente (tabela 3). Uma positividade concomitante tanto para PCR em esfregaços bucais e ELISA anti PGL-1 foi observada na literatura em 13,2% dos pacientes. Entre os contatos positivos para DNA *M. leprae* em esfregaços bucais, 21,67% exibiu anti PGL-1 ELISA positivo³⁸.

Em um estudo prospectivo transversal em 31 contatos de pacientes de hanseníase com sorologia positiva (PGL-1), a PCR tempo real foi positiva para a presença de DNA de *M. leprae* em 06 (19,35%) destes e o maior número de cópias do genoma do bacilo foi encontrado no contato que adoeceu. Concluíram que isoladamente os exames da mucosa nasal por PCR não permitiram o diagnóstico precoce da hanseníase. Entretanto, com a combinação de vários métodos o exame dos contatos pode ajudar na identificação da infecção subclínica e monitoramento daqueles que poderiam ter papel importante na transmissão da doença¹³⁴. Partindo da premissa que nenhum exame laboratorial é suficiente para diagnosticar ou classificar a hanseníase remete-se assim que estes exames são uma ferramenta auxiliar para possibilitar a resolução de um caso¹³⁵.

Com isso, Noordeen¹⁰ já lembrava em sua pesquisa que é importante ressaltar a diferença quase três vezes maior encontrada entre a positividade geral para detecção de DNA em swabs bucais de doentes com relação aos contatos, demonstrando que a maior fonte de infecção e transmissão do *M. leprae* são os doentes não tratados.

Assim, nossos resultados podem ser considerados de relevância para a área médica e odontológica, possibilitando que novas estratégias de tratamentos e de prevenção venham a surgir. Através da detecção do DNA do *M. leprae* no raspado do palato, acreditamos que a cavidade bucal possa ser uma via de infecção e transmissão da hanseníase e que também os contatos intradomiciliares podem estar envolvidos ativamente, em regiões de alta endemicidade, na sua transmissão.

7 CONCLUSÃO

- No perfil sócio-demográfico, foi evidenciada uma falta de acesso à educação dos pacientes com hanseníase, com moradia e condições salariais desfavoráveis, além de situação precária de saneamento básico.

- Constatou-se que há equivalência na presença do *M. leprae* na mucosa do palato duro e mucosa nasal em casos de hanseníase e contatos intradomiciliares. Nota-se que há evidências para que a mucosa bucal possa ser um sítio de infecção primária à hanseníase.

- Apesar de baixa positividade para o anti PGL-1, pode-se recomendar também sua utilização conjuntamente à qPCR pois houveram casos de complementação entre os resultados.

- É necessário o aprofundamento das pesquisas do palato na região do nervo nasopalatino/forame incisivo para investigação da presença do *M. leprae* para que aprimorem o diagnóstico precoce da infecção subclínica e ampliem as possibilidades de influir no controle endêmico.

REFERÊNCIAS*

1. Vogelsang TM. A serious sentence passed against the discoverer of the leprosy bacillus (Gerhard Armauer Hansen), in 1880. *Med Hist* 1963; **7**: 182-86.
2. Scollard D, Adams L, Gillis T, Krahenbuhl J, Truman R, Williams D. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**(2): 338-81.
3. Bennett BH, Parker DL, Robson M. Leprosy: steps along the journey of eradication. *Public Health Rep* 2008; **123**(2): 198.
4. Opromolla DVA. Noções de hansenologia. *Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato* 2000.
5. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; **35**(4): 365-75.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Guia para o Controle da hanseníase. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2002. p. 89.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Informe da Atenção Básica Nº 42. A responsabilidade da Atenção Básica no diagnóstico precoce da hanseníase. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2007. p. 2.
8. Pontes ARB, Almeida MGC, Xavier MB, Quaresma JAS, Yassui EA. Detecção do DNA de *Mycobacterium leprae* em secreção nasal. *Rev Bras Enferm* 2008; **61**(SPE): 734-7.
9. Rees RJ. Immunological aspects of experimental leprosy in the mouse. *Proc R Soc Med* 1970; **63**(10): 1060-62.
10. Noordeen SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings RC, ed. *Leprosy*. New York: Churchill Livingstone; 1985: 15-30.
11. Girdhar B, Desikan K. A clinical study of the mouth in untreated lepromatous patients. *Lepr Rev* 1979; **50**(1): 25.
12. Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; **36**(3): 373-82.

* Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver), de 2009.

13. Scheepers A. Correlation of oral surface temperatures and the lesions of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1998; **66**: 214-7.
14. Vieira CSCA, Soares MT, Ribeiro CTSX, Silva LFG. Avaliação e controle de contatos faltosos de doentes com hanseníase. *Rev bras enferm* 2008; **61**(spe): 682-8.
15. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *Lancet* 1999; **353**(9153): 655-60.
16. Bardin L. Análise de conteúdo. Lisboa: Edições 70; 1979.
17. Bhatia VN, Shashikala RAO, Saraswathi G. Auramine staining in histopathology sections. *Indian J Lepr* 1987; **59**(4): 386-9.
18. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol* 1981; **147**(3): 728-35.
19. Chanteau S, Cartel J-L, Roux J, Plichart R, Bach M-A. Comparison of synthetic antigens for detecting antibodies to phenolic glycolipid I in patients with leprosy and their household contacts. *J Infect Dis* 1988; **157**(4): 770-6.
20. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan P. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem* 1982; **257**(24): 15072-8.
21. Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina Ribeirão Preto* 1997; **30**: 335-9.
22. Klatser P, Cho S, Brennan P. The contribution of serological tests to leprosy control. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association* 1996; **64**(4 Suppl): S63-6; discussion S6-7.
23. Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 2003; **41**(5): 1991-95.
24. Lobato J, Costa MP, De Melo Reis É, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev* 2011; **82**(4): 389-401.

25. Brett SJ, Payne SN, Gigg J, Burgess P, Gigg R. Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. *Clin Exp Immunol* 1986; **64**(3): 476-83.
26. Lyon S. Estudo comparativo da carga bacilar em casos novos de hanseníase eo resultado do Teste Sorológico MI Flow [Tese]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.
27. Grossi MAF. Estudo das possíveis mudanças na classificação da hanseníase com utilização do teste ML FLOW e suas implicações no tratamento e controle da endemia em Minas Gerais [Tese]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.
28. Bühner-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MA, et al. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Lepr Rev* 2007; **78**(1): 70-9.
29. Goulart IMB, Goulart LR. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res* 2008; **300**(6): 269-90.
30. Martelli CMT, Stefani MMA, Penna GO, Andrade A. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. *Rev Bras Epidemiol* 2002; **5**(3): 273-85.
31. Ayliffe PR. Modern sensitive techniques for the detection of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1992; **60**: 451-64.
32. Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Looker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis* 1990; **162**(1): 193-200.
33. Pattyn SR, Ursi D, Ieven M, Grillone S, Raes V. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993; **61**(3): 389-93.
34. Van Beers SM, Izumi S, Madjid B, Maeda Y, Day R, Klatser PR. An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1994; **62**: 1-9.
35. Rafi A, Donoghue HD, Stanford JL. Application of polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* DNA in specimens from treated leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1995; **63**(1): 42-7.

36. Santos GG, Marcucci G, Guimarães Júnior J, Margarido LC, Lopes LHC. Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em biópsias de mucosa oral por meio da reação em cadeia da polimerase. *An Bras Dermatol* 2007; **82**(3): 245-9.
37. da Silva Martinez T, Nahas AA, Figueira MM, et al. Oral lesion in leprosy: borderline tuberculoid diagnosis based on detection of *Mycobacterium leprae* DNA by qPCR. *Acta Derm Venereol* 2011; **91**(6): 704-7.
38. Martinez T, Figueira M, Costa A, Gonçalves M, Goulart L, Goulart I. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**(11): 1653-8.
39. Costa M. Considerações sobre o envolvimento da cavidade bucal na hanseníase. *Hansenologia Internationalis (Online)* 2008; **33**(1): 41-4.
40. World Health Organization. World health statistics 2013. 2013. p. 167.
41. Brasil. Ministério da Saúde. Hanseníase no Brasil. Dados e Indicadores Seleccionados. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. p. 66.
42. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores seleccionados na última década e desafios para eliminação. 2013. p. 12.
43. Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. Aspectos epidemiológicos da hanseníase – 2010 (Dados preliminares). Florianópolis; 2010. p. 1-4.
44. World Health Organization. Global leprosy situation, 2010. *Wkly Epidemiol Rec* 2010; **85**(35): 337-48.
45. World Health Organization. Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities: Plan Period 2006-2010: World Health Organization; 2005.
46. Campos NS. Evolução rara de dois casos de lepra na infância. *Lepra tuberculoide reaccional*—*Rev Bras de Leprologia S Paulo*, 1939 1938; **7**(4): 395-403.
47. Opromolla DV, Nobrega RC, Gonçalves NNS, Padovani SHP, Padovani CR, Gonçalves A. Estimativa da prevalência da hanseníase pela investigação em demanda inespecífica de agências de saúde. *Rev Saude Publica* 1990; **24**(3): 178-85.

48. Ignotti E, Rodrigues AM, Andrade VLG, Valente JG. Aplicação de métodos de estimativa da prevalência de hanseníase no Estado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2004; **7**(2): 155-66.
49. Evangelista CMN. Fatores sócio-econômicos e ambientais relacionados à hanseníase no Estado do Ceará. [Dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2004.
50. Pereira AJ, Helene LMF, Pedrazini ES, Martins CL, Vieira CSdCA. Atenção básica de saúde e a assistência em Hanseníase em serviços de saúde de um município do Estado de São Paulo. *Rev Bras Enferm* 2008; **61**: 716-25.
51. World Health Organization. The final push towards elimination of leprosy: strategic plan 2000-2005: World Health Organization; 2000.
52. Brasil. Ministério da Saúde. Controle da Hanseníase na Atenção Básica. Guia Prático para Profissionais da Equipe de Saúde da Família. Brasília: Ministério da Saúde; 2001. p. 86.
53. World Health Organization. A guide to eliminating leprosy as a public health problem. 14 ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000. p. 40.
54. Norman G, Joseph G, Richard J. Validity of the WHO operational classification and value of other clinical signs in the classification of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2004; **72**(3): 278-83.
55. Ministério da Saúde. Serviço Nacional de Lepra - Brasil. Manual de Leprologia: Revista dos Tribunais; 1960.
56. Ferreira S. Determinantes de casos de recidiva em Hanseníase no Estado de Mato Grosso-Brasil [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2010.
57. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet* 2004; **363**: 1209-19.
58. López-Antuñano FJ. Diagnóstico y tratamiento de la lepra. *Salud Publica Mex* 1998; **40**(1): 66-75.
59. Somoskövi Á, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons From a Proficiency Testing Event for Acid-Fast Microscopy*. *Chest* 2001; **120**(1): 250-57.

60. Opromolla DVA. Ação terapeutica das drogas anti hansenicas e evidencias de persistencia microbiana nos casos paucibalilares (Editorial). *Hansen int* 2004; **29**(1): 1-3.
61. Barreto JA, Nogueira MES, Diorio SM, Bühner-Sékula S. Sorologia rápida para hanseníase (teste ML Flow) em pacientes dimorfos classificados como paucibacilares pelo número de lesões cutâneas: uma ferramenta útil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; **41**(Suplemento II): 45-7.
62. Martinez AN, Britto CF, Nery JA, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(9): 3154-9.
63. Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, et al. LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; **54**(2): 263-70.
64. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2009; **47**(7): 2124-30.
65. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; **2**(11): e328.
66. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *International journal leprosy other mycobacterial diseases* 2001; **69**: 1-12.
67. Kumar B, Kaur I, Dogra S, Kumaran MS. Pure neuritic leprosy in India: an appraisal. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2004; **72**(3): 284-90.
68. Jardim MR, Antunes SL, Santos AR, et al. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol* 2003; **250**(7): 806-9.
69. Sabin T, Hackett E, Brand P. Temperatures along the course of certain nerves often affected in lepromatous leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1974; **42**: 38-42.
70. Muir R, Anderson JR. Textbook of Pathology. 10 ed: English language book society; 1976.

71. Brand P. Temperature variation and leprosy deformity. *Int J Lepr* 1959; **27**(1): 1-7.
72. Hastings R, Brand P, Mansfield R, Ebner J. Bacterial density in the skin in lepromatous leprosy as related to temperature. *Lepr Rev* 1968; **39**(2): 71-4.
73. Shepard CC. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *J Bacteriol* 1965; **90**(5): 1271-5.
74. Abbot NC, Beck JS, Samson PD, Butlin CR, Bennett PJ, Grange JM. Cold fingers in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1992; **60**: 580-6.
75. Scheepers A, Lemmer J, Lownie J. Oral manifestations of leprosy. *Lepr Rev* 1993; **64**(1): 37-43.
76. Meyers W, Gormus B, Walsh G. Experimental leprosy. In: Hastings R, ed. *Leprosy*. 2 ed: Singapore: Churchill-Livingstone; 1994: 391-2.
77. Pfaltzgraff R, Ramu G. Clinical leprosy. In: Hastings R, ed. *Leprosy*. 2 ed: Singapore: Churchill-Livingstone; 1994: 268-70.
78. Maeda T, Stoltze K, User A, Kroone H, Brill N, Tryde G. Oral temperatures in young and old people. *J Oral Rehabil* 1979; **6**(2): 159-66.
79. Ochandiano S, Acero J, Concejo C, Escrig M, Fernandez J, Garcia-Lechuz J. Lesiones orales en la lepra lepromatosa. Presentacion de un caso y revision de la literatura. *Med Oral* 2000; **5**: 316-23.
80. Rendall J, McDougall A, Willis L. Intra-oral temperatures in man with special reference to involvement of the central incisors and premaxillary alveolar process in lepromatous leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1976; **44**(4): 462-8.
81. Bucci Jr F, Mesa M, Schwartz R, McNeil G, Lambert W. Oral lesions in lepromatous leprosy. *J Oral Med* 1987; **42**(1): 4.
82. Ridley DS. *Pathogenesis of leprosy and related diseases*: Butterworth Scientific Ltd; 1988.
83. Motta ACF, Komesu MC, Silva CHL, et al. Leprosy-specific oral lesions: A report of three cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; **13**(8): 479-82.

84. Pavankumar K, Sholapurkar A, Joshi V. Surgical Management Of Nasopalatine Duct Cyst: case report *Rev Clín Pesq Odontol* 2010; **6**(1): 81-6.
85. Thakur AR, Burde K, Guttal K, Naikmasur VG. Anatomy and morphology of the nasopalatine canal using cone-beam computed tomography. *Imaging Sci Dent* 2013; **43**(4): 273-81.
86. Prendergast PM. Neurologic Anatomy of the Nose. *Advanced Aesthetic Rhinoplasty*: Springer; 2013: 17-23.
87. Núñez-Martí J, Bagán J, Scully C, Peñarrocha M. Leprosy: dental and periodontal status of the anterior maxilla in 76 patients. *Oral Dis* 2004; **10**(1): 19-21.
88. Taheri JB, Mortazavi H, Moshfeghi M, et al. Oro-facial manifestations of 100 leprosy patients. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 2012; **17**(5): e728.
89. Scollard DM, Skinsnes OK. Oropharyngeal leprosy in art, history, and medicine. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1999; **87**(4): 463-70.
90. Reichart P, Ananatsan T, Reznik G. Gingiva and Periodontium in Lepromatous Leprosy: A Clinical, Radiological, and Microscopical Study. *J Periodontol* 1976; **47**(8): 455-60.
91. Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, et al. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. *Lepr Rev* 2006; **77**(1): 48-61.
92. Ximenes RAA, Gallo MEN, Brito MFM. Retreatment in leprosy: a case-control study. *Rev Saude Publica* 2007; **41**(4): 632-7.
93. Silva E, Iyer A, Ura S, et al. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. *Trop Med Int Health* 2007; **12**(12): 1450-8.
94. Ministério da Saúde. Portaria conjunta nº 125, de 26 de março de 2009. Define ações de controle da hanseníase. 2009.
95. da Costa APF, da Costa Nery JA, de Oliveira MLW-d, Cuzzi T, Ramos-e-Silva M. Oral lesions in leprosy. *Indian Journal of Dermatology, Venereology & Leprology* 2003; **69**(6).

96. Abreu MAMMd, Michalany NS, Weckx LLM, Neto Pimentel DR, Hirata CHW, Alchorne MMdA. The oral mucosa in leprosy: a clinical and histopathological study. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2006; **72**(3): 312-6.
97. Mukherjee A, Girdhar B, Desikan K. The histopathology of tongue lesions in leprosy. *Lepr Rev* 1979; **50**(1): 37.
98. Hubscher S, Girdhar B, Desikan K. Discharge of Mycobacterium leprae from the mouth in lepromatous leprosy patients. *Lepr Rev* 1979; **50**(1): 45-50.
99. Brasil J, Opromolla D, Freitas J, Rossi J. Histologic and bacteriologic study of lepromatous lesions of the oral mucosa. *Estomatol Cult* 1973; **7**(2): 113.
100. Pellegrino D, Opromola D, de Campos I. Leprotic lesions in the oral cavity--their importance in prevention. *Estomatol Cult* 1970; **4**(2): 123.
101. Desikan K. Viability of Mycobacterium leprae outside the human body. *Lepr Rev* 1977; **48**(4): 231.
102. Cree I, Smith W. Leprosy transmission and mucosal immunity: towards eradication? *Lepr Rev* 1998; **69**(2): 112-21.
103. Pallagatti S, Sheikh S, Kaur A, Aggarwal A, Singh R. Oral cavity and leprosy. *Indian dermatology online journal* 2012; **3**(2): 101-4.
104. Sampaio S, Rivitti E. Dermatologia. Artes Médicas. São Paulo; 1998. p. 467-87.
105. Kumar B, Yande R, Kaur I, Mann S, Kaur S. Involvement of palate and cheek in leprosy. *Indian J Lepr* 1988; **60**(2): 280-4.
106. Sharma VK, Kaur S, Radotra BD, Kaur I. Tongue involvement in lepromatous leprosy. *Int J Dermatol* 1993; **32**(1): 27-9.
107. Soni N. Leprosy of the tongue. *Indian J Lepr* 1991; **64**(3): 325-30.
108. Palaskar S. Histopathological study of apparently normal oral mucosa in lepromatous leprosy. *Indian journal of dental research: official publication of Indian Society for Dental Research* 2004; **16**(1): 12-4.

109. Brasil J, de Araujo Opromolla DV, de Souza-Freitas JA, Fleury RN. Pathological alterations in oral mucosa of lepromatous patients. *Estomatol Cult* 1974; **8**(1): 137-52.
110. Lighterman I, Watanabe Y, Hidaka T. Leprosy of the oral cavity and adnexa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1962; **15**(10): 1178-94.
111. Scheepers A, Lemmer J. Erythema nodosum leprosum: a possible cause of oral destruction in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1992; **60**: 641-.
112. Topazian RG, Goldberg MH, Hupp JR. Oral and maxillofacial infections. 4^a ed: Elsevier Health Sciences; 2002.
113. Puy CL. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; **11**: E449-55.
114. Höfling JF, Gonçalves RB. Imunologia para odontologia: Artmed.; 2006.
115. Martinez KdO, Mendes LL, Alves JB. Secretory A immunoglobulin, total proteins and salivary flow in Recurrent Aphthous Ulceration. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2007; **73**(3): 323-8.
116. Foschi F, Izard J, Sasaki H, et al. Treponema denticola in disseminating endodontic infections. *J Dent Res* 2006; **85**(8): 761-5.
117. Chanteau S, Glaziou P, Plichart C, et al. Low predictive value of PGL-I serology for the early diagnosis of leprosy in family contacts: results of a 10-year prospective field study in French Polynesia. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993; **61**(4): 533-41.
118. Wu Q, Li X, Yin Y, et al. A study on the methods for early serological diagnosis of leprosy and their potential use. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1999; **67**(3): 302-5.
119. Buhrer-Sekula S, Sarno EN, Oskam L, et al. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2000; **68**(4): 456-63.
120. Beyene D, Aseffa A, Harboe M, et al. Nasal carriage of Mycobacterium leprae DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. *Epidemiol Infect* 2003; **131**(02): 841-8.
121. Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, et al. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of Mycobacterium

leprae in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev* 2003; **74**(1): 18-30.

122. Bang PD, Suzuki K, Phuong LT, Chu TM, Ishii N, Khang TH. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *The Journal of dermatology* 2009; **36**(5): 269-76.

123. Frota CC, Freitas MV, Foss NT, et al. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; **104**(7): 490-5.

124. Douglas J, Cellona R, Fajardo T, Abalos R, Balagon M, Klatser P. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**(5): 897-900.

125. Cruz RCdS, Cunha MdGS, Vásquez FG. Prevalência de anticorpo anti pgl-1 em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase. *Cadernos de Saúde Coletiva* 2009; **17**(1): 261-71.

126. Brasil MTL, Oliveira LRd, Rímoli NS, et al. Sorologia Anti PGL-1 e risco de ocorrência de hanseníase em área de alta endemicidade do Estado de São Paulo: quatro anos de seguimento. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2003; **6**(3): 262-71.

127. Christensen V, Bakke S, Melson R, Waaler E. Changes in the anterior nasal spine and the alveolar process of the maxillary bone in leprosy. *Int J Lepr* 1952; **20**(3): 335-40.

128. Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriawipart S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1998; **66**(1): 16-21.

129. Job CK, Jayakumar J, Williams DL, Gillis TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1997; **65**: 461-4.

130. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; **5**(10): e1354.

131. Patrocínio LG, Goulart IMB, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; **44**(3): 311-6.

132. Vasconcelos R, Aguiar M, Castro W, Araújo VC, Mesquita R. Retrospective analysis of 31 cases of nasopalatine duct cyst. *Oral Dis* 1999; **5**(4): 325-8.
133. Brito e Cabral P, Junior JE, de Macedo AC, et al. Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy. *Int J Infect Dis* 2013; **17**(11): e1005-10.
134. Martins AC, Miranda A, Oliveira ML, Buhner-Sekula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010; **76**(5): 579-87.
135. Lastória JC, Abreu M. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. *Sociedade Brasileira de Dermatologia* 2012; **17**(4): 173-9.

Anexo 1

- Grupo G1			Total
Sexo	Feminino	34 (44%)	78 (100%)
	Masculino	44 (56%)	
Idade	0 a 15 (incl.)	6 (8%)	78 (100%)
	16 a 30 (incl.)	7 (9%)	
	31 a 45 (incl.)	20 (26%)	
	46 a 60 (incl.)	35 (45%)	
	> ou igual a 61	10 (13%)	
Qual o curso mais elevado que o(a) senhor(a) concluiu?	Alfabetização	3 (4%)	78 (100%)
	Fundamental incompleto	49 (63%)	
	Fundamental completo	2 (3%)	
	Ensino Médio incompleto	8 (10%)	
	Ensino Médio completo	5 (6%)	
	Universidade concluída	0 (0%)	
	Pós-graduação concluída	0 (0%)	
	Analfabeto	4 (5%)	
	Não se aplica	7 (9%)	
A renda familiar é aproximadamente:	Não sabe informar	0 (0%)	78 (100%)
	Menos que um salário mínimo	5 (6%)	
	De 1 a 2 salários (inclusive)	37 (47%)	
	De 2 a 4 salários (inclusive)	19 (24%)	
	De 4 a 6 salários (inclusive)	12 (15%)	
	Mais que 6 salários	5 (6%)	
	Não tem renda	0 (0%)	
Qual a situação do local onde você mora?	Não sabe informar	0 (0%)	78 (100%)
	Alugado	11 (14%)	
	Casa própria	59 (76%)	
	Abrigo	0 (0%)	
	Sem teto	0 (0%)	
	Cedida	8 (10%)	
O esgoto da sua casa é tipo:	Não sabe informar	0 (0%)	78 (100%)
	Fossa	66 (85%)	
	Céu aberto	2 (3%)	
	Rede pública	9 (12%)	
A casa do(a) senhor(a) tem quantos cômodos (considerar apenas quarto e sala):	Não sabe informar	1 (1%)	78 (100%)
	Um	5 (6%)	
	Dois	7 (9%)	
	Três	35 (45%)	
	Quatro	24 (31%)	
Convívio fora da residência com alguém com Hanseníase nos últimos 10 anos:	Cinco	7 (9%)	32 (100%)
	Filho(a)	0 (0%)	
	Esposo (a)	1 (3%)	
	Irmão (ã)	7 (22%)	
	Avô (ó)	1 (3%)	
	Tio(a)	0 (0%)	
	Pai	3 (9%)	
	Mãe	2 (6%)	
	Cunhado(a)	3 (9%)	
	Outro	14 (44%)	

	Não se aplica			0 (0%)	
	Não sabe informar			1 (3%)	
	Sim	Não	NA	NSI	Total
Nos últimos 10 anos conviveu com alguém fora da sua casa com a mesma doença?	32 (41%)	44 (56%)		2 (3%)	78 (100%)
Nos últimos 10 anos já morou em outro endereço que não o atual?	46 (59%)	31 (40%)	1 (1%)	0 (0%)	78 (100%)
Em Tangará da Serra - MT?	54 (69%)	21 (27%)	3 (4%)	0 (0%)	78 (100%)
Em outra cidade?	29 (37%)	44 (56%)	5 (6%)	0 (0%)	78 (100%)
Sua residência tem água encanada:	67 (86%)	11 (14%)		0 (0%)	78 (100%)
Na sua residência alguém teve ou tem a mesma doença que o (a) senhor(a)?	23 (29%)	51 (65%)		4 (5%)	78 (100%)

NA = Não se aplica
NSI = Não sabe informar

		Total
Há quanto tempo notou o aparecimento dos primeiros sinais ou sintomas (manchas, caroços, dormência, obstrução nasal)?	0 a 6 meses (incl.)	30 (38%)
	6 a 12 meses (incl.)	18 (23%)
	1 a 5 anos	21 (27%)
	maior que 5 anos	8 (10%)
	Não sabe informar	1 (1%)
Número de lesões de pele:	Um	12 (15%)
	Dois	7 (9%)
	Três	4 (5%)
	Quatro	3 (4%)
	Cinco	5 (6%)
	Mais que cinco	23 (29%)
	Infiltrações e sem lesão	24 (31%)
Classificação Operacional:	PB	33 (42%)
	MB	45 (58%)
	Não realizado	0 (0%)
Classificação Clínica:	Indeterminada	6 (8%)
	Neural primária	16 (21%)
	TT	12 (15%)
	BT	9 (12%)
	BB	23 (29%)
	BV	3 (4%)
	VV	9 (12%)

Anexo 2

- Grupo G2

			Total
Sexo	Feminino	34 (63%)	54 (100%)
	Masculino	20 (37%)	
Idade	0 a 15 (incl.)	16 (30%)	54 (100%)
	16 a 30 (incl.)	15 (28%)	
	31 a 45 (incl.)	13 (24%)	
	46 a 60 (incl.)	6 (11%)	
	> ou igual a 61	4 (7%)	
Qual o curso mais elevado que o(a) senhor(a) concluiu?	Alfabetização	2 (4%)	54 (100%)
	Fundamental incompleto	13 (24%)	
	Fundamental completo	1 (2%)	
	Ensino Médio incompleto	4 (7%)	
	Ensino Médio completo	13 (24%)	
	Universidade concluída	2 (4%)	
	Pós-graduação concluída	0 (0%)	
	Analfabeto	2 (4%)	
	Não se aplica	17 (31%)	
A renda familiar é aproximadamente:	Não sabe informar	0 (0%)	54 (100%)
	Menos que um salário mínimo	2 (4%)	
	De 1 a 2 salários (inclusive)	14 (26%)	
	De 2 a 4 salários (inclusive)	15 (28%)	
	De 4 a 6 salários (inclusive)	16 (30%)	
	Mais que 6 salários	7 (13%)	
	Não tem renda	0 (0%)	
Qual a situação do local onde você mora?	Não sabe informar	0 (0%)	54 (100%)
	Alugado	4 (7%)	
	Casa própria	45 (83%)	
	Abrigo	0 (0%)	
	Sem teto	0 (0%)	
	Cedida	5 (9%)	
Sua residência tem água encanada:	Não sabe informar	0 (0%)	54 (100%)
	Sim	52 (96%)	
	Não	2 (4%)	
O esgoto da sua casa é tipo:	Não sabe informar	0 (0%)	54 (100%)
	Fossa	46 (85%)	
	Céu aberto	1 (2%)	
	Rede pública	7 (13%)	
	Não sabe informar	0 (0%)	

			Total
A casa do(a) senhor(a) tem quantos cômodos (considerar apenas quarto e sala):	Um	2 (4%)	54 (100%)
	Dois	3 (6%)	
	Três	23 (43%)	
	Quatro	11 (20%)	
	Cinco	12 (22%)	
	Seis	1 (2%)	
	Sete	0 (0%)	
	Oito	2 (4%)	
Grau de parentesco com o caso índice:	Filho(a)	20 (37%)	54 (100%)
	Esposo (a)	15 (28%)	
	Irmão (ã)	4 (7%)	
	Avô (ó)	2 (4%)	
	Tio(a)	3 (6%)	
	Pai	0 (0%)	
	Mãe	2 (4%)	
	Cunhado(a)	1 (2%)	
Quantas pessoas moram no seu endereço atual?	Outro	7 (13%)	54 (100%)
	Um	1 (2%)	
	Dois	6 (11%)	
	Três	13 (24%)	
	Quatro	15 (28%)	
	Cinco	12 (22%)	
	Seis	6 (11%)	
	Sete	1 (2%)	
Já morou com outras pessoas com esta doença?	Sim	18 (33%)	54 (100%)
	Não	36 (67%)	
	Não se aplica	0 (0%)	
	Não sabe informar	0 (0%)	
Há quanto tempo mora ou morou com paciente com hanseníase ?	Até 1 ano (incl.)	7 (13%)	54 (100%)
	2 a 5 anos (incl.)	5 (9%)	
	6 a 10 anos (incl.)	13 (24%)	
	mais de 10 anos	26 (48%)	
	Não se aplica	3 (6%)	
	Não sabe informar	0 (0%)	
Já teve hanseníase no passado?	Sim	6 (11%)	54 (100%)
	Não	48 (89%)	