



**renorbio**  
rede nordeste de biotecnologia

## **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**Polimorfismo do gene *MBL2* em pacientes e contatos intradomiciliares de hanseníase e sua associação com classe operacional, formas clínicas e Anti-PGL1 em áreas de risco no município do Recife-PE.**

**Jacyra Salucy Antunes Ferreira**

Recife – PE

2014

**Jacyra Salucy Antunes Ferreira**

**Polimorfismo do gene *MBL2* em pacientes e contatos intradomiciliares de hanseníase e sua associação com classe operacional, formas clínicas e Anti-PGL1 em áreas de risco no município do Recife-PE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia área de concentração Biotecnologia da Saúde

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcante

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Patricia Moura

**Recife, 2014**

Ficha catalográfica

F383p Ferreira, Jacyra Salucy Antunes  
Polimorfismo do gene *MBL2* em pacientes e contatos intradomiciliares de hanseníase e sua associação com classe operacional, formas clínicas e anti-PGL1 em áreas de risco no município do Recife-PE / Jacyra Salucy Antunes Ferreira. -- 2014.  
130 f.: il.

Orientadora: Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti.  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).  
Ponto focal em Pernambuco - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.  
Inclui referência, apêndice(s) e anexo(s).

1. Hanseníase 2. Condição de vida 3. Anti PGL-1  
4. Polimorfismo do gene *MBL2* I. Cavalcante, Maria do Socorro de Mendonça, orientadora II. Título

CDD 620.8

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**JACYRA SALUCY ANTUNES FERREIRA**

**Polimorfismo do gene *MBL2* em pacientes e contatos intradomiciliares de hanseníase e sua associação com classe operacional, formas clínicas e Anti-PGL1 em áreas de risco no município do Recife-PE.**

Tese aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Renorbio como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia área de concentração Biotecnologia da Saúde

Recife, maio de 2014.

**Presidente:** Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

Membro: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Membro: Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Membro: Neide Santos

Membro: Marcia Almeida Galvão Teixeira

## DEDICATÓRIA

A meus Pais pelo exemplo de vida, dedicação,  
apoio, participação, ensinamentos e  
oportunidades a mim garantidas em todas as  
etapas de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas que convivemos no nosso dia-a-dia e que nos deixam momentos importantes que temos que agradecer, porém existem aqueles que fazem a diferença em nossa vida. O que dizer da família, meus pais - Carlos Lopes Ferreira e Rosete Antunes Ferreira, que sempre me serviram de exemplo proporcionaram a formação que tenho hoje; minhas irmãs (Alandemar, Jussara e Zoraya), sobrinhos (são tantos que não dá para listar), me apoiaram, incentivaram e compartilharam comigo todos os momentos, além do meu filho - Alexandre Vitor e Marido - Jorge Lima que acompanharam muito de perto todos os passos, conviveram e suportaram meu stress e ausências. Os amigos que embora distantes sempre estiveram presentes – Maria Luiza, Nara Pedrosa, Nancy Sena, Inês Costa, Andreina Britto, Cristina Bongim, Mirella Rodrigues e Gabriela Moraes e aqueles que no momento estiveram muito próximo – Ana Lucia, Rosario Antunes, Izabel Avelar, Marluce Arantes, Ernani Martins, Roseane Almeida, que sempre apoiaram, fomentaram, colaboraram nas dúvidas e entenderam minhas ausências ao trabalho. As novas amigas conquistadas no curso deste doutorado – Lidiane Regia e Maria Helena Mariano com as quais compartilhei estudo, discussões, risos e desespero e uma pessoa muito especial que acreditou em mim e no projeto desde o primeiro momento de construção do mesmo- Zulma Medeiros a quem devo o início de tudo. As orientadoras Maria do Socorro de Mendonça Cavalcante e Patricia Muniz (e o apoio de Luydson Richardson) pela dedicação, paciência, e presteza e sem os quais este trabalho não teria sido realizado. As alunas do Curso de Enfermagem da UPE que compartilharam comigo a árdua atividade de coletar material para este trabalho (Yane Ferreira, Juliana Duque, Pâmella Thayryne, Rebeca dos Santos, Carmem Lucia, Jaqueline Soares) e a equipe do Laboratório – Carla Mola, Taciana Mendonça, Marcus

Tulio, Rodrigo do Carmo e Kleyton Palmeiras pelo apoio incondicional nas atividades do laboratório. A *Netherlands Leprosy Relief* - NLR e CNPq pelo apoio financeiro a este projeto. Aos profissionais das unidades de saúde da Secretaria de Saúde do Recife que nos receberam com atenção e dedicação e especialmente aos pacientes e seus familiares pela atenção e confiança que nos receberam em suas casas.

À DEUS por ter me oportunizado conviver com vocês (e mais tantas outras pessoas aqui não citadas) fazendo parte da minha história de vida.

## RESUMO

Ferreira, JSA (2014). Polimorfismo do gene *MBL2* em pacientes e contatos intradomiciliares de hanseníase e sua associação com classe operacional, formas clínicas e Anti-PGL1 em áreas de risco no município do Recife-PE.

Apesar das transformações econômicas e sociais, a hanseníase persiste como um problema de saúde pública. Pernambuco apresenta 60% dos casos concentrado na região metropolitana e o Recife é responsável por 30% dos casos do estado sendo considerado prioritário para o controle da hanseníase. Sua distribuição espacial com identificação de grupos de risco e o estudo de novas tecnologias que colaborem no diagnóstico e tratamento dos casos são importantes para auxiliar no planejamento, implementação e monitoramento de ações de prevenção e controle dessa doença. A utilização de marcadores sorológicos e moleculares surge como uma opção que podem auxiliar na elaboração de futuras estratégias de quimioprofilaxia de contactantes, como medidas de controle da doença. Estudos genéticos sugerem que variações na susceptibilidade dos seres humanos a hanseníase envolvem características complexas de vários alelos polimórficos e o polimorfismo do gene da lectina ligadora de manose (*MBL2*) tem sido associado à proteção para forma lepromatosa da hanseníase. A presente pesquisa teve como objetivo verificar a associação do polimorfismo do gene *MBL2* com classe operacional e formas clínicas da Hanseníase e a sorologia anti-PGL-1 em contatos intradomiciliares nas áreas de maior risco no município Recife no período de 2006 a 2013. A construção do Indicador de Carência Social (ICS) foi realizada a partir de dados do censo demográfico de 2010. Para detecção do anti-PGL-1 nos contatos utilizou-se o teste ML Flow desenvolvido no Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG). A genotipagem da região promotora do gene *MBL2* foi realizada pelo sistema de sondas fluorescentes Taqman através da tecnologia de PCR em tempo real. A comparação do Indicador de Carência Social com o coeficiente de detecção da hanseníase mostrou existir uma relação direta entre eles. O coeficiente de correlação de Spearman apresentou-se positiva, porém fraca, provavelmente devido à composição heterogênea da cidade. A soroprevalência do anti-PGL 1 foi de 36,80% sendo maior nos contatos do sexo feminino, na faixa etária de maiores de 15 anos e em contatos de pacientes multibacilares. Na análise univariada o alelo O e o genótipo OO foram associados a classificação operacional Paucibacilar, no sexo masculino e com mais de 40 anos ( $p = 0,034$  e  $0,003$ , respectivamente). Na análise multivariada o genótipo OO também foi associado a Paucibacilar ( $p = 0,023$ ). O alelo O e os haplótipos HYO e LYO foram associadas à sorologia positiva para anti-PGL-1 ( $p = 0,046$  e  $0,032$ ). Portanto, os polimorfismos do gene *MBL2* podem influenciar no desenvolvimento das formas clínicas mais graves da hanseníase com baixa ativação do complemento, assim como na modulação de anti-PGL-1.

Palavras chave: hanseníase, condição de vida, anti PGL-1, polimorfismo do gene *MBL2*

## ABSTRACT

Ferreira, JSA (2014). *MBL2* gene polymorphism in patients and household contacts of leprosy and its association with operational class, clinical forms and Anti - PGL1 in risk areas in Recife -PE.

Despite the economic and social transformations, leprosy remains a public health problem. Pernambuco has 60 % of cases concentrated in the Recife metropolitan area and is responsible for 30% of the cases in the state, being considered a priority for leprosy control. The spatial distribution and identification of risk groups and the study of new technologies which may collaborate in the diagnosis and treatment of the cases is important to assist in the planning, implementation and monitoring of prevention and control measures of this disease. The use of serological and molecular markers appears as an option that can help to develop future strategies for contacting chemoprophylaxis, as measures of disease control. Genetic studies suggest that variations in the susceptibility of humans to leprosy involve complex characteristics of various polymorphic alleles, moreover the polymorphism of the mannose binding lectin (*MBL2*) gene have been associated with the protection against lepromatous leprosy. The present study aimed to investigate the association of polymorphism of *MBL2* gene with operating class and clinical forms of leprosy and anti - PGL - 1 serology in household contacts in the highest risk areas in the city Recife in the period 2006-2013. The construction of the Social Need Indicator (ICS) was performed using data from the 2010 demographic census. For the detection of anti- PGL – 1 in the contacts, the ML Flow test was used. This test was developed in the Laboratory of Immunology of AIDS and Leprosy Institute of Tropical Pathology and Public Health (IPTSP) at the Federal University of Goiás (UFG). Genotyping of the promoting region was performed using Taqman fluorescent probes by PCR technology in real time. The comparison of the Social Need indicator with the detection rate of leprosy showed a direct relationship between them. The Spearman correlation coefficient was positive, but weak, probably due to the heterogeneous composition of the city. The seroprevalence of anti -PGL- 1 was 36.80 % being greater in female contacts, aged over 15, and in contacts of multibacillary patients *MBL2* structural variant allele O and genotype OO were associated to PB in univariate ( $p= 0.034$  and  $0.003$ ) in man and cases older than 40 years; and in multivariate analysis the genotype OO also was independently associated to PB ( $p= 0.023$ ). Interestingly, the O allele and HYO and LYO haplotype were associated to IgM anti-PGL-1 positive serology ( $p= 0.046$  and  $0.032$ ). *MBL2* polymorphism may influence leprosy development by an inefficient modulation of anti-PGL-1 response and low complement activation.

Keywords : leprosy , living conditions , anti PGL -1 gene polymorphism of *MBL2*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Pag.
Figura 1	Classificação da hanseníase segundo Ridley e Jopling	21
Figura 2	Forma clínica da hanseníase	22
Figura 3	Prevalência da hanseníase no mundo 2011	26
Figura 4	Prevalência da Hanseníase segundo unidades da federação, Brasil, 2010	27
Figura 5	Estrutura esquemática da parede do <i>M. leprae</i>	33
Figura 6	Resultado do teste ML Flow em contatos intradomiciliares de hanseníase	34
Figura 7	Estrutura da MBL	36
Figura 8	Funções da MBL	37
Figura 9	Polimorfismo da região promotora e do exon 1 do gene <i>MBL-2</i>	39
Figura 10	Fluxograma do delineamento da pesquisa	49
	<b>Artigo 1</b>	
Gráfico 1	Descrição dos casos de hanseníase em Recife no período de 2006-2010.	71
Figura 1	Estratos de risco para hanseníase em Recife segundo coeficiente de detecção por 100.000 hab. e Índice de Carença Social	73

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

		Pag,
Quadro 1	Esquema de tratamento da hanseníase segundo classificação operacional	24
Quadro 2	Distribuição dos bairros do Recife por Distrito Sanitário	44
	<b>Artigo 1</b>	
Tabela 1	Descrição dos casos de hanseníase em Recife no período de 2006-2010.	72
Tabela 2	Medida de correlação e função de regressão linear entre o coeficiente de detecção de hanseníase (por 100.000 hab) no período de 2006-2010 e Índice de Carencia Social	74
	<b>Artigo 2</b>	
Table 1	General Characteristics of the household contacts of leprosy patients undergoing ML Flow test. Recife, 2006-2013.	90
Table 2	Description of seropositivity of the ML Flow test in the household contacts of leprosy cases. Recife, 2006-2013.	91
	<b>Artigo 3</b>	
Table 1	Distribution of leprosy patients according to the clinical forms of the disease, operating class, gender, age and structural variants of <i>MBL2</i> gene.	117
Table 2	Allelic and genotypic frequencies analysis of promoter and exon 1 SNPs of the <i>MBL2</i> and gender and age variables in relation to patients with leprosy divided by multibacillary (MB) and paucibacillary (PB) operational class.	118
Table 3	Results of binary logistic regression and entered variables that independently sustained associated to the risk for MB leprosy.	119
Table 4	Allelic, genotype and haplotype frequencies of <i>MBL 2</i> SNPs at promoter and exon 1 regions on the cases' contacts agrouped by gender and age and its association with in IgM anti-PGL-1 serology.	120

## LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-Pgl 1	Glicolípido fenólico
BB	Boderline Boderline
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i> – vacina contra tuberculose
BL	Boderline Lepromatosa
BT	Boderline Tuberculoide
D	Dimorfa
DAMP <sub>s</sub>	Padrão Molecular Associado ao Dano
d.c	Depois de cristo
DRC	Dominio de Reconhecimento do Carboidrato
Hab.	Habitantes
I	Indeterminada
IB	Índice Baciloscópico
IE	Índice de exclusão
IFN $\gamma$	Interferon Gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IGM	Imunoglobulina Globulina M
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomanana
LL	Lepromatosa Lepromatsa
<i>M. leprae</i>	<i>Micobacterium leprae</i>
MB	Multibacilar
MBL	Lectina Ligadora de Manose
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP <sub>s</sub>	Padrão Molecular Associados a Patógeno
PB	Paucibacilar
PGL 1	Glicolípido Fenólico 1
PQT	Poliquimioterapia
RMR	Região Metropolitana do Recife
RNI	Reativos Intermediário de Nitrogênio

ROI	Reativos Intermediário de Oxigênio
SIG	Sistema de Informação Geográfica
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Tuberculoide
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TLR2	Toll-like 2
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TT	Tuberculoide Tuberculoide
V	Virchowiana

## SUMÁRIO

	Pág
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Hanseníase	17
2.2 Hanseníase e sua relação com condição de vida	26
2.3 Anti PGL-1	32
2.4 Lectina Ligadora de Manose – MBL	36
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Área de estudo	43
4.2 Delineamento da pesquisa	45
4.3 População de estudo e período de referencia	46
4.4 Métodos de análise	47
4.5 Considerações éticas	48
REFERÊNCIAS	50
5. ARTIGOS	58
4.1 Hanseníase: identificação das áreas de maior risco em um município do Nordeste do Brasil	59
4.2 Antipgl 1 serum prevalence in household contact in hansen's diseases cases in risk areas of the municipality of recife- Brazil	75
4.3 <i>MBL2</i> gene variants are associated to paucibacillary leprosy and to IgM anti-pgl-1 positive serology in male household contacts	92
6. CONCLUSÕES	121
7. PERSPECTIVAS	122
ANEXOS	123

## 1. INTRODUÇÃO

O progresso científico e tecnológico, as transformações econômicas e sociais e a influência de novas tecnologias médicas são aspectos importantes na modificação do perfil epidemiológico das doenças transmissíveis. Apesar disso, a infecção pelo *Mycobacterium leprae* continua apresentando-se como um problema de saúde pública<sup>1</sup>.

Dentre os fatores que podem estar contribuindo para permanência desse perfil epidemiológico, as condições sócio-econômicas e culturais vem influenciando na distribuição e propagação da endemia hansênica, apresentando uma estreita relação com as condições precárias de habitação, baixa escolaridade e, ainda, movimentos migratórios que facilitam a difusão da doença. As diferenças na sua prevalência estão presentes entre regiões, estados, microrregiões, municípios e, no caso de grandes cidades, entre espaços intraurbanos, concentrando-se nos locais de maior pobreza<sup>2</sup>. Além disso, outros fatores estão envolvidos na infecção pelo *M. leprae*, sua patogênese e as formas clínicas da hanseníase, a exemplo dos fatores imunológicos e genéticos que surgem como possíveis marcadores para essa doença e seu acompanhamento clínico<sup>3</sup>.

A diferenciação dessas formas clínicas é de grande importância uma vez que define o tratamento dos pacientes a ser utilizado. Hoje, nos serviços de saúde do Brasil, usa-se a classificação operacional de paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) determinada pelo Ministério da Saúde e quando esta é feita de forma inadequada pode levar a tratamentos inapropriados e predispor a reações por tempo indeterminado além da continuidade da transmissão da doença<sup>4</sup>.

Para auxiliar nesse diagnóstico a combinação de critérios clínicos e laboratoriais, a exemplo do teste sorológico ML-Flow e a pesquisa do gene *MBL-2*, podem contribuir

na decisão terapêutica, diferenciação de forma clínica e identificação de grupos de risco ao adoecimento apresentando-se como uma alternativa promissora no controle da hanseníase nos países endêmicos<sup>6,7,8</sup>.

O Estado de Pernambuco, localizado na Região Nordeste do Brasil, é classificado, segundo critérios da Organização Mundial da Saúde - OMS como área de endemicidade muito alta, sendo responsável em 2012, por 8,5% dos casos novos no Brasil, na população geral, e 12% dos casos em menores de 15 anos. Aproximadamente 62% dos casos do estado concentravam-se na Região Metropolitana do Recife (RMR) que, por sua vez, apresentava, em 2012, um coeficiente de detecção geral de 46,63/100.000 hab, sendo classificado, segundo o Ministério da Saúde, como hiperendêmico e prioritário para o controle da hanseníase<sup>8</sup>.

Desta forma, realizar um estudo sobre os aspectos da hanseníase, sua relação com a condição de vida, utilizando recursos laboratoriais para identificação de contatos com possibilidade de desenvolver a doença e investigação da relação da proteína MBL com a suscetibilidade a doença e a formas clínicas mais graves da mesma pode fornecer importantes subsídios para à prevenção, o controle e melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse processo. Como resultado poderíamos ter uma redução nos custos dos programas de saúde, além de uma mudança social, advinda de um melhor controle da doença, apresenta um importante impacto na qualidade de vida da população.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Hanseníase

A hanseníase parece ser uma das mais antigas doenças que acomete o homem. Acredita-se que seja originária da Ásia, porém outros autores apontam a África como berço dessa doença, e discute-se, ainda hoje a sua origem. Segundo um papiro da época de Ramsés II, a doença era conhecida a três ou quatro mil anos antes de Cristo, e já existiam no Egito evidências da doença em esqueletos descobertos neste país datando do segundo século antes de Cristo<sup>1</sup>. Segundo Opromolla, havia referências da existência da hanseníase em muitos outros lugares da terra e que, na realidade, havia traduções equivocadas de termos designando diferentes moléstias<sup>9</sup>.

Por volta do ano de 150 d.C, a doença já era bem conhecida na Grécia, referenciada por Aretaeus e Galeno. Foi designada primeiro de elephas ou elefantíase, que introduziu depois o termo facies leonina para designar o aspecto da face do paciente infiltrada pela doença. A doença foi se disseminando lentamente pela Europa, por meio dos soldados infectados, comerciantes e colonizadores, tendo sua alta incidência durante a Idade Média<sup>3</sup>. Por volta de 1870, o número de casos da doença já declinava na Europa, enquanto se mantinham focos endêmicos na Ásia e África, introduzindo-se, também, no novo mundo, a partir das conquistas espanholas e portuguesas<sup>10</sup>.

Presume-se que, nas Américas, a hanseníase tenha chegado entre os séculos XVI e XVII, com os colonizadores. Nos Estados Unidos foram os franceses, os fundadores do Estado de Louisiana, que trouxeram a doença e, na América do Sul, ela provavelmente veio com os colonizadores espanhóis e portugueses, uma vez que os primeiros doentes de hanseníase foram observados na Colômbia e eram de origem espanhola<sup>1, 11</sup>.

No Brasil, a doença ingressou por vários pontos do litoral, com os primeiros colonizadores portugueses, principalmente açorianos, e os escravos africanos muito contribuíram para sua disseminação. Os primeiros casos da doença foram notificados no ano de 1600 no Rio de Janeiro onde foi criado, anos depois, o primeiro lazareto. Outros focos foram identificados na Bahia e no Pará<sup>12, 13</sup>. Com o desenvolvimento agrícola e a colonização de novas terras a doença migrou para as cidades mais importantes econômica e politicamente (Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro), acompanhando a marcha da colonização, estendendo-se à Paraíba, Alagoas, Ceará, Maranhão, Pará e Amazonas, seja pelo desenvolvimento agrícola ou pela ocupação desses Estados<sup>14</sup>.

O período entre 1912 e 1920 representou uma fase intermediária da história da doença no Brasil, com o reconhecimento do problema pelas autoridades sanitárias. A partir daí, várias ações para conter a doença foram iniciadas, como a criação do Departamento Nacional de Saúde por Carlos Chagas, a implantação da notificação compulsória e o tratamento, com rigor científico, por Maurano<sup>14</sup>.

Hoje, a hanseníase é uma doença de notificação compulsória em todo o território brasileiro, com meta estabelecida de 1 caso para cada 10.000 habitantes para sua eliminação, sendo ainda considerada um importante problema de saúde pública no Brasil e em vários países do mundo. Apesar de todo o empenho para sua eliminação, o Brasil continua sendo o segundo país em número de casos no mundo, mesmo com o declínio das taxas de prevalência, observado nas últimas décadas. O número de casos novos registrados tem-se mantido estável, o que aponta para o surgimento de casos novos nos próximos anos, ressaltando a preocupação com aqueles que não estão sendo diagnosticados nos serviços de saúde. Aproximadamente 80% dos casos estão concentrados em municípios com maior contingente da população do país<sup>15,16</sup>.

A hanseníase, doença infecciosa, de evolução lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae*, um parasita intracelular obrigatório, se manifesta essencialmente, por meio de sinais e sintomas dermatoneurológicos, como lesões de pele e nervos periféricos<sup>11</sup>, sendo transmitida pelas vias aéreas superiores de pessoa a pessoa, mediante convívio de susceptíveis sem tratamento<sup>17</sup>.

O *M. leprae* induz extraordinária resposta imune aos indivíduos acometidos. Trata-se de um bacilo altamente infectante e de baixo poder patogênico, e a maioria da população é naturalmente imune<sup>12</sup>. Após o seu ingresso no organismo, irá se localizar nas células de Schwann e na pele, e sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença, quando o bacilo não encontra resistência a sua multiplicação, podendo se instalar nos linfonodos, olhos, testículos e no fígado<sup>16</sup>.

Essa doença é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro, fatores ambientais, como estado nutricional, vacinação BCG e exposição ao bacilo ou a outras micobactérias, sendo a resposta imune fundamental para a defesa do organismo. A alteração da resposta imune está associada ao desenvolvimento das formas clínicas da doença, podendo haver um predomínio da resposta celular na forma clínica mais branda (tuberculoide) e uma ausência de resposta celular na forma mais grave da doença (virchowiana)<sup>18</sup>.

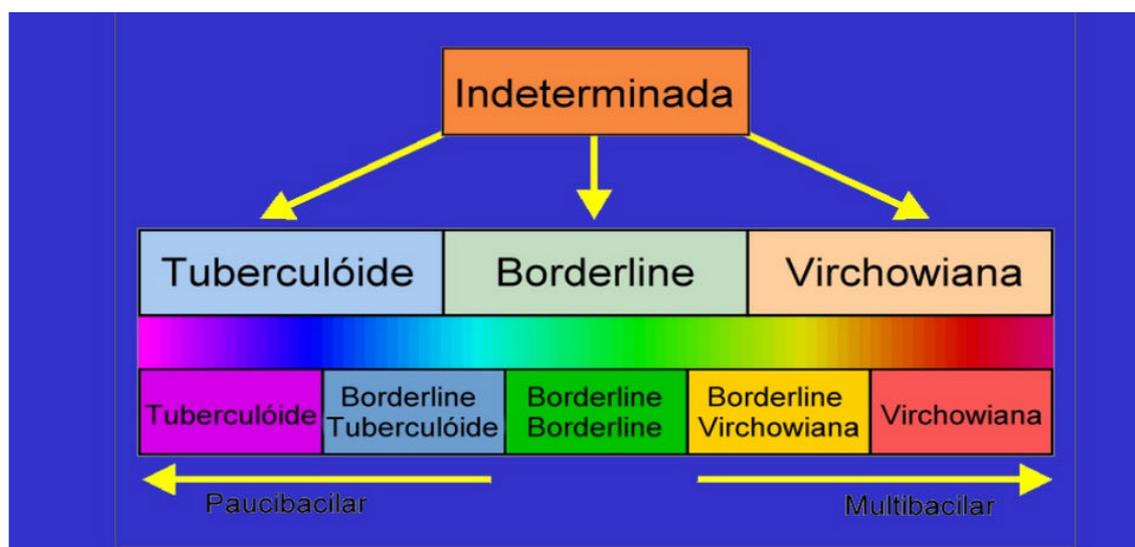
O diagnóstico da hanseníase é baseado em alguns sinais, como a presença de lesões cutâneas com perda de sensibilidade, com ou sem espessamento de nervos periféricos, e a presença do *M. leprae* no esfregaço de linfa ou cortes histológicos de tecidos. Para que esse diagnóstico seja correto é necessário o entendimento do espectro da doença, relacionando-o com o curso clínico e a extensão do comprometimento

cutaneoneural de cada forma clínica da doença. Com esse entendimento, é possível classificar as formas da doença que norteiam a terapêutica<sup>18</sup>.

Em 1953 foi adotada a classificação de Madri, baseada nas características clínicas da doença, aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos, definindo os grupos polares, tuberculoide (T) e virchowiano (V), o grupo inicial e transitório da doença (I) e a forma dimorfa (D) instável e intermediária. Do ponto de vista clínico, essa classificação observa os aspectos das lesões cutâneas em número, extensão, definição de margens e simetria de distribuição. Com relação ao critério bacteriológico, observa-se a presença ou ausência do *M. leprae* e seus aspectos morfológicos. No aspecto imunológico, a reação de Mitsuda com leitura entre 21 e 28 dias mostra a imunorreatividade à lepromina, sendo considerada positiva quando a intradermorreação formar pápula  $\geq$  a 5 mm de diâmetro. Os aspectos histológicos das lesões variam de granulomas bem definidos a infiltrado difuso linfo-histiocitário<sup>19</sup>.

Baseado nos critérios clínico, bacteriológico, histopatológico e imunológico, a classificação de Ridley & Jopling, em 1966, sugere a possibilidade das formas oscilarem no espectro da doença, ora para o polo de resistência (tuberculoide) ora para o polo de susceptibilidade (virchowiano)<sup>12</sup>. As siglas são utilizadas para indicar as duas formas polares tuberculoide-tuberculoide (TT) e lepromatoso-lepromatoso (LL) e os três subgrupos: boderline-tuberculoide (BT), boderline-boderline (BB), boderline-lepromatoso (BL)<sup>19</sup> (figura 1).

**Figura 1 – Classificação da hanseníase, segundo Ridley & Jopling**

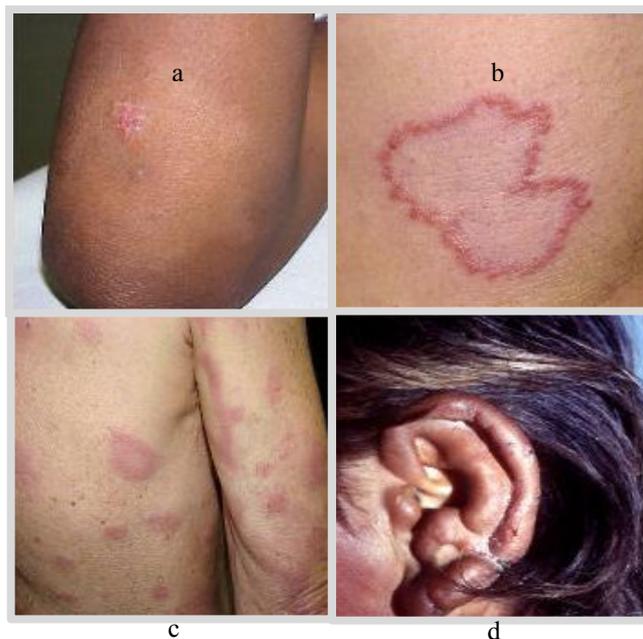


Fonte: Atlas de hanseníase - Dilton Vladimir A. Opromolla - Samoa Ura. Bauru, 2002<sup>20</sup>

Devido à necessidade de expansão da campanha de eliminação da hanseníase e à dificuldade de operacionalizar a classificação de Ridley & Jopling, em 1982, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs uma classificação simplificada e operacional, indicada para o trabalho de campo, baseada na contagem do número de lesões de pele e na provável população bacilar, relacionando-se as forma clínicas, classificando os pacientes em paucibacilar (PB), quando estes apresentam de 1 a 5 lesões, e multibacilar (MB) com a presença de mais de 5 lesões<sup>18,19</sup>.

No Brasil, adota-se a classificação de Madri, e o Ministério da Saúde (MS) sugere a classificação operacional de paucibacilar e multibacilar, considerando as formas indeterminada e tuberculoide como paucibacilar e as formas dimorfa e virchowiana como multibacilar. A forma indeterminada caracteriza-se por uma mancha hipocrômica, formigamento, que evolui para anestesia, podendo apresentar alopecia, glândulas sudoríparas e sebáceas. A forma tuberculoide do ponto de vista clínico apresenta lesões cutâneas em placas, com bordas bem delimitadas, eritematosas e infiltradas ou por manchas hipocrômicas, bem definidas. Oscilando entre as

manifestações da forma tuberculoide e virchowiana, a forma dimorfa pode apresentar lesões cutâneas bem delimitadas, sem ou com raros bacilos e, ao mesmo tempo, pode ter lesões infiltradas e mal delimitadas, com muitos bacilos. Por outro lado, a forma virchowiana caracteriza-se por lesões simétricas, infiltração difusa e hanseneosas, principalmente em tronco e face<sup>4</sup> (figura 2).



**Figura 2- Formas clínicas da hanseníase a) Indeterminada b) Tuberculóide c) Dimorfa d) Veirchowiana**

**Fonte: Guia de Hanseníase- Ministério da Saúde<sup>21</sup>.**

O teste de sensibilidade, a palpação dos nervos, a avaliação funcional e a avaliação da função motora fazem parte do diagnóstico clínico a ser realizado no momento da consulta<sup>14</sup>. Além desses, a baciloscopia e outros exames podem ser necessários: exame histopatológico da pele nos casos de dúvida diagnóstica ou na classificação, indicando-se a biópsia do nervo para realização de diagnóstico diferencial com outras neuropatias; teste de Mitsuda, usado na classificação da doença e na definição de prognóstico. O antígeno glicolípide fenólico-1 (PGL-1), específico do *M. leprae*, pode ser correlacionado com a forma clínica e a atividade da doença. Níveis

altos de anti PGL-1 são encontrados na hanseníase virchowiana, enquanto na forma tuberculoide, não há resposta desses anticorpos<sup>16</sup>.

A baciloscopia é o exame complementar mais útil no diagnóstico sendo de fácil execução e baixo custo. Colhe-se o raspado de tecido dérmico nos lóbulos das orelhas direita e esquerda, cotovelos direito e esquerdo e em lesão suspeita. Seu resultado é mensurado em índice baciloscópico (IB), numa escala de 0 a 6+. Esse resultado nas formas indeterminada e tuberculoide se apresenta negativo, enquanto é fortemente positivo na forma virchowiana e variável na forma dimorfa. A baciloscopia positiva classifica o caso como multibacilar, independente do número de lesões<sup>16</sup>.

O tratamento padronizado pela OMS e MS (quadro 1) utiliza drogas, como a rifampicina, dapsona e clofazimina, cuja indicação é realizada de acordo com a forma clínica da doença. Os esquemas poliquimioterápicos têm como princípio a associação de drogas. A multidrogaterapia (PQT) torna inviável o *M. leprae*, porém não recupera nem reverte as deformidades físicas já instaladas. Em paralelo à terapia medicamentosa, medidas de prevenção da doença e das incapacidades físicas bem como atividades de educação em saúde, incluindo o autocuidado, são importantes no controle da doença<sup>17</sup>.

**Quadro 1 - Esquema de tratamento da hanseníase, segundo classificação operacional.**

<b>Classificação operacional</b>	<b>Drogas</b>	<b>Dosagem</b>	<b>Duração do Tratamento</b>
Paucibacilar	Rifampicina	Uma dose mensal de 600 mg (2 cápsulas de 300 mg) com administração supervisionada	6 doses mensais supervisionadas de rifampicina
	Dapsona	Uma dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária autoadministrada	
	Obs: Critério de alta: 6 doses supervisionadas em até 9 meses		
Multibacilar	Rifampicina	Uma dose mensal de 600 mg (2 cápsulas de 300 mg) com administração supervisionada	12 doses mensais supervisionadas de rifampicina
	Dapsona	Uma dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária autoadministrada	
	Clofazimina	Uma dose mensal de 300 mg (3 cápsulas de 100 mg) com administração supervisionada e uma dose diária de 50mg autoadministrada.	
	Critério de alta: 12 doses supervisionadas em até 18 meses		

Fonte: Guia para o controle da hanseníase. Ministério da Saúde<sup>22</sup>

Durante a evolução crônica da doença podem ocorrer episódios reacionais que são fenômenos agudos ou subagudos em razão da hipersensibilidade aos antígenos do *M. leprae*. Cerca de 50% dos pacientes com hanseníase desenvolvem episódios reacionais durante o tratamento e 30% apresentam reações após a alta do tratamento específico que pode se estender por até 5 anos<sup>23</sup>.

Essas reações podem ser do tipo 1 e tipo 2. O tipo 1 é uma reação de hipersensibilidade celular, pode ocorrer em pacientes das formas tuberculoide e dimorfa, sendo caracterizada por lesões hiperestésicas, mais salientes, eritematosas ou

mesmo vinhosas, brilhantes, quentes, lembrando erisipela, podendo ocorrer necrose e descamação quando da sua involução. Os sintomas sistêmicos são raros, podendo ocorrer febre, mal-estar e anorexia, podendo ocorrer dano neural, de forma silenciosa, sem dor ou espessamento do nervo<sup>23</sup>.

A reação do tipo 2 é mais comum em pacientes virchowianos e alguns dimorfos que, em geral, apresentam uma infecção associada como infecções intercorrentes, traumatismo, estresse físico, cirúrgico ou psíquico, gravidez e outros. As lesões cutâneas ficam inalteradas e surgem lesões de eritema nodoso, brilhantes, dolorosas, de tamanhos variados, numerosos e de distribuição simétrica e bilateral. As alterações sistêmicas são frequentes, podem ser discretas, moderadas ou graves com febre, mal-estar, neurite, mialgia, artralgia, rinite, epistaxe, linfadenite dolorosa, glomerulonefrite e outras<sup>4</sup>.

O diagnóstico precoce e tratamento imediato são medidas importantes para evitar o dano neural permanente prevenindo as incapacidades. Em geral, usam-se medicações a base de corticoides e anti-inflamatórios, a depender da avaliação médica e do dano neural existente. Deve-se realizar sistematicamente o monitoramento das funções neurais, sensitivas e motoras<sup>4, 24</sup>.

Alguns países já conseguiram eliminar a hanseníase de seus territórios, porém, para que isso aconteça, é importante compreender a epidemiologia dessa doença e identificar precisamente as áreas críticas que requerem um tratamento especial, ou seja, estudar as áreas que ainda não eliminaram a doença e que por isso estão impossibilitando a consolidação da eliminação nacional<sup>25</sup>.

## 2.2 Hanseníase e sua relação com condição de vida

A epidemiologia da hanseníase, particularmente sua distribuição geográfica, permanece com numerosas lacunas e enigmas. Várias das principais áreas – historicamente – endêmicas no mundo encontram-se sob clima tropical, elevadas temperaturas e precipitações pluviométricas. Em regiões de clima temperado e frio, entretanto, a hanseníase também já apresentou incidências altas, não obstante fosse eliminada sem uma explicação definitiva<sup>25</sup>.

Atualmente 80% dos casos novos concentram-se em países localizados na faixa intertropical, como Índia, Brasil, Myanmar, Madagascar, Nepal e Moçambique. A geografia médica da hanseníase aponta o papel da história da ocupação dos territórios como fundamento da manutenção de focos da doença. Por outro lado, geralmente, é aceita a associação da hanseníase com condições desfavoráveis de vida, considerando-se fatores econômicos, higiênico-sanitários e biológicos<sup>25</sup> (figura 3).

**Figura 3 – Prevalência da hanseníase no mundo por 10.000 habitantes, 2011.**

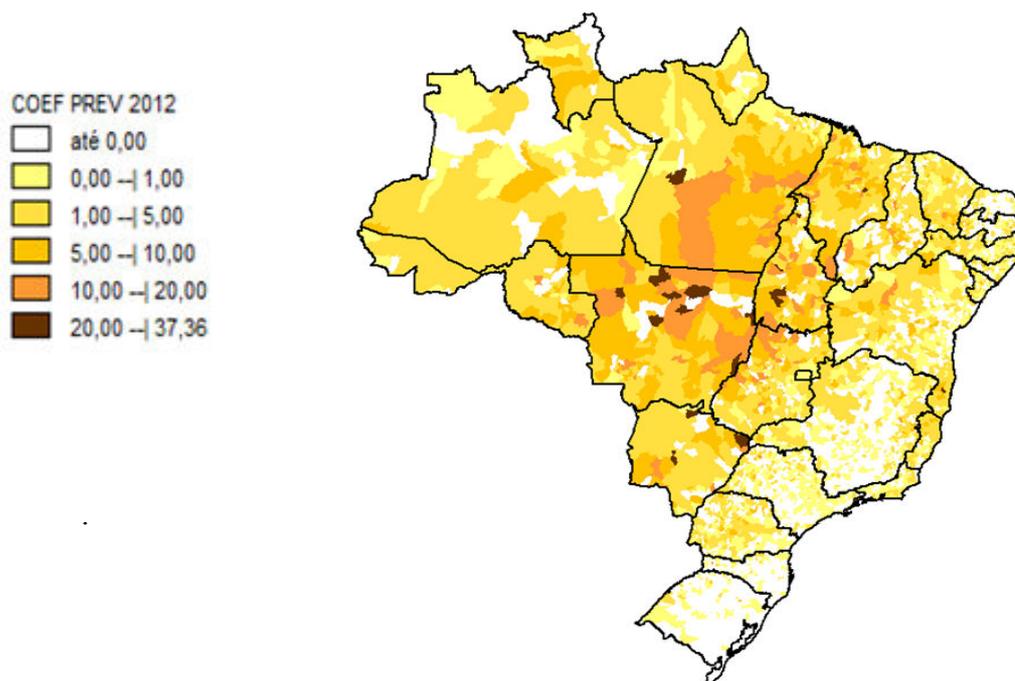


Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2011<sup>26</sup>.

O Brasil é o único país da América Latina onde a doença não foi eliminada como problema de saúde pública. O Ministério da Saúde, através da Portaria Ministerial nº 1.838, de 09 de outubro de 2002, considerou a hanseníase endêmica em todos os estados e regiões do país apresentando prevalência bastante variável, oscilando de 0,5 a 17 casos por 10.000 habitantes<sup>23</sup>. O país manteve, nas últimas décadas, a situação mais desfavorável da América e o diagnóstico da segunda maior quantidade de casos do mundo depois da Índia, sendo, portanto, um problema de saúde pública, cujo programa de eliminação está entre as ações prioritárias do Ministério de Saúde<sup>23</sup>.

Cerca de 80% dos casos estão concentrados em 600 municípios brasileiros onde vivem mais de 50% da população do país, indicando que a meta (1caso/10.000 hab.) somente será alcançada a longo prazo<sup>27</sup>. Apenas dois estados brasileiros, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, atingiram a meta de eliminação<sup>28</sup> e os estados da região norte ostentam os maiores coeficientes. (figura 4)

**Figura 4 - Prevalência de Hanseníase, segundo unidades da Federação. Brasil, 2010.**



Fonte: SINAN/SVS/MS em 24.04.2013<sup>29</sup>

As desigualdades regionais do desenvolvimento econômico e social no Brasil têm marcado caráter histórico. As Regiões Sudeste e Sul localizam-se no extremo favorável do País, e o Nordeste, no mais desfavorável. As Regiões Norte e Centro-Oeste, tradicionalmente atrasadas, têm sido objeto, especialmente a partir da década de 60, de ações de desenvolvimento, não obstante o reconhecimento da existência, também nas grandes aglomerações urbanas, capitais e Regiões Metropolitanas do Sudeste e do Sul, de lugares de extrema pobreza<sup>25</sup>.

Outros fatores condicionantes, como o fator climático pode estar contribuindo com a não coincidência atual das áreas mais pobres do Nordeste com níveis altos da endemia ou a coincidência de níveis endêmicos menores no Sul desenvolvido uma vez que as diferenças entre a incidência da hanseníase nos sertões de clima semiárido e nas franjas de costa úmidas do Nordeste, marcadas por distintos processos de ocupação e organização espacial são históricas<sup>25</sup>.

A área urbana do Brasil concentra mais de 80% da população, justificando a importância de estudar as cidades, uma vez que as condições de saúde das populações urbanas acabam por ser a expressão dos avanços e limitações das condições de vida e o resultado adequado ou não das políticas públicas<sup>23</sup>.

A discussão da distribuição espacial da endemia hanseníase no espaço urbano propõe também uma discussão do processo de urbanização local bem como a pobreza urbana existente e a maneira como a população, apresentando um conjunto de necessidades não satisfeitas, se distribui por esse espaço<sup>23</sup>. Esses processos de migração interna e alterações econômicas têm apresentado, como consequência, mudanças na ocorrência e distribuição de muitas doenças infecciosas e parasitárias<sup>23, 25</sup>.

O Atlas de Exclusão Social (2003) é um dos estudos mais recentes sobre a geografia das desigualdades no Brasil. Nele, a diferenciação da situação social no país, é traduzida por índices de pobreza, escolaridade, alfabetização, emprego formal, juventude, violência e desigualdade social, onde o indicador de exclusão social (IE) varia de 0 a 1, em uma escala crescente de menos a mais favorável<sup>25</sup>.

A distribuição espacial da hanseníase pode sofrer influência de vários fatores que podem ser agrupados em naturais e sociais. Entre os naturais, encontram-se o clima, o relevo, os tipos de vegetação e os determinados ecossistemas, enquanto que nos sociais podemos destacar as condições desfavoráveis de vida, a desnutrição, os movimentos migratórios e outras<sup>25</sup>. Com relação aos fatores sociais associadas à distribuição geográfica da doença, ressalta-se a pobreza, a desnutrição ou algumas carências nutricionais, associadas a movimentos migratórios e condições higiênicas desfavoráveis. Com frequência, associa-se a doença com indicadores, como falta de condições básicas de saúde, espaço, baixa renda familiar ou *per capita*, baixa escolaridade, entre outros<sup>23,25</sup>.

A ocupação espacial da população é um processo socialmente construído, sendo o espaço social determinante no processo saúde-doença, em que as condições de vida da população é a expressão mais significativa desse processo<sup>23</sup>. Os processos de deslocamentos populacionais ocorreram de forma predominante, nas décadas de 60 e 70, tendo contribuído para a expansão de endemias rurais para regiões urbanas e, atualmente, a rápida e desordenada urbanização da população e o fenômeno de periferização das metrópoles, criaram bolsões de carência social fazendo com que o controle da transmissão intraurbana de algumas endemias ficassem mais complexas exigindo novas estratégias de controle das endemias<sup>27</sup>.

Nesse processo saúde-doença da população, as políticas públicas de saúde devem abranger políticas de infraestrutura e sociais, uma vez que o perfil epidemiológico de uma dada população é determinado pela inserção dos indivíduos no espaço social e pelo seu acesso ao capital cultural e econômico. O capital cultural permite acesso ao saber sobre riscos de adoecer e prevenção destes, enquanto o capital econômico possibilita maior acesso ao cuidado e a condições de vida que leva ao melhor enfrentamento do processo de adoecimento<sup>27, 28</sup>.

A limitação de recursos e o processo de descentralização dos serviços de saúde que ocorreram no país exigem que os programas de saúde sejam efetivos e eficientes na tomada de decisões, sendo necessário um sistema de informação rápido que permita identificar áreas e populações com maiores necessidades de saúde de maneira que permita priorizar as intervenções com base no conhecimento do processo de produção da doença<sup>23</sup>.

Nesse contexto, a avaliação de risco de grupos populacionais enfatiza as doenças da população e não do indivíduo, respondendo à pergunta sobre as causas da incidência da doença e não sobre as causas dos casos de doença. Assim, duas questões se sobressaem: a caracterização dos grupos sociais e o tratamento de diversos indicadores simultaneamente<sup>23, 27</sup>.

As diferenças intramunicipais na detecção de casos de hanseníase são muito altas, devido à contribuição de fatores associados à capacidade diagnóstica dos municípios, ao acesso aos serviços de saúde e a uma real diferenciação da vulnerabilidade territorial pela presença ou não de numerosas fontes de infecção humana ou ambiental bem como dos diferentes modos de organização espacial e social, determinando, dessa forma, diferentes riscos de adoecer para certos grupos sociais<sup>25</sup>.

A identificação das diferenças em áreas menores é desconhecida devido à falta de estatísticas gerais que impedem seu conhecimento. Vários estudiosos têm investido esforços em estudos sobre a localização geográfica dos grupos de maior prevalência ou risco das doenças. As áreas de epidemiologia e planejamento têm o desafio de desenvolver e aplicar métodos diagnósticos coletivos, com o potencial de discriminar grupos ou áreas de risco no interior da coletividade e que sirvam de instrumento para o planejamento dos serviços de saúde<sup>23, 25,27</sup>. Surge, então, a proposta metodológica de construção de um indicador composto que considere as questões sociais e do espaço urbano para subsidiar as discussões e definição das ações para a eliminação da hanseníase, possibilitando o planejamento de intervenções<sup>23</sup>.

As técnicas de exploração de representação espacial de dados na área de saúde e, em especial, da hanseníase vem sendo muito discutido e utilizado no Brasil<sup>2</sup>. A vantagem da utilização dos setores censitários como unidade espacial de análise esta na representação do nível mais desagregado de dados populacionais e socioeconômicos coletados com abrangência nacional, de forma sistemática, periódica e padronizado. Com isso, é possível analisar os dados de diferentes formas e níveis de agregação, levando-se em consideração o que as instâncias de planejamento e gerência desejam analisar, permitindo a identificação de áreas de risco e o planejamento e adoção de medidas para controle dos agravos à saúde<sup>27</sup>.

Os Sistemas de Informação Geográfica (SIG) representam hoje uma nova ferramenta para análise da situação de saúde na medida em que permite uma melhor compreensão do comportamento das doenças na população. Tem um grande desafio pela frente, o de contribuir para identificar onde aplicar os escassos recursos financeiros, e com isso redirecionar as estratégias de controle dos agravos à saúde<sup>23</sup>.

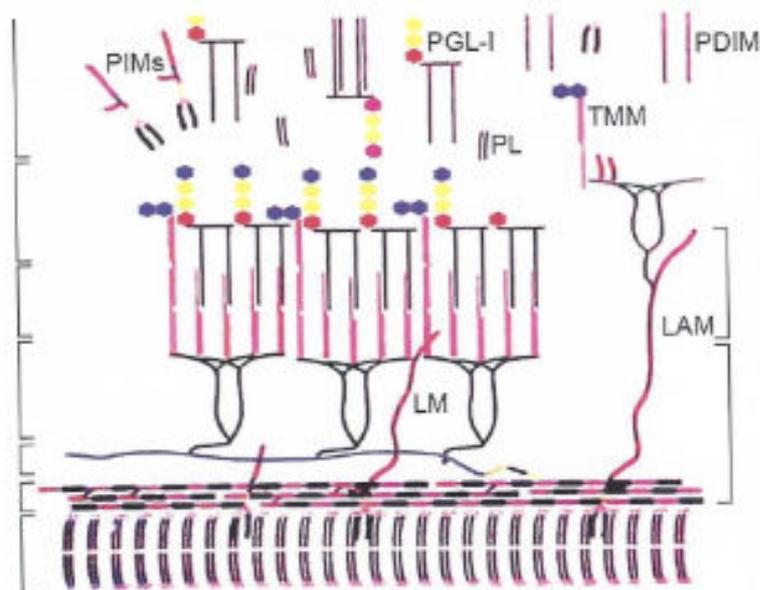
O Estudo dos indicadores referentes às esferas biológica e social no desenvolvimento de determinadas doenças, como a hanseníase, é muito oportuno. Identificar grupos residentes em áreas que ofereçam maior risco de adoecer e o estudo de novas tecnologias que colaborem no diagnóstico e tratamento dos casos de hanseníase podem auxiliar no planejamento, na implementação, no monitoramento e na avaliação de ações voltadas para a prevenção e o controle dessa doença<sup>2</sup>.

### 2.3 Anti PGL 1

O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) é um antígeno específico para o *M. leprae*<sup>6</sup>. Em 1981 a sua estrutura química foi elucidada e em 1982 foi descrito seu potencial antigênico, representando um grande avanço na pesquisa em hanseníase<sup>30</sup>. O PGL-1 é um antígeno de superfície pertencente ao grupo dos antígenos frouxamente ligados, cuja extração é possível com solventes do tipo clorofórmio e metanol<sup>31</sup> e corresponde a cerca de 2% da massa total do bacilo, podendo ser encontrado nos tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares<sup>7</sup> (figura 5).

O antígeno específico do *M. leprae* foi descoberto com a purificação do glicolípido fenólico-1 da parede celular do *M. leprae* e o reconhecimento de seu açúcar terminal, alvo para anticorpos IgM, como determinante imunodominante espécie-específica. O açúcar foi sintetizado e ligado diretamente à soroalbumina bovina mediante uma ligação octyl (O) ou phenyl (P) para traduzir reação imunológica em análise de anticorpos. Ambos, PGL-1 nativo e o açúcar sintético mostraram-se capazes de reagir com Imunoglobulina M (IgM), de modo altamente específico, em pacientes com hanseníase<sup>33</sup>. Esta imunoglobulina, por sua vez, é detectada em níveis elevados durante o longo período da doença devido à permanência do antígeno no organismo, porém, na hanseníase, os anticorpos específicos IgG e IgA também são detectados<sup>6</sup>.

Figura 5 – Estrutura esquemática da parede do *M. leprae*



Fonte: Vissa e Brennan<sup>34</sup>

Diversos estudos comprovam que PGL-1 facilita a entrada e a colonização de células de Schwann. Essas células, além de serem responsáveis pela produção da bainha de mielina, atuam como apresentadoras de antígenos micobacterianos. O reconhecimento e a resposta imune induzida após a apresentação desses antígenos são os principais responsáveis pelas lesões ocorridas na hanseníase<sup>30, 31, 32</sup>.

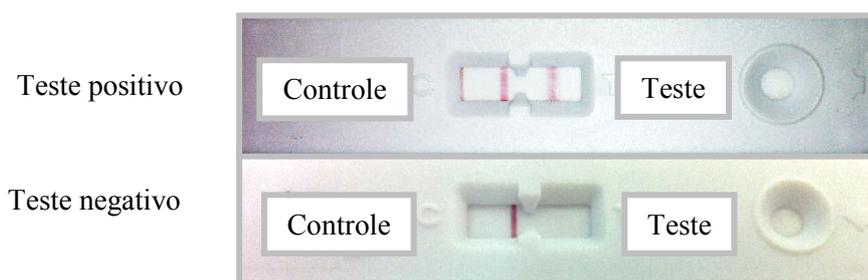
Em 1980 surgiram os primeiros testes sorológicos como apoio diagnóstico sendo o ensaio imunoenzimático (ELISA), o mais amplamente aplicado para detectar anticorpos anti-PGL-1 específicos (IgM)<sup>35</sup>. Payne *et al.*, em 1982<sup>36</sup>, realizaram os primeiros estudos sorológicos com esse antígeno, utilizando a técnica de imunodifusão em gel, e detectaram a presença de anticorpos específicos do tipo IgM nos soros de doentes virchowianos. Outros trabalhos publicados, com o PGL-1 nativo ou sintético, utilizando a técnica ELISA, mostraram que a produção de anticorpos do tipo IgM tem relação com o espectro da hanseníase<sup>31, 32, 33</sup>.

Algumas possibilidades de estudo do comportamento epidemiológico da hanseníase e controle da endemia têm sido discutida apartir dos testes sorológicos usando o glicolípido-fenólico - 1 (PGL-1) facilitando a análise com relação ao tempo de latência da doença, infecção subclínica e importância do contato<sup>37</sup>.

Bührer Sékula *et al* em 2003, descreveram um método alternativo ao ELISA denominado ML-Flow para detecção rápida de anticorpos IgM contra o PGL-1<sup>28</sup>. O ML-Flow é um teste imunológico, realizado em uma única etapa, onde o PGL-1 é imobilizado formando uma linha discreta numa membrana porosa de nitrocelulose localizada na zona teste. O reagente de detecção consiste de partículas móveis de ouro coloidal vermelho ligava com IgM anti-humano e vem inserido dentro do dispositivo. A presença de anticorpo IgM contra o *M. leprae*, em pacientes com hanseníase sugere infecção multibacilar e em contatos de pacientes pode identificar indivíduos com maior risco de desenvolver a doença. Devido à relação do PGL-1 com a carga bacilar em pacientes com hanseníase, este teste é capaz de discriminar pacientes PB de MB, podendo assim auxiliar na decisão terapêutica<sup>5</sup>(figura 6).

O Teste ML flow vem sendo utilizado, em todo o mundo, como apoio diagnóstico, com resultados similares aos obtidos com os antígenos nativos, estando o resultado relacionado à carga bacilar, ou seja, quanto maior a exposição bacilar, maior é a positividade do teste, cuja coloração da linha varia em intensidade de 1+ (carga bacilar baixa) a 4+ (carga bacilar alta)<sup>7</sup>.

**Figura 6 – Resultado do teste ML Flow em contatos intradomiciliares de casos de hanseníase município do Recife no período de 2006-2013.**



Os maiores títulos de anticorpos são observados nos casos de hanseníase, classificados como multibacilares, decrescendo no sentido oposto da doença (dimorfa, tuberculoide e indeterminada), estando baixos ou ausentes nos casos paucibacilares e, quando o teste é positivo, não atingem os níveis de anticorpos encontrados nos casos multibacilares. Esse fato se deve à ativação da resposta humoral e alta carga bacilar dos pacientes<sup>31</sup>.

O PGL-I tem sido usado em vários estudos, mostrando que pacientes hansenianos no polo lepromatoso do espectro formam grandes quantidades de imunoglobulinas do tipo IgM, reagindo contra este antígeno (soropositividade de 80-100%), enquanto pacientes no polo tuberculoide apresentam imunoglobulinas específicas em níveis baixos de detecção (soropositividade de 30-60%)<sup>30,31</sup>. A carga bacilar de um paciente com hanseníase tem correlação com a presença de anticorpos IgM contra o glicolípido fenólico I (PGL-I): 15-40% dos casos paucibacilares (PB) são soropositivos, comparados com 80-100% dos casos MB<sup>8</sup>.

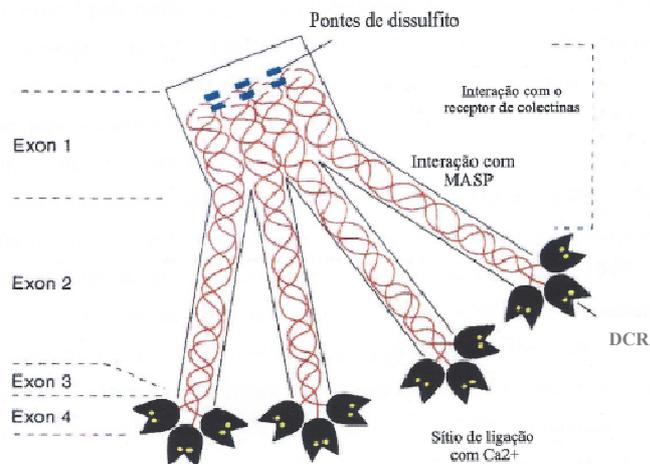
A combinação de critérios clínicos e laboratoriais, especificamente a pesquisa de anticorpos contra o antígeno PGL-1 do *M. leprae*, polimorfismos em diferentes genes tais como: fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-10 (IL-10), o Toll-Like Receptor (TLR), e o polimorfismo da MBL, relacionados ou não à imunidade, têm sido associados à suscetibilidade e espectro da hanseníase sendo uma alternativa promissora como potencial marcador genético para o controle da doença nos países endêmicos<sup>7, 8</sup>.

## 2.4 Lectina Ligadora de Manose (MBL)

A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína encontrada em mamíferos e pássaros, sintetizada no fígado que tem uma importante função na imunidade inata do hospedeiro pela sua ligação de alta afinidade a resíduos de manose ou a outros carboidratos componentes de vírus, de bactérias e de leveduras como frutose, ou N-acetilglicosamina. Está envolvida na primeira linha de defesa do hospedeiro contra diferentes microrganismos atuando efetivamente como um anticorpo universal<sup>38</sup>.

Sua estrutura em forma de buquê é constituída por oligômeros estruturados por subunidades que se formam pela associação de três cadeias polipeptídicas idênticas de 32 kDa, que formam a região colagenosa, um domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC), uma região hidrofóbica chamada de pescoço e uma região N-terminal rica em cisteína<sup>38</sup> ( Figura 7). As subunidades se associam e formam desde dímeros até hexâmeros. A oligomerização é essencial para atividade funcional da MBL permitindo a ligação específica do DCR com padrões moleculares expressos nos microrganismos<sup>39, 40</sup>.

**Figura 7– Estrutura da MBL**



Fonte: TURNER, 1996<sup>41</sup>

A ativação do complemento pela via das lectinas possivelmente envolve a complexação da MBL, por sua região colagenosa, com diferentes proteases denominadas MASP-1, MASP-2, MASP-3 e a proteína de 19KDa, sMAP ou MAP19. A MBL liga-se a resíduos de manose e outros açúcares que estão acessíveis e organizados em um padrão permitindo sua adesão a muitos patógenos e/ou superfícies celulares<sup>38</sup>.

A MBL possui pelo menos quatro funções distintas (figura 8): ativação do sistema complemento: a promoção da opsonização e da fagocitose independente de ativação do complemento, modulação da inflamação e remoção de células apoptóticas<sup>38</sup>.

42

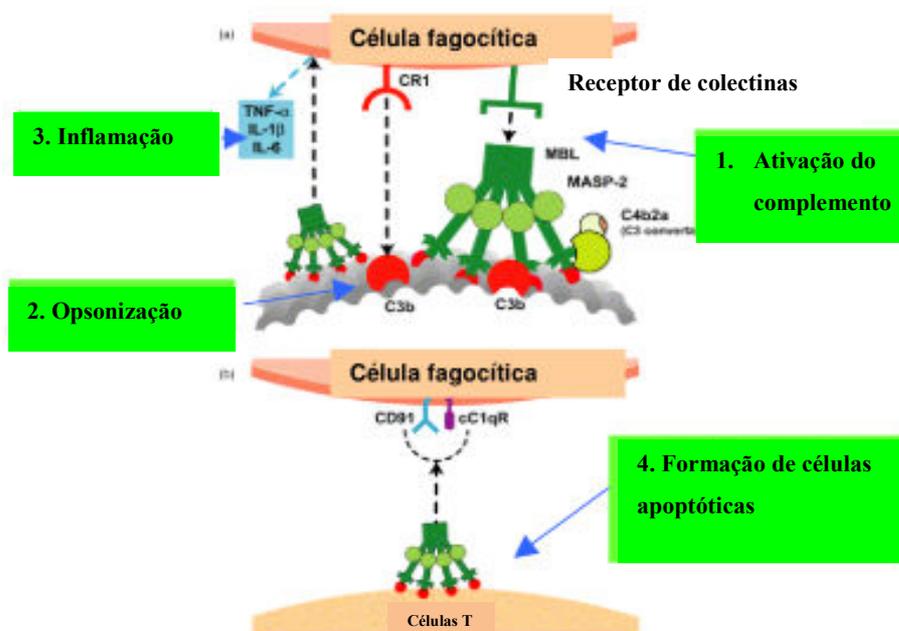


Figura 8- Funções da MBL

A MBL é codificada pelo gene *MBL2* que está localizado no braço longo do cromossomo 10 (q11.2-q21). Este gene é composto de 4 exons e 3 íntrons que possuem diferentes funções. O exon 1 codifica o peptídeo sinal, a região N-terminal rica em cisteína e parte da região colagenosa; o exon 2 codifica o restante da região colagenosa,

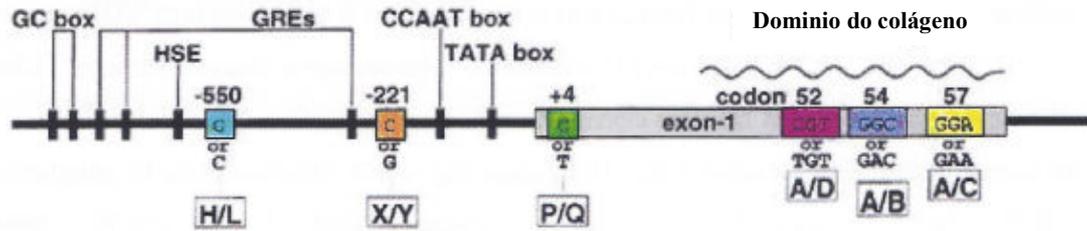
enquanto o exon 3 codifica a região hidrofóbica espiralada (também conhecida como pescoço) e o exon 4 o DRC<sup>43</sup>.

Em humanos há dois genes da MBL, entretanto o gene *MBL1P1* é um pseudogene, e somente o *MBL-2* codifica uma proteína funcional. Alguns estudos mostraram que esse pseudogene pode ter sido perdido na evolução e, eventualmente, silenciado por mutações nos resíduos de Gly, através do mesmo mecanismo molecular causador dos alelos variantes no *MBL-2*, sugerindo uma seleção evolutiva para os genes codificadores de baixa produção de MBL no soro<sup>38</sup>.

A concentração sérica da MBL pode ser variável podendo ocorrer de 0 a 5000 ng/ml em indivíduos saudáveis, aumentando de 2 a 3 vezes na resposta de fase aguda. A função da MBL está diretamente associada a sua concentração sérica sendo determinada pela interação entre mutações no exon 1 do gene *MBL-2* e vários sítios polimórficos da região promotora do gene, resultando em defeitos na oligomerização da molécula levando a deficiência funcional e de expressão da proteína<sup>40</sup>.

O sequenciamento do gene *MBL2* revelou a existência de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em diferentes loci do exon 1, nos códons 52 (CGT→TGT), 54 (GGC→GAC) e 57 (GGA→GAA) resultando em substituições de aminoácidos: Arg→Cys, Gly→Asp e Gly→Glu, respectivamente (figura 9). Individualmente, estes são referidos como alelos D, B e C, designados coletivamente como o alelo O, enquanto que o alelo selvagem é designado como A. Esses são responsáveis pela expressão de uma MBL incorretamente oligomerizada, portanto instável, afetando sua função, com consequente redução da capacidade de ativação do sistema complemento e aumento da susceptibilidade à infecção por vários patógenos<sup>40, 44</sup>.

Figura 9– Polimorfismo da região promotora e do exon 1 do gene *MBL-2*



Fonte: MATSUSHITA, 1998; modificada<sup>45</sup>.

Os sítios polimórficos da região promotora estão associados a diferentes níveis séricos de MBL independentes dos alelos variantes. Estão localizados nas posições -550 (loci H/L), -221 (loci X/Y) do gene *MBL-2* ambas causadas pela troca de guanina por citosina, estando intimamente ligados e devido ao desequilíbrio da ligação, sete haplótipos (HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, LYPB, LYQC e HYPD) são encontrados comumente. O haplótipo HYPA está associado a concentrações plasmáticas normais e altas de MBL, enquanto o LXPA está associado a baixas concentrações<sup>44, 46, 47</sup>.

O defeito na opsonização de microrganismos tem como base a deficiência de MBL no soro, observado por Super *et al* em 1989<sup>48</sup>. Dois anos depois, foi observado por Tunner *et al*<sup>49</sup>, que baixas concentrações da proteína estavam associadas a infecções recorrentes na infância. Por outro lado, observou-se também que altas concentrações de MBL podem favorecer infecções por organismos intracelulares como a *Leishmania* e o *M. leprae*, que utilizam a opsonização por C3 e seu receptor para entrar na célula do hospedeiro. Desta forma, quando existe a diminuição da ativação do complemento pode existir também uma dificuldade na entrada e disseminação do patógeno nas células<sup>50</sup>.

Em 2005, Ambrosio e Messias<sup>51</sup>, demonstraram que a deficiência de MBL parece exercer papel protetor contra o desenvolvimento da hanseníase e da evolução à forma clínica lepromatosa, fortalecendo a hipótese de que valores séricos baixos da

proteína apresentam vantagem nas infecções por microrganismos intracelulares como o *M. lepra*.

Alguns estudos têm mostrado uma associação entre a presença de variantes alélicas do gene *MBL* e a ocorrência de imunodeficiência associada às infecções crônicas principalmente em crianças nos primeiros anos de vida devido à insatisfatória resposta humoral<sup>40, 47, 50</sup>. Vários autores têm demonstrado uma relação entre *MBL* e doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico, colite ulcerativa, doença de Crohn e artrite reumatoide sob a hipótese de que a proteína possui um importante papel na remoção de complexos imunes, bem como na regulação da resposta imunológica envolvida nessas doenças, sendo capaz também de modular a gravidade de algumas doenças como a AIDS e a artrite reumatoide<sup>38, 46, 47, 52, 53</sup>.

A *MBL* desempenha um papel fundamental no reconhecimento de microrganismos durante as etapas da resposta imune. Ela pode ativar a cascata do sistema complemento para aumentar a resposta inflamatória devido à liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias como a  $TNF\alpha$ , IL-1 e IL-6 e, portanto, a *MBL* poderia ter uma função importante na interação do *M. leprae* e o hospedeiro. A *MBL* liga-se a *M. leprae* e melhora a fixação e ingestão da micobactéria pelos fagócitos *in vitro* sugerindo que a *MBL* desempenha um importante papel na captação, disseminação do patógeno e estabelecimento da hanseníase<sup>54</sup>.

Em 1994, Garred *et al*<sup>55</sup> associaram níveis aumentados de *MBL* sérica em pacientes da Etiópia, com formas clínicas mais graves da hanseníase sugerindo que níveis deficientes da *MBL* poderiam conferir proteção frente a esta doença<sup>38, 46, 47</sup>. As cepas do *M. leprae* de diferentes países têm demonstrado baixa variabilidade genética e pode apresentar os mais baixos níveis quando comparado a outras bactérias conhecidas. Como consequência, o *M. leprae* pode ser muito sensível à variação genética das

proteínas do hospedeiro ou variação dos genes envolvidos no curso da doença, podendo resultar numa resistência ou suscetibilidade à hanseníase<sup>53</sup>.

Em 2004, Fitness e al<sup>56</sup> estudou 207 pacientes de hansen e 452 contatos de um país do nordeste da África- Malauí, não tendo encontrado associação entre os haplótipos ou genótipos da região estrutural do *MBL2* com suscetibilidade a doença. Porém, no sul do Brasil, um estudo envolvendo 264 pacientes de hansen e 214 controles, investigou a associação do polimorfismo do *MBL2* para as três regiões promotoras (H/L, H/Y e P/Q) e os alelos variantes da região estrutural (B, C e D) mostrou uma maior frequência para LYPA (alta expressão de MBL) nos pacientes de hansen e na forma lepromatosa. Os autores mostraram ainda que a baixa expressão de MBL estava associada a proteção para a forma lepromatosa, não sendo verificada associação de genótipos de alta expressão com a suscetibilidade a doença e suas formas clínicas<sup>39</sup>.

Devido à complexa regulação genética quanto à suscetibilidade à hanseníase, a influência do polimorfismo do gene *MBL-2* pode variar de acordo com o perfil genético da população em estudo. No Brasil, as frequências do polimorfismo do exon-1 e da região promotora do *MBL2* apresentam-se diferentes na população devido as suas diferenças genéticas<sup>39</sup>.

### 3. OBJETIVOS

#### Geral

Verificar a associação do polimorfismo do gene *MBL2* com a classe operacional e formas clínicas da Hanseníase e a sorologia anti-PGL-1 em contactantes nas áreas de maior risco no município Recife no período de 2006 a 2013

#### Específicos

1. Caracterizar o comportamento da hanseníase identificando áreas de maior risco e sua relação com o Indicador de Carência Social;
2. Verificar a frequência de positividade do anti-PGL-1 em contatos domiciliares de casos de hanseníase e sua relação com as variáveis sexo; faixa etária; classificação operacional; forma clínica e tipo de relação;
3. Verificar o polimorfismo para a região promotora e o exon 1 do gene *MBL2*, em pacientes e seus contatos domiciliares, de todas as formas clínicas de hanseníase, identificadas nas áreas de maior risco;
4. Associar a sorologia anti-PGL-1 com o polimorfismo do gene *MBL2* em contatos domiciliares de casos de hanseníase

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Área de estudo**

Recife, capital do Estado de Pernambuco, situa-se no litoral nordestino e ocupa uma posição central, apresentando uma superfície territorial de 220 km<sup>2</sup> e uma população residente estimada de 1.634.808 habitantes em 2010. Limita-se ao norte com as cidades de Olinda e Paulista, ao sul com o município de Jaboatão dos Guararapes, a oeste com São Lourenço da Mata e Camaragibe, e a leste com o Oceano Atlântico.

Com uma composição territorial diversificada: morros - 67,43%, planícies - 23,26%, áreas aquáticas - 9,31%, Zonas Especiais de Preservação Ambiental (ZEPA) - 5,58%; a cidade está dividida em 94 bairros aglutinados em 06 Regiões Político-Administrativas (RPA) que correspondem 06 Distritos Sanitários – DS (quadro 2).

A situação epidemiológica da hanseníase na cidade é bastante heterogênea, apresentando importantes diferenciais intraurbanos de incidência da doença. São 56 bairros da cidade que apresentam padrão compatível com situação hiperendêmica e elevada endemicidade.

**Quadro 2- Distribuição dos bairros do Recife por Distrito Sanitário**

<b>Distrito Sanitário</b>	<b>Bairros</b>
Distrito Sanitário I	Recife; Santo Amaro; Boa Vista; Cabanga; Ilha do Leite; Paissandu; Santo Antônio; São José; Coelhos; Soledade; Ilha Joana Bezerra
Distrito Sanitário II	Arruda; Campina do Barreto; Encruzilhada; Hipódromo; Peixinhos; Ponto de Parada; Rosarinho; Torreão; Água Fria; Alto Santa Terezinha; Bomba do Hemetério; Cajueiro; Fundão; Porto da Madeira; Beberibe; Dois Unidos; Linha do Tiro.
Distrito Sanitário III	Aflitos; Alto do Mandu; Alto José Bonifácio; Alto José do Pinho; Apipucos; Brejo da Guabiraba; Brejo de Beberibe; Casa Amarela; Casa Forte; Córrego do Jenipapo; Derby; Dois Irmãos; Espinheiro; Graças; Guabiraba; Jaqueira; Macaxeira; Monteiro; Nova Descoberta; Parnamirim; Passarinho; Pau-Ferro; Poço da Panela, Santana; Sítio dos Pintos; Tamarineira; Mangabeira; Morro da Conceição; Vasco da Gama.
Distrito Sanitário IV	Cordeiro; Ilha do Retiro; Iputinga; Madalena; Prado; Torre; Zumbi; Engenho do Meio; Torrões; Caxangá; Cidade Universitária; Várzea.
Distrito Sanitário V	Afogados; Areias; Barro; Bongü; Caçote; Coqueiral; Curado; Estância; Jardim São Paulo; Jiquiá; Mangueria; Mustardinha; San Martin; Sancho; Tejiipió; Totó.
Distrito Sanitário VI	Boa Viagem; Brasília Teimosa; Imbiribeira; Ipsep; Pina; Ibura; Jordão; COHAB.

## 4.2. Delineamento da pesquisa

Esta pesquisa foi realizada em quatro etapas descritas a seguir:

1ª etapa: foi realizado um estudo do tipo ecológico para construção do indicador de Carencia Social (ICS) utilizando-se a técnica de formação de escores para estabelecer os estratos de risco. Os dados foram extraídos do Censo Demográfico 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) com a seguinte composição de variáveis: abastecimento de água; esgotamento sanitário, renda do responsável pelo domicílio, alfabetização do responsável pelo município e densidade intradomiciliar.

2ª etapa: utilizou-se um estudo para estimar a prevalência de hanseníase no município e estabelecer os estratos de risco para o agravo. Os dados de morbidade da hanseníase foram extraídos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) municipal, sendo considerados todos os casos residentes em Recife notificados no período de 2006 a 2010. A partir destes dados foram calculados os indicadores: coeficiente de detecção por Distrito Sanitário, sexo e faixa etária; proporção de casos novos segundo classificação operacional e forma clínica; proporção de contatos de casos novos registrados e examinados; de casos novos segundo modo de entrada e segundo grau de incapacidade no momento do diagnóstico.

3ª etapa: a partir da identificação das duas áreas de maior risco epidemiológico realizou-se um estudo do tipo corte transversal para estimar a prevalência da soropositividade dos contatos de casos de hansen ao anti-PGL-1. Após a identificação dos pacientes e seus contatos domiciliares foi coletado 5 ml de sangue de ambos. Para detecção de anticorpos específicos ao *M. leprae* contra o componente de açúcar do glicolípido

fenólico-1 (PGL-1) no soro humano de contatos intradomiciliares de casos de hanseníase foi utilizado o teste ML Flow desenvolvido no Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os testes foram realizados no laboratório de biologia molecular de vírus da Universidade de Pernambuco.

4ª etapa: em continuidade ao estudo anterior realizou-se uma comparação de grupos (casos/contatos) para verificar a frequência do polimorfismo do gene *MBL2* e sua associação com a sorologia anti- PGL-1 dos contatos domiciliares de hanseníase. Para realização desta análise o DNA foi extraído com kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA) seguindo as instruções do fabricante.

A genotipagem da região promotora foi realizada pelo sistema de sondas fluorescentes Taqman através da tecnologia de PCR em tempo real. As sondas e protocolos validados para as regiões -550 e -221 estão disponíveis no site (<http://snp500cancer.nci.nih.gov>). A genotipagem do exon 1 e da região estrutural do *MBL2* foi realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real (MTA) segundo Hladnik *et al.*, (2002) utilizando os seguintes primers: Forward primer 5'-AGGCATCAACGGCTTCCCA-3', Reverse primer 5'-CAGAACAGCCCAACACGTACCT-3'. As três variantes alélicas do gene *MBL2* nas posições do códon 52, 54 e 57 no exon-1 estão designadas pelo alelo "O", sendo o alelo selvagem designado "A".

#### **4.3. População de estudo e período de referência**

A população de estudo correspondeu às unidades espaço-populacionais do município do Recife. Os dados populacionais referentes à situação de morbidade por hanseníase nas diferentes unidades de análise ecológica tendo como período de

referência os anos de 2006 a 2013. Para cálculo dos indicadores epidemiológicos da hanseníase utilizou-se a população para o meio do período (2008).

Para o estudo de prevalência e frequência dos polimorfismos do gene *MBL2* foi definido como critério de inclusão os casos notificados no Sistema de Notificação de Agravos Notificados na Secretaria Municipal de Saúde no período de 2006 a 2010 e seus contatos intradomiciliares, residentes, nas duas áreas identificadas como de maior risco. Para cálculo da amostra foi considerada a prevalência da MBL em estudos anteriores (6%). Foram excluídos os casos que tenham sido notificados fora desse período e os que estivessem localizados fora das duas áreas de maior risco.

#### **4.4 Métodos de análise de dados**

A construção do indicador de Carência Social foi realizado utilizando-se a técnica de escores. Para construção dos indicadores epidemiológicos utilizou-se o software Excel versão 7.0. Para determinação da correlação entre as variáveis coeficiente de detecção da hanseníase e o Indicador de Carência Social (ICS) calculou-se o Coeficiente de Correlação de Spearman e a regressão linear utilizando-se o programa Stata 12.0.

Para análise da associação entre as variáveis sexo; faixa etária; classificação operacional; forma clínica e tipo de relação, foi realizado o teste Qui-quadrado de Pearson com  $p$  menor que 0,05 e odds ration com intervalo de confiança de 95% calculado através do software Graphpad Prism versão 6.01.

Para o estudo de prevalência e frequência dos polimorfismos do gene *MBL2* e sua associação com o anti PGL-1 utilizou-se o software SPSS versão 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e construção dos haplótipos

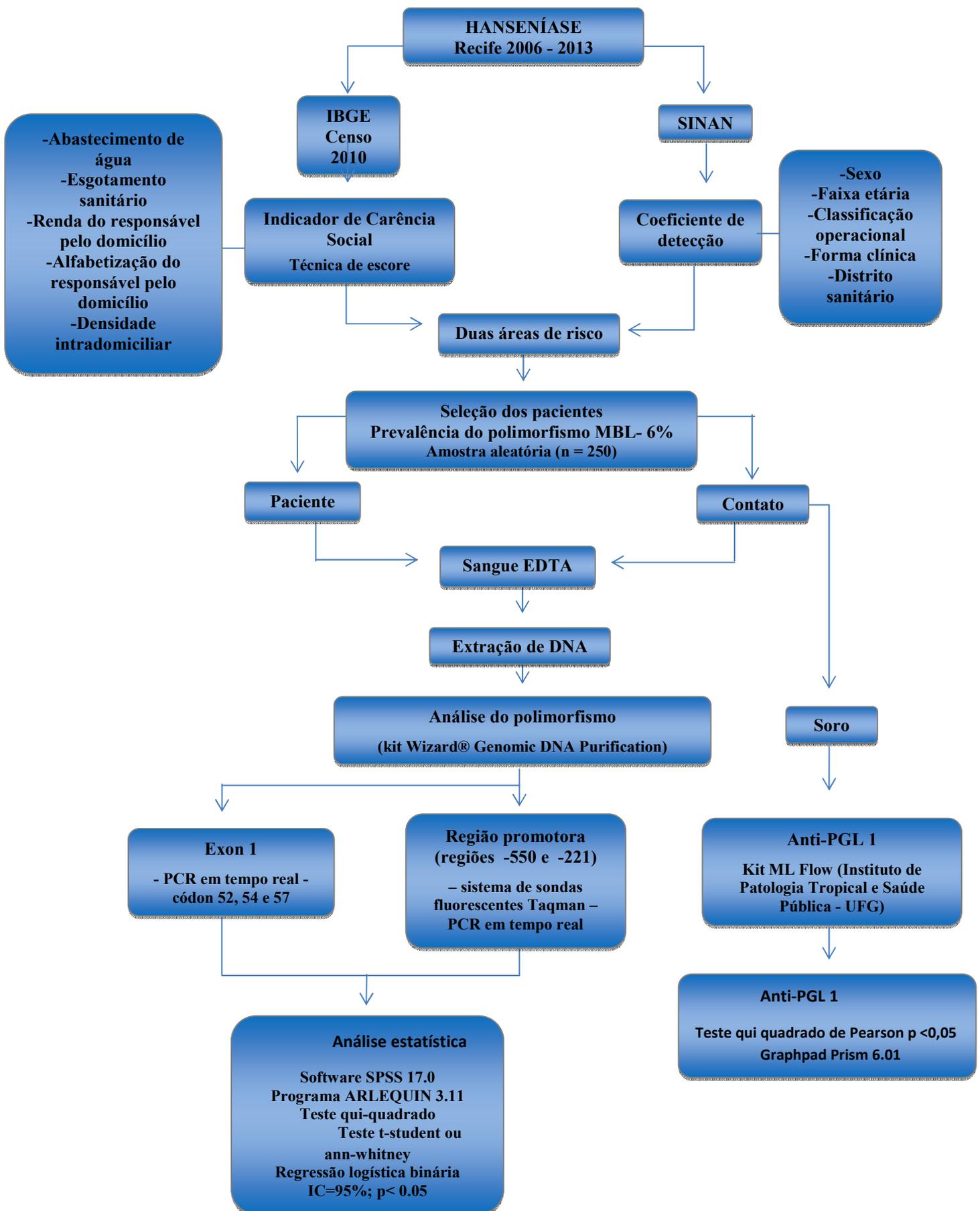
foi utilizado o programa ARLEQUIN (versão 3.11, Bern, Swiss). Variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste de Fisher quando apropriado. Para os dados quantitativos as comparações foram realizadas usando o teste t-Student ou Mann-Whitney U-Test para distribuição paramétrica ou não-paramétrica respectivamente. Regressão logística binária foi realizada e os resultados estão apresentados utilizando odds ratio (OR) com 95% de intervalo de confiança. As diferenças foram consideradas significativas quando o p-valor  $<0,05$ .

#### **4.5 Considerações éticas**

O projeto de pesquisa desta tese foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Pernambuco sob nº da CAAE 0233.0.097.000-10 e registro: CEE/UPE: 238/10 (Anexo1).

Segue abaixo um fluxograma que representa a metodologia descrita.

Figura 10- Fluxograma do delineamento da pesquisa



## REFERÊNCIAS

1. Santos LAC, Faria L, Menezes RF. Contrapontos da história da hanseníase no Brasil: cenários de estigma e confinamento. R. Bras. Est. Pop. 2008 jan./jun.;25(1):167-190.
2. Amaral EP, Lana FCF. Análise espacial da hanseníase na microrregião de Almenara, MG, Brasil. Revista Brasileira de Enfermagem 2008;6(esp):701-7.
3. Pernambuco, Secretaria Estadual de Saúde. Perfil Epidemiológico da Hanseníase no Estado de Pernambuco, 2010.
4. Santos, APT, Almeida, GG, Martinez, CJ, Rezende, Cátia. Imunologia da hanseníase: aspectos clínicos e laboratoriais. Newslab – edição 73- 2005.
5. Contin LA, Fogognoço L, Barreto JÁ, Nogueira ME, Alves CJM, Nassif PW, Lauris JRP. Uso do teste ML flow como auxiliar na classificação e tratamento da hanseníase. Anais brasileiros de dermatologia 2011;86(1):91-5.
6. Cruz RCS, Cunha MGS, Vásquez FG. Prevalência de anticorpo anti PGL-1 em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase. Cad. Saúde colet. 2009; 17(1):261-71.
7. Martins ACC, Miranda A, Oliveira MLWR, Buhner-Sékula S, Martinez A. Nasal mucosa study oh leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. Brazilian jornal of otorhinolaryngology 2010 set./out.;76(5):579-87.
8. Oliveira MLW, Cavalière FAM, Macieira JMP, Buhner-Sékula S. O uso da sorologia como ferramenta adicional no apoio ao diagnóstico de casos difíceis de hanseníase multibacilar: lições de uma unidade de referência.

Revista da sociedade brasileira de medicina tropical 2008;41(supl. 2):27-33.

9. Opromolla, DVA. Noções de hansenologia. Bauru: Centrode Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 1981.
10. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. Saúde e sociedade 2004 maio/ago.;13(2):76-88.
11. Opromolla, DVA. Noções de hansenologia. Bauru:Centrode Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.
12. Monteiro, Y.N. Hanseníase: História e poder no Estado de São Paulo, v.12, n.1, p.1-7, 1987.
13. Terra, F. Esboço histórico da lepra no Brasil. Anais brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro, v.2, n.1, p.3-4, 1926.
14. Calmon, P. História da civilização brasileira. Rio de Janeiro:(s.n.), 1940.p.119.
15. Brasil, Ministério da Saúde. Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro:DNDS/NUTES, 1989.
16. Araújo MG. Hanseníase no Brasil. Revista da sociedade brasileira de medicina tropical 2003 maio/jun.; 36(3):373-382.
17. Ferreira IN, Alvarez RRA. Hanseníase em menores de 15 anos no município de Paracatu, MG (1994 a 2001). Ver. Bras. Epidemiol 2005; 8(1):41-9.
18. Mendonça VA, Melo GEBA, Teixeira AL, Costa RDACM. Imunologia da Hanseníase. Anais Bras Dermatol. 2008;83(4):343-50.

19. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina* 1997 jul./set.;30:325-334.
20. Opromolla DVA, Ura S. Atlas de hanseníase. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima; 2002.
21. Brasil. MS (Ministério da Saúde). Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia de Hanseníase. Brasília; 2002.
22. Brasil. MS (Ministério da Saúde). Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase: Brasília; 2002.
23. Mencaroni DA, Pinto Neto JM, Villa TCS, Oliveira MHP. Análise espacial da endemia hanseniana na área urbana do município de Fernandópolis/SP. *Hansen. Int.* 2004;29(1):12-20, 2004.
24. Lyon, S, Grossi, MAF. Hanseníase, Rio de Janeiro: MedBook, 2013, cap 22.191-6.
25. Magalhães MCC, Rojas LI. Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde* 2007 jun.;16(2):75-84.
26. OMS (Organização Mundial da Saúde). Prevalência da hanseníase no mundo 2011 [internet]. Washington, 2011 [cited 2014 mar. 28]. Disponível em:  
[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1477&Itemid=1](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=1477&Itemid=1)
27. Ximenes RAA, Martelli CMT, Souza WV, Lapa TM, Albuquerque MFM, Andrade ALSS, Morais Neto OL, Silva SAS, Lima MLC, Portugal JL. Vigilância de doenças endêmicas em áreas urbanas: a interface entre mapas

- de setores censitários e indicadores de morbidade. Cad. Saúde pública 1999 jan./mar.;15(1):53-62.
28. Lana FCF, Davi RFL, Lanza FM, Amaral EP. Detecção da hanseníase e índice de desenvolvimento humano dos municípios de Minas Gerais, Brasil. Revista eletrônica de enfermagem [Internet] 2009 [acesso em 2013 dez. 28];11(3):539-44. Disponível em: <http://www.fen.ufg.br/revista/v11/n3/v11n3a10.htm>.
29. Mauá. SMS (Secretaria Municipal de Saúde). Prevalência da Hanseníase segundo unidades da federação [internet]. Brasília; 2010 [cited 2014 mar. 28]. Disponível em: <http://covisamaua.blogspot.com.br/2012/02/prevalencia-da-hanseniose-no-mundo.html>.
30. Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Buhner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-1: revisão sistemática. Revista da sociedade brasileira de medicina tropical 2008;41(supl. 2):11-18.
31. Barros RPC, Oliveira MLWR. Detecção de anticorpos específicos para o antígeno glicolípido fenólico-1 do *M. leprae* (anti PGL-1 IgM): aplicações e limitações. Na bras Dermatologia 2000 nov./dez.;75(6):745-753.
32. Silva BDS, Souza MR, Kipnis TL, Junqueira-Kipnis AP. Avaliação dos anticorpos séricos totais antiglicolípido fenólico de *Mycobacterium leprae* em indivíduos portadores de hanseníase e seus contatos domiciliares no estado de Goiás, Brasil. Revista de Patologia Tropical. 2009 jul./set.;38(3): 187-96.
33. Calado KLS, Buhner-Sékula S, Vieira AG, Oliveira MLWR, Durães S. Positividade sorológica antiPGL-1 em contatos domiciliares e

- peridomiciliares de hanseníase em área urbana. *An Bras Dermatol.* 2005;80 (supl 3):S301-S6.
34. Scollard, DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenburi JL, Truman RW, Williams DL. *Clin Microbiol Rev.* [periódico na internet] 2006 Apr. [cited 2014 mar. 28];19(2):338-81. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/19/2/338/F3.expansion.html>>
35. Grossi, MAF, Leboeuf, MAA, Andrade, ARC, Lyon, S, Antunes, CMF, Buhner-Sekula,S. The influence of ML Flow test in leprosy classification. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41 (suplemento II); 34-38, 2008.
36. Payne, SN, Draper P, Rees RJ. Serological activity of purified glycolipid from mycobacterium leprae. *International Journal of Leprosy and other Mycobacteriology Diseases* 1982; 50: 220-221,
37. Brasil MTLRF, Oliveira LR, Rimoli NSF, Cavallari S, Gonçalves OS, Lessa ZL, Rotta O. Sorologia anti PGL-1 e risco de ocorrência de hanseníase em área de alta endemicidade do estado de São Paulo: quatro anos de seguimento. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2003;6(3):262-71.
38. Iturry-Yamamoto GR, Portinho CP. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. *Rev. Ass Med Brasil* 2001; 47(1):41-51.
39. Vasconcelos, LRS, Fonseca, JPL, Carmo, RF, Mendonça, TF, Pereira, VRA, Lucena-Silva, N, Pereira, LMMB, Moura, P, Cavalcanti, MSM. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and *MBL2* genotypes. *International Journal of infectious diseases.* 15 (2011) e551-e557.

40. Carvalho EG, Utiyama SRR, Kotze LMS, Reason ITM. Lectina ligante de manose (MBL): características biológicas e associação com doenças. Rev. Bras. alerg. Imunopatol. 2007;30(5):187-193
41. Turner MV. The role of mannose-binding lectin in health and disease. The journal of Paediatrics [periódico na internet] 2002 [cited 2014 mar. 28];(7):134-42
42. Alcaïs A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin Immunol* 2005;17:44-8.
43. Britton WJ, Lockwood, DN. Leprosy. *Lancet* 2004;363:1209-19.
44. Turner MV. The role of mannose-binding lectin in health and disease. [Mol Immunol](#). 2003 Nov.;40(7):423-9.
45. Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, Ywata K, Matsumoto M, Kanai K et al. Hepatitis C vírus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. *Arch. Virol.* 1998; (143): 645-51.
46. I Laursen, G Houen, P Højrup, N Brouwer, L B Krogsøe, L Blou, P R Hansen. Second-generation nanofiltered plasma-derived mannan-binding lectin product: process and characteristics. *Vox Sanguinis*, v92, p338-350, 2007.
47. Alves AEM, Costa MRM, Lobato L, Fernandes LM, Azevedo VN, Moreira MRC et al. O impacto do polimorfismo no GENE Mbl (Mannose-Binding Lectin) pelo Vírus da imunodeficiência humana (HIV). Revista científica da UFPA (Internet) 2004 abr.(acesso em 2013 dez. 28);4:aproximadamente de 10 páginas. Disponível em: <http://www.ufpa.br/revistaic>.

48. Super, M., Thiel, S., Lu, J., Levinsky, R.J., Tunner, M.W., 1989. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect in opsonisation. *Lancet* 2, 1236-1239.
49. Turner, M.W., Dinan, L., Heatley, S., et al. Restricted polymorphism of the human molecular genetics mannose-binding lectin gene of indigenous Australians. *V.9*, n. 10, p. 1481-86, 2000.
50. Garred P. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochem. Soc. Trans.* 2008; 36:1461-6.
51. Ambrosio, A.R.; de Messias-Reason, I. J. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defense mechanism. , v. *Parasite Immunology* 27(9), p. 333-340, 2005
52. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency – revisited. *Molecular immunology* 2003;40(9):73-84.
53. Turner, M.W. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunobiology* 199:327–339, 1998.
54. Turner, M.W., Hamvas, R.M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and Reviews in Immunogenetics, 2 disease associations:305–322, 2000.
55. Garred P., Harboe M.T., Koch, C., Svejgaard A., Dual role of mannan-binding protein in infections: another case heterosis? *Eur J immunogenet.* 1994; 21: 125-31.
56. Fitness J, Floyd S, Warndorf DK, Sichali L, Mwaungulu I, Crampion AC, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the

Karonga district oh northern malawi, Am J Trop Med Hyg 2004: 71:330-40.

## 5. ARTIGOS

5.1 HANSENÍASE: identificação das áreas de maior risco em um município do Nordeste do Brasil

5.2 Antipgl1 serum prevalence in household contact in hansen's diseases cases in risk areas of the municipality of Recife- PE

5.3 *MBL2* gene variants are associated to paucibacillary leprosy and to IgM anti-pgl-1 positive serology in male household contacts

**ARTIGO 1**

HANSENÍASE: identificação das áreas de maior risco em um município do Nordeste do Brasil

LEPROSY: identification of high-risk areas in a city of northeastern Brazil

Submetido a Revista Ciência e Saúde Coletiva

Fator de impacto 0,425

**HANSENÍASE: identificação das áreas de maior risco em um município do Nordeste do Brasil**

**LEPROSY: identification of high-risk areas in a city of northeastern Brazil**

\*Jacyra Salucy Antunes Ferreira- Universidade de Pernambuco-Faculdade de Enfermagem Nossa Senhora das Graças. Rua Arnóbio Marques 310, Santo Amaro.50100-130 Recife PE

\*\*\*\*Mirella Bezerra Rodrigues Vilela- Docente da Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de Fonoaudiologia

\*\*\*\*\*Yane Ferreira Cardoso – Aluna do curso de Graduação em Enfermagem da Universidade de Pernambuco

\*\*\*Patricia Moura – Docente da Universidade de Pernambuco – Instituto de Ciências Biológicas.

\*\*Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti – Docente da Universidade de Pernambuco – Instituto de Ciências Biológicas.

**RESUMO**

Estudo do tipo ecológico que teve como objetivo caracterizar a ocorrência da hanseníase em Recife identificando áreas de maior risco e sua relação com o indicador de carência social. Foram utilizados os dados do Sistema de Notificação de Agravos Notificáveis (SINAN) municipal (para morbidade) e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para construção do indicador de carência social. A partir do coeficiente de detecção da hanseníase e do indicador de carência social, os bairros foram estratificados em quintis e distribuídos em cinco posições de risco segundo o Ministério da Saúde

(baixo risco, médio risco, alto risco, muito alto risco e hiperendêmico). Para a determinação da correlação entre as variáveis coeficiente de detecção da hanseníase e o indicador de carência social, calculou-se o coeficiente de correlação de Spearman e a regressão linear utilizando-se o programa Stata 12.0. Os resultados do estudo demonstraram uma relação diretamente proporcional, porém fraca, apresentando-se mais forte no Distrito Sanitário V (0,479). Apesar de vários estudos demonstrarem uma relação entre condição e vida e casos de hanseníase, em Recife essa relação mostrou-se de fraca intensidade provavelmente devido à heterogeneidade de sua composição do ponto de vista ambiental e populacional.

Palavras Chaves: Hanseníase, condição de vida, desigualdade social.

## **ABSTRACT**

This ecological study was aimed at characterizing the occurrence of leprosy in Recife by identifying the areas of greatest risk and their relation to the social deprivation indicator. Data for morbidity were collected in the Information System of Notifiable Diseases (SINAN in Portuguese) and data for the construction of the social deprivation was provided by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE in Portuguese). From the detection of the rate of leprosy and that of social deprivation, the districts were stratified into quintiles and distributed into low risk, medium risk, high risk, very high risk and hyperendemic position according to the Ministry of Health. To determine the correlation between the detection rate of leprosy and the social deprivation indicator, we calculated the Spearman correlation coefficient and linear regression using the statistical software package, Stata 12.0. Though weak, a directly proportional relationship was shown in the results of the study. It was stronger in the Sanitary District V (0.479). No matter some studies have shown there is a strong relationship between living conditions and the leprosy cases, our study showed

this relationship to be of low intensity probably because of the heterogeneity of the city composition in terms of environment and population.

Key Words: Leprosy, life conditions, social inequality.

## INTRODUÇÃO

O comportamento das Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) tem mudado em todo o mundo nas últimas décadas. Alguns determinantes, como transformações econômicas e sociais e a influência de novas tecnologias médicas, o avanço científico e tecnológico, configuram entre os mais importantes para essa modificação. Entretanto, apesar desses avanços a infecção pelo *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase, persiste como um problema de saúde pública, principalmente nas regiões tropicais do mundo<sup>1</sup>.

Nos países em desenvolvimento, existe grande preocupação pelo elevado número de novos casos da doença a cada ano. O Brasil ocupa a segunda colocação em números de pessoas atingidas no panorama mundial somente ficando atrás da Índia<sup>2</sup>. No cenário do continente americano, o país congrega 80% dos casos<sup>3</sup> tendo registrado, apenas em 2007, quase 40 mil novos casos<sup>4</sup>. A doença é observada em todas as regiões brasileiras com maior magnitude Norte e Nordeste. O sul do país é o que apresenta o menor número de casos, particularmente na última década<sup>5</sup>.

Neste cenário o estado de Pernambuco apresentou tendência crescente na detecção geral para a Hanseníase, no período de 1987 a 2003, verificando-se, nos anos seguintes, tendência decrescente, saindo da classificação de hiperendemicidade para endemicidade muito alta, segundo os critérios preconizados pela OMS. Entretanto, a

ocorrência da doença entre os menores de 15 anos, classifica Pernambuco como hiperendêmico evidenciando a presença de fontes de transmissão ativa da doença e endemia oculta existente na área <sup>6</sup>.

Ademais se observa a desigualdade na distribuição espacial da hanseníase em Pernambuco com maior concentração de casos na região metropolitana (60% dos casos), configurando uma endemia urbana. Recife, capital do estado, é classificado pelo Ministério da Saúde como hiperendêmico, sendo responsável por 30% dos casos diagnosticados no Estado e considerado prioritário para o controle da hanseníase. Com relação a I Regional de Saúde, o município ocupa a 8ª e a 4ª colocação na população geral e em menores de 15 anos, respectivamente<sup>6</sup>.

As condições socioeconômicas e culturais têm grande influência na distribuição e propagação da endemia da hansen, apresentando uma estreita relação com as condições precárias de habitação, baixa escolaridade e ainda, com movimentos migratórios que facilitam a difusão da doença, partindo do princípio que a ocupação espacial da população é um processo socialmente construído<sup>7</sup>. O espaço social é determinante no processo saúde-doença, sendo as condições de vida da população a expressão mais significativa desse processo, indicando a necessidade de identificar indicadores específicos de condições de vida que permitam associá-los<sup>7</sup>.

O estudo de sua distribuição espacial visando identificar grupos residentes em áreas que ofereçam maior risco de adoecer pode auxiliar no planejamento, implementação, monitoramento e avaliação de ações voltadas para a prevenção e o controle dessa doença<sup>8</sup> verificando-se no Brasil um interesse pela exploração de técnicas de representação espacial de dados na área de saúde e, em especial, da hanseníase <sup>08,09</sup>.

Este estudo teve como objetivo caracterizar a ocorrência da hanseníase em Recife identificando áreas de maior risco e sua relação com o indicador de carência social.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este é um estudo do tipo ecológico desenvolvido no município do Recife. A capital pernambucana tem uma população de 1.537.704 hab<sup>10</sup> distribuída numa área geográfica de 218 km<sup>2</sup>, composta por 1842 Setores Censitários (SC) que se agregam em 94 bairros.

Os dados de morbidade da hanseníase foram extraídos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) municipal, sendo considerados todos os casos residentes em Recife notificados no período de 2006 a 2010. A partir destes dados foram calculados os indicadores: coeficiente de detecção por Distrito Sanitário, sexo e faixa etária; proporção de casos novos segundo classificação operacional e forma clínica; proporção de contatos de casos novos registrados e examinados; de casos novos segundo modo de entrada e segundo grau de incapacidade no momento do diagnóstico. Para construção desses indicadores utilizou-se como denominador a população para o meio do período (2008) <sup>11</sup>.

Para a construção do Indicador de Carência Social (ICS) utilizou-se a técnica de formação de escores baseado em trabalhos anteriores<sup>12, 13, 14</sup>. Os dados foram extraídos do Censo Demográfico 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) com a seguinte composição de variáveis: abastecimento de água; esgotamento sanitário, renda do responsável pelo domicílio, alfabetização do responsável pelo município e densidade intradomiciliar.

A partir do coeficiente de detecção e do indicador de carência social, os bairros foram estratificados em quintis e distribuídos em cinco posições de risco segundo o Ministério da Saúde em: baixo risco (32,59 – 127,21/100,000 hab), médio risco (127,21-192,65/100.000 hab), alto risco (192,65-248,93/100.000 hab), muito alto risco (248,93- 396,36/100.000 hab) e hiperendêmico (396,36-1071,35/100.000 hab).

Para a determinação da correlação entre as variáveis coeficiente de detecção da hanseníase e o Indicador de Carência Social (ICS) calculou-se o Coeficiente de Correlação de Spearman e a regressão linear utilizando-se o programa Stata 12.0.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Entre 2006 e 2010 foram notificados 4720 casos de hanseníase no município do Recife. O maior coeficiente de detecção do período foi observado no DS II (342,77/100.000 hab) e o menor no DS VI (211,96/100,000HAB) (Grafico1), demonstrando a heterogeneidade da distribuição da hanseníase no município, a exemplo do que se observa em todas as regiões do país <sup>15</sup>.

A doença teve maior ocorrência entre os maiores de 15 anos (61,60/100.000 hab) e no sexo masculino (52,33/100.000 hab) (Tabela 1). Este resultado ratifica os dados de outros estudos que demonstraram que a hanseníase acomete mais indivíduos de 25 a 54 anos e no sexo masculino devido ao menor procura aos serviços de saúde, bem como menor preocupação desses com seu corpo e estética, levando a demora no diagnóstico<sup>16</sup>.

Dentre os casos novos, a classificação operacional paucibacilar foi a que apresentou maior proporção variando de 51,10% a 57,70%, sendo a forma tuberculóide a de maior proporção (31,4%). Dentre os classificados como multibacilar prevaleceu a

forma dimorfa (22,7%) (Tabela 1). Estudos anteriores mostram que a forma multibacilar é mais comum em adultos podendo ser justificado pelo longo período de incubação nessa forma da doença<sup>17</sup>.

A incapacidade física e deformidades são os principais problemas da hanseníase uma vez que atinge maior proporção de pessoas em idade produtiva que por vezes podem ter cessado suas atividades laborais e serem excluídos da cadeia produtiva<sup>18 e 19</sup>. Neste estudo, o coeficiente de detecção segundo grau de incapacidade avaliado no momento do diagnóstico variou de 24,97 para grau 0 a 1,07 para o grau II. Observaram-se também altos coeficientes de detecção para os casos não avaliados e ignorados (5,5/100.000 hab e 35,8/100.000 hab respectivamente) chamando a atenção para a falta de avaliação por parte dos profissionais de saúde durante a primeira consulta.

Analisando a situação dos contatos, observou-se que em todos os anos do estudo, os contatos registrados apresentaram maior proporção que os examinados variando entre 15,8% em 2007 e 69,3% em 2009. Dentre os contatos examinados na faixa etária de 0-14 anos, o sexo masculino apresentou maior coeficiente de detecção, enquanto na faixa etária de maiores de 15 anos o sexo feminino apresentou maior coeficiente (Tabela 1). Esse resultado deixa evidente a necessidade de maior investimento nos exames de contatos, uma vez que a transmissão da doença ocorre de indivíduo para indivíduo e esse grupo constitui-se num fator de risco para o agravamento<sup>19</sup>. Apesar disso, alguns estudos desenvolvidos na Polinésia Francesa por Chateau e colaboradores em 1993 e no Rio de Janeiro encontraram proporção pequena de casos em contactantes intradomiciliares<sup>20,21</sup>.

A análise de situação de saúde deve ser tratada juntamente com a ocupação do espaço urbano associando questões como a divisão social do trabalho e a distribuição de

renda, visto que o espaço urbano apresenta diversas realidades e a trajetória de sua ocupação indica que o território não deve ser compreendido apenas como espaço físico, devendo-se considerar também, as condições de vida e como as pessoas se apropriam desse espaço. Isto faz com que determinadas áreas fiquem mais vulneráveis ao risco de adoecer<sup>9</sup>.

A figura 1 evidenciou as áreas de maior concentração de casos onde os bairros apresentaram os maiores coeficientes de detecção. Esse fato pode ser explicado pela alta densidade demográfica e a baixa condição de vida da população. Tem-se que considerar também que a unidade de análise bairro já é heterogênea em sua conformação<sup>21</sup>.

O ICS foi estratificado em quintis de risco de acordo com a condição de vida e classificados em: Baixo Risco; Médio Baixo Risco; Médio Alto Risco; Alto Risco e Muito Alto Risco (Figura 1). A distribuição desse indicador por Distrito Sanitário mostrou que o DS I apresentou uma maior proporção de bairros no estrato de muito alto risco (27,8%) enquanto que o DS IV o menor (8,3%). Com relação a maior proporção de bairros no estrato de baixo risco observamos o DS VI com 31,25 % e o DS IV com 0% (Figura 1).

A comparação entre o coeficiente de detecção de Hanseníase e o ICS, estratificados em quintis de risco, mostrou uma relação diretamente proporcional, ou seja, para maiores ICS obtiveram-se maiores coeficientes de detecção. Entretanto, quando calculado o coeficiente correlação de Spearman, observou-se que em Recife e em todos os Distritos Sanitários a correlação mostrou-se positiva, porém fraca, apresentando-se mais forte no Distrito Sanitário V (0,479), podendo ser explicado pela sua maior homogeneidade em relação aos demais (Tabela 2). Não houve significância estatística para todas as áreas do estudo ( $p > 0,05$ ).

A existência de casos nas áreas de baixo e médio risco pode ser explicada pelo menor acesso aos serviços e saúde mais organizados e por isso mais eficazes na detecção dos casos da doença. Por outro lado, pode-se dizer também que apesar dessas áreas apresentarem diferenças em relação às demais (alto risco), todas se encontram inseridas num contexto geral do município <sup>15</sup>.

As unidades de análise (bairros) posteriormente agregados em Distritos Sanitários, como forma de controlar as flutuações aleatórias devido aos pequenos números, provocou a perda de homogeneidade e isso pode ter interferido no alcance da significância estatística. Além disso, os dados do SINAN, apesar dos avanços na cobertura e qualidade, ainda estão sujeitos à subnotificação.

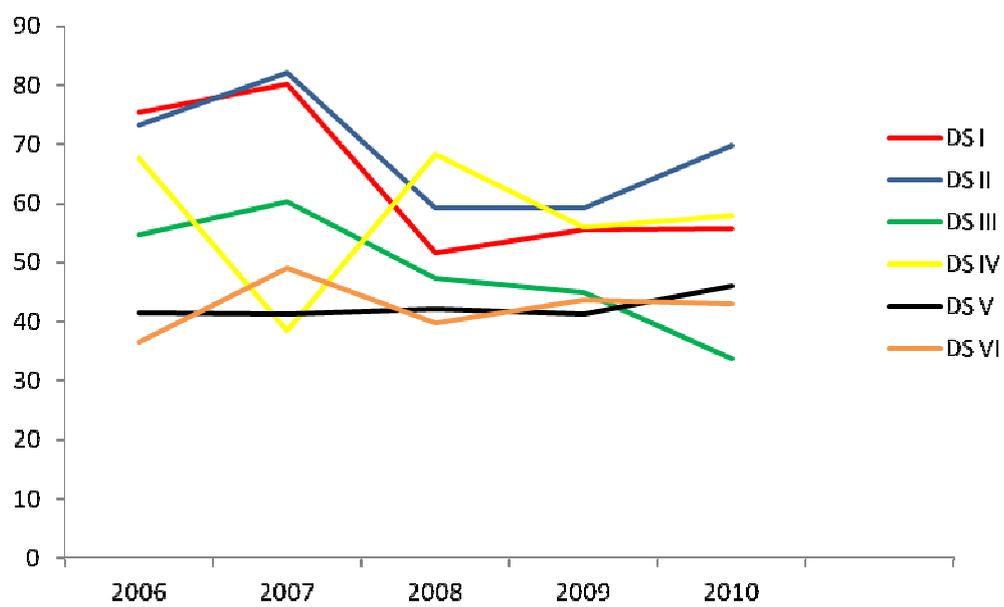
Áreas com detecção média acima do esperado pode indicar uma força maior de transmissão da hanseníase nessa área e/ou serviços de saúde mais eficientes no diagnóstico. Por outro lado, áreas onde a detecção média encontra-se abaixo do esperado pode evidenciar subnotificação de casos e diagnóstico tardio devido à falha no serviço de saúde, devendo alertar para a necessidade de intensificação das ações de controle do agravo <sup>22</sup>.

Dessa forma, pode-se concluir que apesar de vários estudos demonstrarem uma relação entre condição e vida e a existência de casos de hanseníase, no município do Recife essa relação mostrou-se de fraca intensidade provavelmente devido à heterogeneidade de sua composição do ponto de vista ambiental e populacional, sendo oportuno novos estudos que avaliem a relação entre esses indicadores em unidades de análise menores que venham a garantir a homogeneidade da amostra.

## REFERÊNCIAS

1. Martelli CMT, Stefani MMA, Penna GO, Andrade ALSS. Epidemiologia da hanseníase. In: Tallari S, Neves. **Hanseníase**. 4. ed. Manaus: [s.n.]; 2006. cap.13, p. 161-170.
2. [Sasaki S](#), [Takeshita F](#), [Okuda K](#), [Ishii N](#). *Mycobacterium leprae* and leprosy: a compendium. **Microbiology and immunology** 2001; 45(11):729-736.
3. WHO (World Health Organization). Global leprosy situation 2006. **Weekly epidemiological record** 2006; 81:209–316.
4. WHO (World Health Organization). Global leprosy situation. **Weekly Epidemiological Record** 2008; 33(83):293–300.
5. Brasil. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2004**: uma análise da situação de saúde. Brasília/DF; 2006.
6. Pernambuco. Secretaria Estadual de Saúde. **Perfil Epidemiológico da Hanseníase**. Recife; 2011.
7. Lapa T, Ximenes R, Silva NN, Souza W, Albuquerque MFM, Campozana G. Vigilância da hanseníase em Olinda, Brasil, utilizando técnicas de análise espacial. **Cad Saúde Pública** 2001; 17(5): 1153-62.
8. Opromolla PA, Dalben I, Cardim M. Análise da distribuição espacial da hanseníase no Estado de São Paulo, 1991-2002. **Rev Bras Epidemiol** 2005; 8(4): 356-64.
9. Mencaroni DA. **Análise espacial da endemia hanseníase no município de Fernandópolis/SP** [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2003.
10. BRASIL, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. , Censo Demográfico 2010. Disponível em <http://censo2010.ibge.gov.br/> acessado em 31/08/2012.
11. Imbiriba ENB, Silva Neto AL, Souza WV, Pedrosa V, Cunha MG, Garnelo L. Desigualdade social, crescimento urbano e hanseníase em Manaus: abordagem espacial. **Rev. Saúde Pública** 2009; 43 (4): 656-65.
12. SOUZA, W. V. **O uso de informações sócio-econômicas na construção de indicadores de situação coletiva de risco para a ocorrência de tuberculose em Olinda – PE**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Núcleo de Estudos em Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 1998.

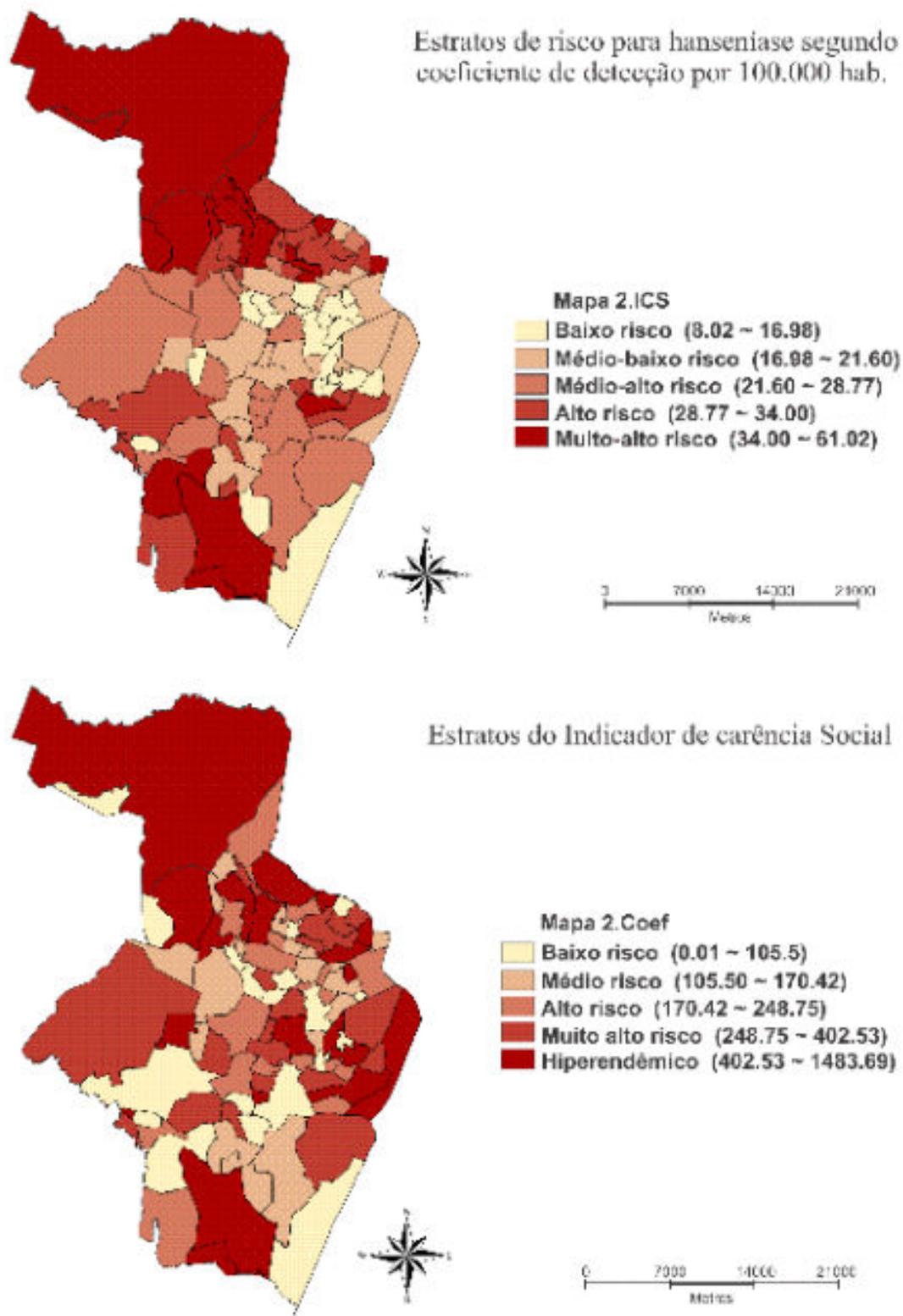
13. Ximenes RAA et al. Vigilância de doenças endêmicas em áreas urbanas: a interface entre mapas de setores censitários e indicadores de morbidade. *Cadernos de Saúde Pública* 1999; 15(1): 53 -61.
14. Bonfim CV. *Filariose Brancoftiana*: a representação espacial das desigualdades sociais. Recife, 2002. Dissertação (Mestrado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2002.
15. Lana FCF, Velásquez-Melendéz JG, Lanza FM, Branco AC, Teixeira S, Malaquias LC et al. Transmissão e controle da hanseníase no município de Governador Valadares/MG – Período de 1990 a 2000. *Hansen Int* 2002; 27(2): 83-92.
16. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnósticos diferencial. *Medicina* 1997; 30:325-34.
17. Gomes CCD, Pontes MAA, Gonçalves HS, Penna GO. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em um centro de referência na região nordeste do Brasil. *An Bras Dermatol* 2005; 80(Supl. 3): S283-8.
18. Duarte MTC, Ayres JA, Simonetti JP. Socioeconomic and demographic profile of leprosy carriers attended in nursing consultations. *Rev Latino-Am Enfermagem* 2007; 15(esp): 774-9.
19. Chanteau S, Glaziou P, Plichart C, Luquiaud P, Plichart R, Faucher JF et al. Low predictive value of PGL-1 Serology for the early diagnostic of leprosy in family contacts: results of a 10-year prospective field study in French Polynesia. *Int Lepr Other bMycobact Dis* 1993; 61:533-41.
20. Souza WV, Barcellos CC, Brito AM, Carvalho MS, Cruz OG, Albuquerque MFM et al. Aplicação do modelo bayesiano empírico na análise espacial da ocorrência da hanseníase. *Rev Saúde Pública* 2001; 35(5): 474-80.
21. Matos HJ, Duppre N, Alvim MFS, Vieira LMM, Sarno EM, Struchiner Cj. Epidemiologia da hanseníase em coortes de contatos intradomiciliares no Rio de Janeiro (1987-1991). *Cad Saúde Pública* 1999; 15: 533-42.
22. Barcellos CC, Sabroza PC, Peiter P, Rojas LI. Organização Espacial, saúde e qualidade de vida: análise espacial e uso de indicadores na avaliação de situações de saúde. *Informe Epidemiológico do SUS* 2002; 11(3): 129-138.

**Gráfico 1 - Coeficiente de Detecção de Hanseníase em Recife - 2006-2010**

**Tabela 1 - Descrição dos casos de Hanseníase em Recife no período de 2006-2010**

<b>Característica</b>	<b>Número</b>	<b>Coef. Detecção/período</b>
<b><i>Sexo</i></b>		
Masculino	1935	52,33
Feminino	2193	51,55
<b><i>Faixa Etária</i></b>		
<15 anos	511	24,56
>15 anos	3117	61,60
<b>Característica</b>	<b>Número</b>	<b>Proporção/período</b>
<b><i>Classificação Operacional</i></b>		
Paucilbacilar	2325	56,30
Multibacilar	1800	43,60
Ign/Branco	03	0,10
<b><i>Forma Clínica</i></b>		
Indeterminada	825	20,00
Tuberculoide	1296	31,40
Dimorfa	937	22,70
Virchowiana	407	9,90
Não Classificada	196	4,70
Ign/Branco	467	11,30
<b><i>Contato</i></b>		
Registrado	14.479	66,60
Examinado	7.246	33,40
<b><i>Modo de Entrada</i></b>		
Caso Novo	4.128	92,00
Transferências	203	4,50
Recidiva	158	3,50

**Figura 1- Estratos de risco para hanseníase em Recife segundo coeficiente de detecção por 100.000 hab. e Indicador de Carência Social (ICS)**



**Tabela 2- Medida de correlação e função da regressão linear entre o coeficiente de detecção de hanseníase (por 100.000 habitantes) no período de 2006 a 2010 e o Índice de Carência Social.**

<b>Localidade</b>	<b>Coefficiente de correlação Spearman</b>	<b>p-valor</b>	<b>Regressão linear</b>
<b>Recife</b>	0,150	0,149	182,4 + 3,68 * ICS)
<b>DS I</b>	0,214	0,527	177,7 + 4,63 * ICS)
<b>DS II</b>	0,154	0,542	209,7 + 4,00 * ICS)
<b>DS III</b>	0,073	0,707	161,7 + 1,78 * ICS)
<b>DS IV</b>	0,098	0,762	-57,2 + 19,1 * (ICS)
<b>DS V</b>	0,479	0,060	- 387,8 + 26,7 * (ICS)
<b>DS VI</b>	0,024	0,955	196,0 + 1,48 * (ICS)

**ARTIGO 2**

**ANTIPGL1 SERUM PREVALENCE IN HOUSEHOLD CONTACT IN HANSEN'S  
DISEASES CASES IN RISK AREAS OF THE MUNICIPALITY OF RECIFE- PE**

Submetido a Leprosy Review

Fator de impacto 0,857

**ANTIPGL1 SERUM PREVALENCE IN HOUSEHOLD CONTACT IN HANSEN'S DISEASES CASES IN RISK AREAS OF THE MUNICIPALITY OF RECIFE- PE**

Jacyra Salucy Antunes Ferreira\*

Luydosn Richardson Silva Vasconcelos\*\*

Marcus Túlio Batista Wanderley \*\*\*

Patricia Moura\*

Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti\*

\*Docente da Universidade de Pernambuco

\*\*Instituto de Ciências Biológicas- Instituto do Fígado- Universidade de Pernambuco

\*\*\*Graduando em Ciências Biológicas – Universidade de Pernambuco

**Correspondence to:**

Jacyra Salucy Antunes Ferreira. Faculdade de Enfermagem Nossa Senhora das Graças. Rua Arnóbio Marques 310, Santo Amaro. CEP 50100-130 Recife PE, Brazil. [jacyrasalucy@uol.com.br](mailto:jacyrasalucy@uol.com.br) Tel. 55(81) 99644904.

## ABSTRACT

Cross-sectional study aiming to verify the positivity of the anti PGL-1 frequency in household contacts in Hansen's disease cases (HD) in the high risk areas of the municipality of Recife from 2006 to 2013, and its relation with the variables: gender, age, operational classification, clinic form and relation type. The household contacts, notified in the Notification System of the Municipality Health Secretary, any age, residing or has resided with the leprosy patient in last 5 years were included in the study. The sample was composed of 250 household contacts. The tests were made in the laboratory molecular biology of virus of the University of Pernambuco. To identify the specific *M. leprae* antibodies, the sugar phenolic glycolipid-I (PGL-1) in human serology the ML Flow test was used. For the association analysis among the variables of the study, the Pearson chi-Square test was made with  $p$  inferior to 0,05 and odds ratio with 95% CI, calculated through the 6.01 version of the GraphpadPrism software. The findings showed 36,80% anti-PGL1 antibody levels among the studied contacts, being higher among the female contacts (38,8%), the ones aged under 15- 38,8%, the multibacillary patient contacts (39,5%) and 1st degree relatives 36,24%. We can conclude that tests for detection anti-PGL-1 antibodies available is another diagnostic tool that can be used for diagnosis of subclinical infection, sero-epidemiological, therapeutic and mapping early detection of recurrence disease.

**Key words:** Hansen Disease; Anti-PGL-1; ML flow

## INTRODUCTION

Hansen's disease is an infectious illness of chronic evolution which affects preferably the skin and the peripheral nerves. It is a public health problem in Brazil<sup>1</sup>, cause physical deformities, encouraging the maintenance of stigma and social disadvantage in Hansen's affected people and their families<sup>2</sup>.

The WHO estimates that 25% of the patients have some degree of disability due to Hansen's disease, which denotes the existence of delayed detection, related with operational problems of coverage and low resolution condition in the health systems, besides the insidious evolutionary aspects inherent to the disease<sup>2</sup>.

The clinic diagnosis of the Hansen's disease in Brazil is the skin stain with sensibility loss, which is used as early diagnosis of the disease. Laboratory tests (histopathology, Mitsuda reaction, skin smear, and serology) when available, especially in reference centers, may be used in order to aid in the correct classification of these paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) patients<sup>3</sup>.

A positive skin smear classifies the MB patient, regardless of the number of skin lesions, but a negative result does not exclude the possibility of such diagnosis<sup>4</sup> This classification is necessary for the allocation of the patients in two available treatment regimes, and it is important to highlight that either PB or MB present different bacterial load and risks of developing relapses, disabilities and deformities. Studies show that through the operational classification proposed by the WHO, some patients are inadequately treated and predisposed to reactions for an undetermined time, and also a reactivation of the disease or even a secondary resistance may be developed<sup>3</sup>.

The introduction of the polichemotherapy (PQT/ WHO), the identification of the groups at higher risk in prominent endemic areas, and the BCG vaccination are Brazilian measures which should contribute to the reduction of multibacillary forms of the disease. Nevertheless, due to operational problems, the effectiveness of such measures is compromised<sup>5</sup>.

The contacts of Hansen's disease patients are the individuals at higher risk of developing clinical disease<sup>7</sup>. Some studies reported that the risk of having this disease is to 14 times higher among the contacts of the multibacillary ones and two times higher in paucibacillary regarding the general population<sup>1</sup>.

Accompany the contacts has become necessary as to allow the interruption of the transmission and the utilization of other diagnosis methods can collaborate with the identification and tracking of such persons<sup>6</sup>. The use of serology and molecular markers arise as one option which may help in the elaboration of the chemo prophylaxis of the contacts, and as control measures of the disease<sup>7</sup>.

Rapid test serology represents one support option to the early diagnosis for the selection of these groups through the detection of antibodies against the antigen *phenolic glycolipid (PGL-1)*, specific of the *Micobacterium leprae*<sup>5</sup>. The detection of the antibodies antiPGL-1 suggests an *M. leprae* infection, and identifies individuals with greater risk of developing such disease. Besides, the PGL-1 is related to the bacillary load in patients with Hansen's disease, suggesting a multibacillary infection<sup>8</sup>. Douglas et al<sup>9</sup> showed that serum positive PGL-1 contacts have a higher risk of developing Hansen's disease when compared to serum negative PGL-1 contacts, and, when they develop the disease, they do it mainly in the multibacillary form (MB)<sup>9</sup>.

The use of the detection of the antiPGL-1 antibodies in leprosy patients contacts may help to identify individuals probably infected who may be incubating the disease , and therefore being a potential source of infection<sup>8</sup>, besides assisting, complementarily, in guiding actions of available control programs<sup>10</sup>.

The aim of this study was to determine the frequency of anti-PGL-1 positivity in household contacts of Hansen's disease cases, diagnosed in the period from 2006 to 2013, in the highest risk areas of the municipality of Recife, and their relationship with the variables gender, age, operational classification, clinical form and type of relationship.

## **Materials and Methods**

This is a cross-sectional study conducted in the city of Recife, Brazil. The state capital has a population of 1.537,704 inhabitants distributed in a geographical area of 218 km<sup>2</sup>, comprising 94 organized boroughs within 06 health districts.

From the Social Need Marker, the two areas of greatest risk for the development of Hansen's disease were identified, and thereafter a random sample of cases were selected for investigation. Household contacts as inclusion reported in the Notification Resulting System in Municipal Health Secretary in the period from 2006 to 2013, any age, residing or have resided with the leprosy patient in last 5 years were included in the study. The sample consisted of 250 household contacts of 250 Hansen's disease patients (1:1 ratio), the household contacts of cases that have been reported outside this period and the ones that were located outside the two areas of greatest risk were excluded.

The patients selected in the sample were invited to attend the health facility (Family Health Units and Reference Centers) with an accompanying person (household contact) where they received information and guidance on the research and after the agreement to participate in the study and signing of the informed consent form (ICF), 5 ml blood of the contact was collected .

The tests were performed in the laboratory of molecular biology of viruses, at the University of Pernambuco. ML Flow test - produced at Laboratory of Immunology of AIDS and Hansen's disease Institute of Tropical Pathology and Public Health ( IPTSP ) Federal University of Goiás ( UFG ) was used for the detection of specific antibodies to *M. leprae*-counter ( PGL - 1 ) in serum from household Hansen's disease cases. The test procedure was carried out by placing 5 µl of serum in the paper round receptacle samples and added 125 µ l of liquid packing the same receptacle and wait 10 minutes for reading the results. A negative result is indicated by the absence of a line in the test zone and the presence of a line in the control zone. A positive result is indicated by the presence of two lines: one divided in the test zone and the other in the control zone, which may vary in its intensity of discoloration.

To analyze the association between gender, age, operational classification; clinical form and type of relationship, a Chi-square test was performed with less than 0.05 and odds ratio with a confidence interval of 95% calculated by the 6.01 version of the GraphpadPrism software.

The project was approved by the Ethics and Research Committee of the University of Pernambuco under number 139 859 of 06/11/2012.

## RESULTS

Sera of the 250 household contacts of Hansen's disease (HD) cases in Recife were analyzed in ML Flow test and were distributed in all health districts (DS) as follows: 41.60% in DS II, 38% in DS III, 10.4% in DS V, 4.4% in the DS IV, 4% and 1.6% in DSI DS VI. Of these, 68% (170) were female, 85.60% (214) were aged over 15 (ranging between 7 and 70) with an average of 37.7 years, with a standard deviation of 18.8, the multibacillary patients contacts corresponded to 51.60% (129) and 30% were spouses or partners of the case (75) (Table 1).

The tests show a prevalence of anti-PGL1 antibodies between the contacts 36.80% (92). This seropositivity was higher in female contacts (38,8 %) than in males (32,5%). The territorial distribution showed that DS III (47.83 %) and II ( 31.52 %) have the highest number of positive contacts. Regarding age, 36,4 % (78 ) of the tests were positive for individuals over 15. The contacts of multibacillary patients showed a seropositivity of 39,5 % (51) while the paucibacillary accounted for 33,88 % (41), the virchow's and tuberculoid forms accounted for 41,30 % (32) and 39,10 % (25) respectively. The cases classified as paucibacillary whose contacts were positive in the test (41) were submitted to the test and showed a positivity of 31.70 % (13 ). As for positivity, regarding the type of relationship of the contact with the case, the largest proportions were within 1st degree relatives (parents , children and siblings (58.69 % ) , followed by the 3rd degree (spouse, son-in-law, daughter-in-law, mother-in-law, stepfather, stepson - 30.43% ) and 2nd degree (uncles, cousins, grandparents, grandchildren, nephews -10.87% ) the study variables showed no statistically significant differences ( Table 2 ) .

The time interval between the diagnosis of the case and the collection of blood for examination varied between 0-7 years and 6 months with 35,00% positivity for intervals shorter than 36 months, and 39.25% for intervals longer than 36 months, with no statistical significance .

## **DISCUSSION**

The ML Flow test positivity in contacts is an indirect marker of the spread of infection by the *Mycobacterium leprae* in the general population. In this study seropositivity among contacts was of 36.80%, being higher than in the studies of Calado et al<sup>11</sup>, Cruz et al<sup>8</sup> and Andrade et al<sup>1</sup> who showed prevalence ranging between 15% and 20.5%. Studies with the phenolic glycolipid-1 (PGL-1) applied to known risk groups, such as household contacts, show that there are varying seropositivity<sup>12</sup> percentages. This variation is related to differences in the immune response in different populations. A study in Nepal using the ML Flow test showed a seropositivity almost half of that observed in Brazil<sup>13</sup>.

According to the literature, there is no consensus regarding the highest seropositivity in men or women. Studies show high positivity in women as well as in men, sometimes with no differences between genders. The highest positivity of this study was among women (38,8%) and this is consistent with the findings of Cruz et al<sup>8</sup> which may be explained by the predominance of women in the study group, and the difficulty of the male contacts to attend the health service due to their greater participation in the job market<sup>8</sup>, however the difference in positivity for males is not relevant.

The seropositivity in this study was higher for the age group below 15 years (38.8%) compared to those over 15 years (36.4%). These data are discordant with several existing studies in the literature, like Calado et al<sup>11</sup> which showed higher seropositivity for more than 15 years. This positivity of those under 15 years old, may reflect an extensive and early exposure to Hansen bacillus, and good ability of immune sensitization of young people<sup>11</sup>. Nevertheless, the relationship between test positivity and age showed no statistically significant difference.

The analysis of the data obtained in this study has demonstrated a predominance of contacts of positive multibacillary cases (39,5%) at the expense of the paucibacillary ones, being the virchow's (41,30%) and tuberculoid (39,1%) forms highlighted, but its relationship with the positivity of the test showed no statistically significant differences. This fact may suggest that the index case is not the primary case nor the source of infection for the studied contact. The high prevalence of negative tests for multibacillary form may be related to the resistance of the people to the *M leprae* that prevents their sickening<sup>5</sup>.

To classify patients into paucibacillary and multibacillary according to the criteria of the World Health Organization is extremely important for the prescription of the treatment. However, some studies show that the use of this classification may provide inadequate treatment to the patients, and thus, predispose them to reactions for indefinite time, possibly generating the reactivation of the disease or even a secondary resistance. In this study, cases classified as paucibacillary, whose contacts were positive to the ML Flow test, were subjected to the same test and showed a positivity of 31.70% which may suggest misclassification and consequent inadequate treatment of these patients<sup>3</sup>.

The high prevalence of seropositivity among contacts of HD patients shows that subclinical infection with *M. leprae* is common, it is associated with the HD type of the patient involved. The type of leprosy and the degree of the relationship and proximity of the household contact with the index case are factors that contribute to the risk of becoming ill. Patients often are unaware of any previous contact with the disease, and most incident cases do not report previous contact with other patients. However, evidence shows that the fact of those people actually living in the same household as the HD patients increases the risk of developing the disease<sup>2</sup>.

In this study, we analyzed the relationship of the contacts with the cases and found a higher proportion of contacts within the relatives of 1st degree (36,2%) followed by the ones of 3rd degree (35,4%), but no statistically significant difference was found. This result is consistent with the findings of Martins et al<sup>5</sup>, who found a similar prevalence in these groups.

The Barreto Study in Castanhal, Amazon in 2010<sup>15</sup>, followed the serology of a cohort of patients and their contacts with leprosy and expect a reduction of the levels of the antibodies against PGL-1 to 25-50% per year after the start of the treatment multidrug therapy (MDT), but in some patients, the decline is slower, and seropositivity can persist for years after. This finding is consistent with the findings of our study since the positivity found is very similar in the intervals between the diagnosis of the case and the blood of the contact for less than 36 months (35,0%) and greater than 36 months (39,2%).

The high seroprevalence rate observed could be explained by: (1) inactive or dead bacteria that are still present in patients, (2) constant contact with a source of untreated infection, or (3) a first indicator of relapse since seropositivity is a risk factor

for the future development of relapses, especially in the groups of patients who had received an unusual shorter treatment. However, as the antibody levels evaluation had not been done in the beginning of the treatment, it is possible that these values had been higher at the moment of the test, which means that the titers of anti-PGL-I have simply gradually declined after MDT<sup>15</sup>.

The ML Flow test has a high degree of agreement with the ELISA test, not only for its easiness to use in the field but also its low cost. It has been an alternative for the diagnosis of multibacillary cases as well as to identify and household and neighboring domicile contacts, who should be followed clinically, in order to make early diagnosis of the disease, allowing the interruption of the transmission chain<sup>11</sup>.

The strategy for the leprosy control requires rapid detection and proper treatment, besides the emphasis on educational actions connected with the provision of accessible, determined and quality services. The application of the available tests for detection of anti-PGL-1 antibodies is another diagnostic resource that can be used for diagnosis of subclinical infection, sero-epidemiological mapping, therapeutic and early detection of disease recurrence<sup>11</sup>.

### **Acknowledgment**

Thanks to the teams of health workers of the municipality of Recife Family Health Units, and the students of the extension project of the University of Pernambuco.

### **Authors' Contribution**

Jacyra Salucy Antunes Ferreira participated in the planning, execution, analysis of results and writing of the article; Dr. Maria do Socorro Cavalcanti de Mendonça, Dr. Patricia Moura and Dr. Luydosn Richardson Silva Vasconcelos participated in the

planning, implementation, and revision of the article; Marcus Tullius Batista Wanderley participated in the execution of tests in the laboratory.

### **Patients consent form**

All individuals participating in this study were included after having signed the Informed Consent Form . (ICF)

### **Funding**

This work was funded by the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq through the research process support No. 404246/2012-5 and Netherlands Leprosy Relief - NLR.

### **REFERENCES**

1. Andrade ARC, Grossi MAF, Buhner-Sekula S, Antunes CMF. Soroprevalência do teste ML Flow em contatos de hanseníase de Minas Gerais. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2008;41(sup. 2):56-59.
2. Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Buhner-Sekula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-1:revisão sistemática. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2008;41(sup. 2):11-18.
3. Contin LA, Fogagnolo L, Barreto JÁ, Nogueira ME, Alves CJM, Nassif PW, Lauris JRP. Uso do teste ML Flow como auxiliar na classificação e

- tratamento da hanseníase. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 2011;86(1):91-5.
4. Grossi MAF, Leboeuf MAA, Andrade ARC, Lyon S, Antunes CMF, Buhner-Sekula S. The influence of ML Flow test in leprosy classification. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008;41(sup. 2):34-38.
  5. Martins ACC, Miranda A, Oliveira MLW, Buhner-Sekula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Brazilian Journal of otorhinolaryngology* 2010 set./out.;76(5):579-87,
  6. Silva BDS, Souza MR, Kipnis TL, Junqueira-Kipnis AP. Avaliação dos anticorpos séricos totais antiglicolípídeo fenólico de *Mycobacterium leprae* em indivíduos portadores de hanseníase e seus contatos domiciliares no estado de Goiás, Brasil. *Revista de patologia tropical* 2009 jul./set.;38(3):187-196.
  7. Cabral PB, Alves AR, Medeiros KBA, Castelo-Branco ES, Alencar CP, Nagão-Dias AT. Emprego de marcadores séricos e salivares anti-PGL-1 como parâmetros de exposição ocupacional ao *Mycobacterium leprae*. *Revista Panamericana de Infectologia* 2009;11 (1): 21-26.
  8. Cruz RCS, Cunha MGS, Vásquez FG. Prevalência de anticorpos Anti PGL-1 em contatos domiciliares de pacientes de hanseníase. *Caderno de saúde coletiva* 2009;17(1):261-271.
  9. Douglas JT, Cellona RV, Hirsch DS, Fajardo TT, Guido IS, Klatser PR. Serological reactivity and early detection of leprosy among contacts of lepromatous patients in Cebu. *Internacional journal of leprosy and other mycobacterial diseases* 1987;55:718-721.

10. Douglas JT, Worth RM. Field evaluation of an Elisa to detect antibody in leprosy patients and their contacts. *International Journal of Leprosy* 1984; 55(1):26-33.
11. Calado KLS, Buhner-Sekula S, Vieira AG, Oliveira MLW, Durães S. Positividade sorológica antiPGL-1 em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. *Na Bras de Dermatologia* 2005; 80(supl. 3): S301-6.
12. Brasil MTLRF, Oliveira LR, Rimoli NS, Cavalari F S, Gonçalves SO, Lessa ZL, Rotta O. Sorologia antiPGL-1 e risco de ocorrência de hanseníase em áreas de alta endemicidade do Estado de São Paulo: quatro anos de seguimento. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2003;6(3):262-71.
13. Buhner-Sekula S, Vlsschedijk J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam I. The ML Flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of patients. *Leprosy Review* 2007;78:70-79.
14. Barros RPC, Oliveira MLW. Detecção de anticorpos específicos para o antígeno glicolípido fenólico-1 do *M leprae* (anti PGL-1 IGM): aplicações e limitações. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2000 nov./dez.;75(6):745-753.
15. Barreto JG, Guimarães LS, Leão MRN, Ferreira DVG, Lima RAA, Salgado CG. Anti-PGL-1 Seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and schoolchildren from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. *Leprosy Review* 2011 dec.; 82(4):358-70.

**Table 1- General Characteristics of the household contacts of leprosy patients undergoing ML Flow test. Recife, 2006-2013.**

<b>Characteristic</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<b><i>Gender</i></b>		
Male	80	32,00
Female	170	68,00
<b><i>Age</i></b>		
< 15	36	14,40
>15	214	85,60
<b><i>Operational Classification</i></b>		
Paucibacillary	121	48,40
Multibacillary	129	51,60
<b><i>Clinic Form</i></b>		
Undetermined	57	22,80
Tuberculoid	64	25,60
Dimorph	83	33,20
Virchow's	46	22,40
<b><i>Relationship type</i></b>		
<b><i>1st degree</i></b>		
Son/Daughter	65	26,00
Siblings	22	8,80
Mother/ Father	62	24,80
<b><i>2nd degree</i></b>		
Grandmother	5	2,00
Grandchild	10	4,00
Nephew/ Niece	5	2,00
Aunt	1	0,40
<b><i>3rd degree</i></b>		
Spouse/ Partner	75	30,00
Daughter/ Mother-in law	4	1,60
<b><i>4th degree</i></b>		
Friend	1	0,40
<b><i>**Diagnostic and exam interval</i></b>		
< 36 months	143	57,20
>36 months	107	42,80

\*\* Time Interval between the diagnostic of the patient and test collection.

**Table 2 - Description of seropositivity of the ML Flow test in the household contacts of leprosy cases. Recife, 2006-2013.**

Characteristic	Positive		Negative		OR (IC 95%)	Valu p*
	N°	%	N°	%		
<b>Gender</b>						
Male	26	32.50	54	67.50	1,0	0,33
Female	66	38.80	104	61.20	1,3 (0,75-2,30)	
<b>Age</b>						
< 15	14	38.80	22	61.20	1,0	0,77
>15	78	36.44	136	63.56	0,90 (0,43-1,86)	
<b>Operational Classification</b>						
Paucibacillary	41	33.88	80	66.11	1,0	0,35
Multibacillary	51	39.50	78	60.46	1,27 (0,76-2,13)	
<b>Clinical Form</b>						
Undetermined	16	28.10	41	71.90	1,0	0,20
Tuberculoid	25	39.10	39	60.90	1,64 (0,76-3,53)	
Virchow's	19	41.30	27	58.70	1,0	0,75
Dimorph	32	38.50	51	61.40	0,89 (0,42-1,85)	
<b>Relationship type</b>						
<b>1° grau</b>						
Son/Daughter	29	44.61	36	55.40	1,0	0,20
Siblings	6	27.30	16	72.70	2,14 (0,74-6,19)	
Mother/ Father	19	30.60	43	69.40	1,82 ( 0,87-3,77)	0,10
<b>2nd. degree</b>						
Grandmother	2	40.00	3	60.00	1,0 ( 0,11-8,95)	1,0
Grandchildren	4	40.00	6	60.00	1,0	
Nephew/ Niece	3	60.00	2	40.00	0,44 ( 0,04-3,97)	0,60
Aunt	1	100.0	0	0.00	0,23 ( 0,007- 7,05)	
<b>3rd degree</b>						
Spouse/ Partner	25	33.33	50	66.70	1,0	0,12
Daughter/Mother-in-law	3	75.00	1	25.00	0,16 (0,01-1,68)	
<b>4th degree</b>						
Friend	0	0	1	100.0	-----	-----
<b>**Int. diagnostic and test</b>						
< 36 months	50	35.00	93	65.00	1,0	0,48
>36 months	42	39.20	65	60,80	0,83 (0,49-1,39)	

\* Pearson Chi-square test, OR = oddsration, CI = confidence interval.

\*\* Time interval between diagnosis of the patient and test colletion.

**ARTIGO 3**

***MBL2* GENE VARIANTS ARE ASSOCIATED TO PAUCIBACILLARY  
LEPROSY AND TO IgM ANTI-PGL-1 POSITIVE SEROLOGY IN MALE  
HOUSEHOLD CONTACTS**

Submetido a Revista Immunobiology

Fator de impacto 2.814

***MBL2* GENE VARIANTS ARE ASSOCIATED TO PAUCIBACILLARY  
LEPROSY AND TO IgM ANTI-PGL-1 POSITIVE SEROLOGY IN MALE  
HOUSEHOLD CONTACTS**

Short title: *MBL2* IN LEPROSY AND ANTI-PGL-1 RESPONSE IN  
CONTACTS

Authors:

Jacyra Salucy Antunes Ferreira<sup>1,2</sup>, Patricia Moura<sup>1\*</sup>, Luydson Richardson Silva Vasconcelos<sup>3</sup>, Rodrigo Feliciano do Carmo<sup>2,4</sup>, Taciana Furtado de Mendonça<sup>2,1</sup>, Kleyton Palmeira do Ó<sup>1</sup>, Carla Maria Mola de Vasconcelos<sup>1</sup>, Marcus Túlio Batista Wanderley<sup>1</sup>, Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti<sup>2</sup>

1 - University of Pernambuco, Recife, Brazil

2 - Post-Graduate Program-RENORBIO

3 - Liver Institute of Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

4 - Federal University of São Francisco Valley

\*Author for correspondence

Patricia Moura (patricia.moura@upe.br)

Address: Rua Arnobio Marques, 310, Santo Amaro, Recife, Pernambuco, Brazil.

Tel:+55 81 3183 3512

Fax:+55 81 3183 3510

**ABSTRACT**

Leprosy, a chronic disease of skin and nerves, caused by *Mycobacterium leprae* is classified in multibacillary (MB) and paucibacillary (PB), based on lower or higher bacilli count and number of nerve/lesions, respectively. *MBL2* SNPs causes structural and expression variations in the serum MBL and genetic variants related to higher levels were associated to MB leprosy. MBL may facilitate bacilli invasion by activating complement and facilitating bacilli phagocytosis. Also, the phenol glycolipid-1 (PGL-1), a cell wall antigen of *M. leprae* aids invasion into Schwann cells; and follow up of contacts of leprosy cases IgM anti-PGL-1 positive seems to be related to PB. Thus, we investigated the association of three *MBL2* SNPs to leprosy cases (n= 250) and also, the association of those SNPs with IgM anti-PGL-1 serology of their contacts (n= 247). It was used real time PCR TaqMan or Syber green chemistry for genotyping *MBL2*, and ML Flow test for IgM anti-PGL-1 serology contacts. The  $X^2$  test was used for univariate and binary logistic regression for multivariate analysis with  $p < 0.05$ . *MBL2* structural variant allele O and genotype OO were associated to PB in univariate ( $p= 0.034$  and  $0.003$ ) in man and cases older than 40 years; and in multivariate analysis the genotype OO also was independently associated to PB ( $p= 0.023$ ). Interestingly, the O allele and HYO and LYO haplotype were associated to IgM anti-PGL-1 positive serology ( $p= 0.046$  and  $0.032$ ). *MBL2* polymorphism may influence leprosy development by an efficient modulation of anti-PGL-1 response and low complement activation.

Keywords: Innate immunity; leprosy; *MBL2*; PGL-1; polymorphism.

## INTRODUCTION

Leprosy or Hansen disease (HD) is a human illness since ancient times, in which the skin and nerves are affected, caused by the infection with *Mycobacterium leprae* and the newly discovered *Mycobacterium lepromatosis* (Han et al., 2008). In the one pole of clinical manifestation is the tuberculoid form (TL), characterized by self-limited disease with few bacteria and in the other the lepromatous leprosy (LL) with disseminated skin lesions characterized by high bacilli load (Modlin, 2010). In order to provide a rapidly treatment even before the smear exam, an operational index classification was determined by an Expert Committee on Leprosy, in which the patients can be classified as paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) regarding the number of skin lesions (Britton and Lockwood, 2004; Eichelmann et al., 2013).

Genetic variations in the susceptibility of humans to leprosy involve complex traits of numerous polymorphic alleles (Eichelmann et al., 2013; Han and Silva, 2014). The mannose-binding lectin 2 gene (*MBL2*) polymorphisms have been associated to protection to lepromatous form of leprosy as well as to infection in Brazilian patients (de Messias-Reason et al., 2007; Sapkota et al., 2010). However this association was not confirmed in other studies (Fitness et al., 2004; Vasconcelos et al., 2011). MBL is a soluble pattern recognition molecule of innate immunity that has important role in scavenge and defence mechanisms, binding to DAMPs and PAMPs; exerting its effector functions by opsonization and coagulation and complement system activation (Takahashi, 2011).

The hypothesis, that high frequency of *MBL2* variant alleles was protective in leprosy was based in the functional analysis of this lectin; showing that the presence of MBL high oligomers measured by capture ELISA was diminished in tuberculoid form compared to lepromatous in African patients (Garred et al., 1994; Dornelles et al.,

2006). Interestingly, it was suggested that MBL levels maybe differ regarding the age and sex in patients with leprosy (Vasconcelos et al., 2011; Dornelles et al., 2006). MBL binds to sonicated antigens of *M. leprae* and also promotes enhancing of mycobacteria ingestion by phagocytes in vitro (Garred et al., 1994; Bonar et al., 2005). Then, low levels of MBL would prevent the phagocytosis of *M. leprae*, which could lead to low bacilli load.

*MBL2* polymorphisms in the structural region (exon 1; variants alleles B, C and D, also termed allele O) constrain the formation of high oligomerization of the MBL molecule, reducing the level of functional oligomers of MBL (Garred et al., 2003; Turner and Hamvas, 2000). Promoter polymorphisms does not interfere in the MBL structure, however the variant allele H (at -550 position) increases the protein serum levels, while the variant alleles X (at -221 position) diminish it (Turner and Hamvas, 2000). However, indirectly the effect of allele H associated to A or O alleles would give the enhancement of either MBL high oligomers or low oligomers, respectively.

In multibacillary patients the skin lesions present macrophages containing the bacilli and scant T lymphocytes resembling a no organized granuloma, indicating an evasion of immune response (Barnes et al., 1992). The phenolic glycolipid-1 (PGL-1) seems to be critical for the pathogenesis of leprosy, as it activates C3 directly, promoting uptake by macrophages via CR3, without activating strongly the oxidative burst (Schlesinger and Horwitz, 1991). PGL-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with macrophages directly via CR3 and inhibits infection-induced maturation of dendritic cells, suppressing the initiation of innate immune responses (Tabouret et al., 2010).

Additionally, the activation of the complement induced by PGL-1 could deviate the defence to Th2, and regulate B cell response by the complement system components products (Karsten and Köhl, 2012). Once, MBL can bind to sonicated *M. leprae* antigen (Garred et al., 1994) probably to the lipoarabinomannan (LAM), it may activates the complement onto the cell wall synergizing the PGL-1 effects on complement activation and B cell response modulation. The LAM of *M. leprae* may play a role in pathogen invasion thru the macrophage mannose binding receptor (MR), although, on other hand LAM also could stimulates TLR2 triggering the bacilli killing (Frota et al., 2010).

Regarding the use of anti-PGL1 serology to estimate the risk of leprosy in leprosy contacts and no known contacts, a study in approx. 800 participants from Northeastern Brazilians concludes that anti-PGL1 is not useful as immunological marker of leprosy (Frota et al., 2010). However, Bazan-Furini et al.(2011) studying household contacts for 1 year of follow up showed that the contacts, which had anti-PGL1 positive serology were at risk of developing leprosy, particularly in cases of linear consanguinity. Interestingly, household contacts positive for anti-PGL1 in follow up of 1 or 6 years showed PB leprosy diagnosis (Bazan-Furini et al., 2011; Cardona-Castro et al., 2009). Therefore, this study aimed to investigate the association of *MBL2* polymorphism in patients with different forms of leprosy and their household contacts, as well as the anti-PGL-1 serology of the cases contacts.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Patients and contacts**

This was a cross-sectional study with group of comparison conducted in the city of Recife, Pernambuco, Brazil. From the Social Need Marker (ICS), the two areas of

greatest risk for the development of HD were identified, and thereafter a random sample of cases was selected for investigation of *MBL2* frequencies in cases and contacts. It was defined as inclusion criterion, cases reported in the Notification Results System from Municipal Health Secretary Database (2006 to 2013) of residents in the two areas identified as high risk. The sample consisted of 497 patients, 247 household contacts of 250 patients. Patients selected in the sample had clinical and laboratory confirmed diagnosis of HD and either were on treatment or had been treated in local health units. It was defined as contacts all household individuals and any person residing or has resided with the leprosy patient in the last 5 years. The selected patients were invited to attend the health facility (Family Health Units and Reference Centres of Health Care) with an accompanying person (household contact) where they received information and guidance on the research. After agreeing to participate in the study and signing the informed consent form (ICF), 5 ml of blood from both patients and contacts were collected. The Ethic and Research Committee of the University of Pernambuco approved this study (No. 139859 of 06/11/2012).

## **2.2. DNA extraction and genotyping**

Peripheral blood was collected either in tube without additive for obtaining serum or tube containing anticoagulant (EDTA) for DNA extraction. Samples were stored at -20 degrees until use. For DNA extraction the Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, USA) was used following the manufacturer's instructions. The promoter region of *MBL2* gene was genotyped by real-time PCR, using specific probes, performed by the TaqMan system (Applied Biosystems, CA, USA). The probes and validated protocols for the regions -550 and -221 are available at <http://snp500cancer.nci.nih.gov>. For determination of alleles H/L, the following probes

and primers were used: FAM-MGB-AGCCTGTGTAAAAC, VIC-MGB-CCTGTCTAAAACACC, CCAACGTAGTAAGAAATTTCCAGAGA- forward, and reverse-CAACCCAGCCCAGAATTAAGT. For alleles X/Y, the following probes and primers were used: FAM-CATGCTTTCCGTGGCAG-MGB, VIC MGBCATGCTTTCCGTGGCAG, GCACGGTCCCATTTGTTCTCA-forward, and reverse -GCGTTGCTGCTGGAAGACTATAAA. Genotyping of the structural region (exon-1) of *MBL2* gene was performed using the technique of real-time PCR with melting temperature assay (MTA) according Vasconcelos et al. (2011). The three allelic variants of the *MBL2* gene in codon positions 52, 54, and 57 in exon-1 were designated 'O', and the wild-type allele designated 'A'.

### **2.3. Test anti-PGL-1 in household contacts of leprosy cases**

The ML Flow rapid test was used for *M. leprae* specific IgM anti-PGL-1 determination in the contacts' serum. This test was manufactured by the Laboratory of Immunology of AIDS and Hansen Disease Institute of Tropical Pathology and Public Health of the Federal University of Goiás (UFG), Brazil; and the methodology was described by Buhhrer-Sékula et al.(2007). Briefly, 5 µL of serum was added in the sample receptacle followed by addition of 125 µL of buffer, the reaction reading was done in 10 minutes. A negative result was indicated by the absence of a line in the test zone and the presence of a line in the control zone. A positive result is indicated by the presence of two lines: one in the test zone and the other in the control zone, which may vary in its intensity of discoloration.

## 2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software version 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). To test the Hardy-Weinberg construction of haplotypes it was used the program ARLEQUIN (version 3.11, Bern, Swiss). Considering that the variant homozygous genotype of *MBL2* gene showed a frequency of 6% in previously report [9], a sample of 250 cases and theirs household contacts 250 (proportion 1:1) was calculated for the study with power of 80% and confidence interval of 95%. Categorical variables were compared using the  $X^2$ . For quantitative data comparisons were performed using Student's t or Mann-Whitney U-test for parametric or non parametric test distribution respectively. Binary logistic regression was performed and the results are presented using odds ratios (OR) with 95% confidence interval. Differences were considered significant when the p value was  $< 0.05$ .

## RESULTS

To get insight in the frequency of dysfunctional variant of *MBL2* in those populations the genotypes were divided according the ability to oligomerization forms in OO (mainly low), AA (mainly high) and AO (low/high), since the oligomerization is essential for the many biological functions of MBL, the frequencies of cases and contacts studied population were in Hardy-Weinberg equilibrium. In Table 1 is shown the distribution of the cases of leprosy and their operating class and clinical forms regarding sex, age and *MBL2* first Exon-1 variants. The patients classified as MB included the severe clinical forms of the disease, Virchowian and Dimorph, while PB included Tuberculoid and Indeterminate forms. The age, sex and polymorphism of the

structural genotype differed between MB vs. PB classes. It was observed a higher frequency of OO genotype in PB vs. MB (0.02) (Table 1). MB patients were older than PB ones, whereas, males were more frequent MB vs. PB ( $p < 0.0001$ ).

The more detailed analysis regarding the *MBL2* gene polymorphisms at the promoter (-550 and -221) and structural (exon 1) regions of *MBL2* from the patients with leprosy is shown on Table 2, now distributing the population only by operational class regarding sex and age. It was shown in men an association between MB leprosy and the variant allele H, which is associated to higher production of serum MBL ( $p = 0.027$ , OR 1.9, 95% CI 1.0-3.69), as well with AA/AO, however with a large CI ( $p < 0.028$ , OR 7.0, 95% CI 0.7-70.0).

The association between the variant allele H with MB leprosy continued for those higher than 40 years old ( $p = 0.016$ , OR 2.04, 95% CI 1.10-3.88), as well with the structural allele A ( $p = 0.0234$ , OR 1.89, 95% CI 1.00-3.57), which is related to production of higher MBL oligomers. In addition, an association between AA/AO genotypes with MB patients in those  $> 40$  years ( $p = 0.003$ ) was observed.

Since, a multivariate analysis was performed with all population of PB and MB leprosy cases including as variables sex, age and promoter (-550 and -221) and exon 1 structural polymorphisms. Table 3 shows the results of the binary logistic regression, in which the variables male, age  $> 40$  years old and the AA/AO **genotypes were** independently associated to the risk for MB leprosy.

Table 4 shows the analysis regarding the anti-PGL-1 serology, 36.4% of the contacts of leprosy cases presented positivity by ML Flow, being 10.5% male and 25.9% female. The interquartile median time of exposure for the contacts from MB and PB cases was of 10 to 54 and 12 to 60 months old ( $p = 0.08$ ). There was no difference in

gender between the anti-PGL+ (F 54; M 26) and PGL- (F 103; M 54) ( $p= 0.77$ ). The median age in years of PGL+ and PGL- groups were 41 (25 – 56) and 31 (25 – 56), respectively ( $p= 0.0004$ ), possibly associated to the chronic course of the disease. However, considering specifically the group of male contacts the mean age of PGL+ and PGL- were  $27 \pm 3$  and  $31 \pm 3$ , respectively ( $p= 0.362$ ). For male contacts, it was shown that the variant allele O was associated to the risk for anti-PGL-1 positivity ( $p= 0.046$ , OR 1.97, 95% CI 1.90-4.40), as well as the haplotypes HYO and LYO ( $p= 0.032$ , OR 2.28, 95% CI 1.07-4.88). However, no association was found for genotypes of structural or promoter regions.

## DISCUSSION

Genetic studies suggest that variations in the susceptibility of humans to leprosy involve complex traits of numerous polymorphic alleles, which are related to the genes of innate immunity (Han and Silva, 2014; Fitness et al., 2004). Although, *MBL2* itself has not been shown as an important candidate gene for susceptibility to leprosy infection in the major genetic studies, the interplay of *MBL2* polymorphism with other genetic variations of innate immunity may be important for disease progression.

Our results showed that patients carrying the structural variant *MBL2* genotype (OO) had higher chance to be classified as paucibacillary compared to multibacillary class in multivariate logistical analysis ( $p= 0.023$ ). Additionally, it was investigated if in the health household contacts ( $n= 247$ ), the *MBL2* polymorphism was associated to anti-PGL-1 positivity. Interestingly, the frequencies of the structural allele A vs. O and the haplotypes HYA + LYA + LXA vs. HYO + LYO were different, being the minor allele

and haplotypes [O and HYO + LYO] associated to the risk for anti-PGL-1 positive test ( $p= 0.047$  and  $p= 0.032$ , respectively).

Our results showed that OO genotype is more frequent in PB patients, what suggests that absence of functional MBL oligomers could be important to determine events related to *M. leprae* pathogenesis. Firstly, since OO variant genotype is related to nonfunctional MBL, it would reduce deposition of C3b on bacilli, waning the uptake via CR3 (Schlesinger and Horwitz, 1991; Tabouret et al., 2010).

Secondly, the variant OO genotype produces low molecular weight oligomers, which present minor bind avidity to mannan (Garred et al., 2003) and could bind moderate amounts of LAM without complement activation. It would allow moderate access of LAM to C-type lectins on phagocytes (Koppel et al., 2004), which also has been involved in the invasion of mycobacteria, leading to inhibition of phagosome lysosome fusion (Kang et al., 2005). Although, at first contradictory, it would favour LAM and phosphatidylmyo-inositol capped lipoarabinomannan's (PILAM) accessibility to TLR2, and consequently stimulation of TNF and nitric oxide production by murine and human macrophages, which ultimately kills the pathogen (Krutzik and Modlin, 2004). Then, high levels of structurally functional MBL interacting with the mycobacteria mannan-bound antigens could balance negatively the TLR stimulation.

Indeed, LAM of *M. leprae* was shown to stimulates the release of TNF by PMBC and also production of this this cytokine was higher in lesions of patients with tuberculoid compared to lepromatous clinical form (Barnes et al.,1991; Balboa et al., 2010). Although, TNF serum levels are higher in multibacillary patients compared to paucibacillary, the in situ lesions of multibacillary patients the production of TNF is impaired. Moreover, in the mice lacking SIGNR1 model the *M. tuberculosis* infection

elicited T helper 1 response (Wieland et al., 2007). Also, in murine model, the SIGNR3, a DC-SIGN homologue, was shown to be expressed in the lung phagocytes interacting with mycobacterial glycoconjugates and mediating host protection by secretion of TNF and IL6 (Tanne and Neyrolles, 2010).

On the other hand, the mannosylated LAM (ManLAM), mostly found in pathogenic mycobacteria, like *M. leprae*, has been shown to have anti-inflammatory role, inhibiting the production of TNF and IL-12 by human dendritic cells (Nigou et al., 2001). In this case MBL could be protective, neutralizing the immune suppression mediated by ManLAM. In this context the *MBL2* heterozygous individuals for structural allele (AO), would have more advantage as has been suggested in the case of tuberculosis (Søborg et al., 2003). Nonetheless, depending of the combination of the A allele with the variants alleles (B, C or D), and the promoter variants (H/L or Y/X), the MBL activity maybe comparable to AA individual. In this case, studies discriminating the exon 1 specific allele and their activity of complement activation are more adequate to confirm this hypothesis.

Consequently, the effect in patients carrying genotype OO would be more evident than AO. Accordingly, in Nepalese patients the *MBL2* structural polymorphism was studied in patients with tuberculoid form (n= 327) vs. lepromatous (n= 551) showing higher frequency of *MBL2* BB variant genotype in patients with the tuberculoid form of leprosy compared to lepromatous (Sapkota et al., 2010). De Messias-Reasson et al., (2007) showed increased frequency of haplotypes of lower production of MBL in patients with tuberculoid form, however, no association with specific allele or genotype of structural region of *MBL2* was observed.

Unfortunately, this study was not addressed for specific allele genotyping, since the effect of MBL OO genotype would give us unquestionably insight in the MBL functionality. Nevertheless, specific allelic frequency at first exon of *MBL2* seems to be an important issue to further studies.

Evolution of *M. leprae* parasitism suggested that mycobacteria underwent a reductive evolution, specially, eliminating proteins involved in the host-pathogen interaction, which probably could avoid the host efficient immune response (Han and Silva, 2014). Conversely, despite the genome reduction, the genes related to the PGL-1 synthesis shows no related pseudogenes, suggesting conservation of this gene (Cole et al., 2001). In fact, PGL-1, in general, may stimulate preferentially humoral response opposing cellular immunity, which is more efficient in controlling the bacillus.

Therefore, the structural variants of *MBL2* may interfere with the subversion of the complement system function created by the adaptation of *M. leprae* against the effective immune response (Takahashi, 2011). The low molecular MBL oligomers generated by the variant OO probably have strong influence in the amounts of complement components formation leading to diminish bacilli entrance via CR3 or still are related to additional unknown complement independent mechanism. In this context, it was reported that low levels of MBL-associated serine protease 2 (MASP2), which initiates the activation of complement by lectin pathway, increased the susceptibility to leprosy in general, in particular to lepromatous form ( $p= 0.008$ , OR = 8.8) (Boldt et al., 2013)

This indicated that the complement and/or the pro-coagulant function of MASP2 could be important to avoid *M. leprae* immune evasion independently of MBL complement activation. Then, in MBL low oligomers (genotype OO) producers,

MASP2 still could bind to ficolins (FCN) and also could contribute with its thrombin-like to elicit the immune response, while MBL binding *M. leprae* antigens would be impaired, indicating that low complement activation, but preserved complement serine protease activity should balance the response to the bacilli. In this line, both FCN2 and *MBL2* low transcriptional activity were associated to paucibacillary leprosy (Zhang et al., 2013).

Alternatively, the effect of MBL deficiency may be evidenced by our analysis from *MBL2* frequency in the contacts of leprosy cases observed in this article. Regarding the frequency of *MBL2* and its association of anti-PGL-1 antibody of contacts may indicate that deficient or low levels of MBL may modulate the anti-PGL-1 immune response. In fact, it has been suggested that MBL has a modifying effect on the humoral immune response, which seem to be influenced by genetic environment (Ruseva et al., 2009). When deficient MBL-A and MBL-C mice were injected with hepatitis B surface antigen (HBsAg) they produce higher antibody titres than wild type mice, as well as a more efficient clearance of HBsAg from the circulation. Likewise, after immunization boosting, IgG anti-HBsAg titres were 10-fold higher in the MBL null mice compared to wild type (Ruseva et al., 2009).

Then, MBL seem to have a negative feedback regulation of adaptive immunity, however, this effect seem to depend on genetic environment. Accordingly, in another study MBL null mice showed increased T cell-dependent (TD) antigen response and high titres of specific antibodies to tetanus toxoid-conjugated group B streptococcus polysaccharide vaccine (Guttormsen et al., 2009). Interestingly, MBL null mice showed elevated B1b (CD5 negative) cells, which seem to have memory independently of lymphocyte T memory cells, which may be related to the high titers of pre-existing specific natural antibodies to HBsAg in those mice.

In this sense, it is possible that individuals carrying genotype OO may benefit from a MBL modulation towards TD antigens, which could triggers a more efficient response to *M. leprae*, leading to the development of more activated cellular immune and higher bacilli control as seen in the indeterminate and tuberculoid leprosy. It is important to recall that in the PB patients' group of the present study was constituted of tuberculoid 52% and 48% of indeterminate forms.

In a broad speculation, the presented results suggest that maybe occurred a balanced relation between *MBL2* exon 1 genotype OO and PGL-1 gene conservation driven, in part, by socio-environmental equilibrium, since the men presenting the MB manifestation would probably had higher chance of being isolated than PB patients (Vasundhra et al., 1983). This would maintain transmission of leprosy by PB patients (Morgado de Abreu et al., 2014), while increasing the breeding chance of OO genotype PB male patients reflecting different frequencies of *MBL2* genotypes in different population, accordingly their cultural features (Pitchappan, 2002).

Interestingly, the 3% of exon 1 *MBL2* deficiency genotypes frequency reported in this study from an area of greatest risk for the leprosy development was lower compared to 6% and 5% from Brazilian and Malawian cases (Vasconcelos et al., 2011) and slight higher compared to reported in the Nepalese patients (Sapkota et al., 2010). This suggests, that as observed in null MBL animal model, the effect of this genotype, in humans also may be influenced by genetic environment background (Ruseva et al., 2009; Guttormsen et al., 2009). Also, further works regarding BCG vaccination response on leprosy patients and *MBL2* OO genotype frequency maybe an interesting issue.

Ours results suggests that MBL deficiency related to genotype OO may influence PB leprosy development and that the variant allele O and haplotypes HYO and LYO are associated to positive IgM anti-PGL-1 serology, which might influence the further immune response and disease outcome. Additionally, herein we showed evidences that the *MBL2* exon 1 genotype OO may play a role in controlling leprosy progression, by a mechanism other than its purely involvement with activation of the complement system.

### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

This study was supported by the National Council for Research-CNPq grant 404246/2012-5.

### **REFERENCES**

- Balboa, L., Romero, M.M., Yokobori, N., Schierloh, P., Geffner, L., Basile, J.I., Musella, R.M., Abbate, E., de la Barrera, S., Sasiain, M.C., Alemán, M., 2010. Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell response by altering CD1b, DC-SIGN and MR profile. *Immunol Cell Biol.* 88, 716-726.
- Barnes, P.F., Chatterjee, D., Brennan, P.J., Rea, T.H., Modlin, R.L., 1992. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect Immun.* 60, 1441-1446.

Bazan-Furini, R., Motta, A.C., Simão, J.C., Tarquínio, D.C., Marques, W. Jr., Barbosa, M.H., Foss, N.T., 2011. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106, 536-540.

Boldt, A.B., Goeldner, I., Stahlke, E.R., Thiel, S., Jensenius, J.C., de Messias-Reason, I.J., 2013. Leprosy association with low MASP-2 levels generated by MASP2 haplotypes and polymorphisms flanking MAp19 exon 5. *PLoS One* 8, e69054.

Bonar, A., Chmiela, M., Rudnicka, W., Rózalska, B., 2005. Mannose-binding lectin enhances the attachment and phagocytosis of mycobacteria in vitro. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 53, 437-441.

Britton, W.J., Lockwood, D.N., 2004. Leprosy. *The Lancet* 363, 1209-1219. Bühner-Sékula, S., Visschedijk, J., Grossi, M.A., Dhakal, K.P., Namadi, A.U., Klatser, P.R., Oskam, L., 2007. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Lepr Rev.* 78, 70-79.

Cardona-Castro, N., Beltrán-Alzate, J.C., Romero-Montoya, M., 2009. Clinical, bacteriological and immunological follow-up of household contacts of leprosy patients from a post-elimination area - Antioquia, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104, 935-936.

Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R., Barrell, B.G., 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007-1011.

de Messias-Reason, I.J., Boldt, A.B., Moraes Braga, A.C., Von Rosen Seeling Stahlke, E., Dornelles, L., Pereira-Ferrari, L., Kremsner, P.G., Kun, J.F., 2007. The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. *J Infect Dis.* 196, 1379-1385.

Dornelles, L.N., Pereira-Ferrari, L., Messias-Reason I., 2006. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. *Clin Exp Immunol.* 145, 463–468.

Eichelmann, K., González González, S.E., Salas-Alanis, J.C., Ocampo-Candiani, J. 2013. Leprosy An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas Dermosifiliogr.* 104, 554-563.

Fitness, J., Floyd, S., Warndorff, D.K., Sichali, L., Mwaungulu, L., Crampin, A.C., Fine, P.E., Hill, A.V., 2004. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg.* 71, 330-340.

Frota, C.C., Freitas, M.V., Foss, N.T., Lima, L.N., Rodrigues, L.C., Barreto, M.L., Kerr, L.R., 2010. 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.* 104, 490-495.

Garred, P., Harboe, M., Oettinger, T., Koch, C., Svejgaard, A. 1994. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet.* 21, 125-131.

Garred, P., Larsen, F., Madsen, H.O., Koch, C., 2003. Mannose binding lectin deficiency – revisited. *Mol Immunol.* 40, 73-84.

Guttormsen, H.K., Stuart, L.M., Shi, L., Carroll, M.C., Chen, J., Kasper, D.L., Ezekowitz, R.A., Takahashi, K., 2009. Deficiency of mannose-binding lectin greatly increases antibody response in a mouse model of vaccination. *Clin Immunol.* 130, 264-271.

Han, X.Y., Seo, Y.H., Sizer, K.C., Schoberle, T., May, G.S., Spencer, J.S., Li, W., Nair, R.G., 2008. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol.* 130, 856-864.

Han, X.Y., Silva, F.J., 2014. On the age of leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 13, e2544.

Kang, P.B., Azad, A.K., Torrelles, J.B., Kaufman, T.M., Beharka, A., Tibesar, E., DesJardin, L.E., Schlesinger, L.S., 2005. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med.* 202, 987-999.

Karsten, C.M., Köhl, J., 2012. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology* 217, 1067-1079.

Koppel, E.A., Ludwig, I.S., Hernandez, M.S., Lowary, T.L., Gadikota, R.R., Tuzikov, A.B., Vandenbroucke-Grauls, C.M., van Kooyk, Y., Appelmelk, B.J., Geijtenbeek, T.B., 2004. Identification of the mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1. *Immunobiology* 209, 117-127.

Krutzik, S.R., Modlin, R.L., 2004. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol.* 16, 35-41.

Modlin, R.L., 2010. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol.* 22, 48-54.

Morgado de Abreu, M.A., Roselino, A.M., Enokihara, M., Nonogaki, S., Prestes-Carneiro, L.E., Weckx, L.L., Alchorne, M.M., 2014. *Mycobacterium leprae* is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. *Clin Microbiol Infect.* 20, 59-64.

Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M., Puzo, G., 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol.* 166, 7477-7485.

Pitchappan, R.M., 2002. Castes, migration, immunogenetics and infectious diseases in south India. *Community Genet.* 5, 157-161.

Ruseva, M., Kolev, M., Dagnaes-Hansen, F., Hansen, S.B., Takahashi, K., Ezekowitz, A., Thiel, S., Jensenius, J.C., Gadjeva, M., 2009. Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment. *Immunology.* 127, 279-288.

Sapkota, B.R., Macdonald, M., Berrington, W.R., Misch, E.A., Ranjit, C., Siddiqui, M.R., Kaplan, G., Hawn, T.R., 2010. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol.* 71, 992-998.

Schlesinger, L.S., Horwitz, M.A., 1991. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med.* 174, 1031-1038.

Søborg, C., Madsen, H.O., Andersen, A.B., Lillebaek, T., Kok-Jensen, A., Garred, P., 2003. Mannose-binding lectin polymorphisms in clinical tuberculosis. *J Infect Dis.* 188, 777-782.

Tabouret, G., Astarie-Dequeker, C., Demangel, C., Malaga, W., Constant, P., Ray, A., Honoré, N., Bello, N.F., Perez, E., Daffé, M., Guilhot, C., 2010. *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. *PLoS Pathog.* 6, e1001159.

Takahashi, K., 2011. Mannose-binding lectin and the balance between immune protection and complication. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011. 9, 1179-1190.

Tanne, A., Neyrolles, O., 2010. C-type lectins in immune defense against pathogens: the murine DC-SIGN homologue SIGNR3 confers early protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Virulence* 1, 285-290.

Turner, M.W., Hamvas, R.M., 2000. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet.* 2, 305-322.

Vasconcelos, L.R., Fonseca, J.P., do Carmo, R.F., de Mendonça, T.F., Pereira, V.R., Lucena-Silva, N., Pereira, L.M., Moura, P., Cavalcanti, Mdo. S. 2011. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and *MBL2* genotypes. *Int J Infect Dis.* 2011. 15, e551-557.

Vasundhra, M.K., Siddalingappa, A.S., Srinivasan, B.S., 1983. A study of medico-social problems of the inmates of a leprosy colony in Mysore. *Lepr India.* 55, 553-559.

Wieland, C.W., Koppel, E.A., den Dunnen, J., Florquin, S., McKenzie, A.N., van Kooyk, Y., van der Poll, T., Geijtenbeek, T.B., 2007. Mice lacking *SIGNR1* have stronger T helper 1 responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 9, 134-141.

Zhang, D.F., Huang, X.Q., Wang, D., Li, Y.Y., Yao, Y.G., 2013. Genetic variants of complement genes *ficolin-2*, mannose-binding lectin and complement factor H are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Hum Genet.* 132, 629-640.

**LIST OF TABLE LEGENDS**

Table 1 – Distribution of leprosy patients according to the clinical forms of the disease, operating class, gender, age and structural variants of the *MBL2* gene

Table 2 – Allelic and genotypic frequencies analysis of promoter and exon 1 SNPs of the *MBL2* and gender and age variables in relation to patients with leprosy divided by multibacillary (MB) and paucibacillary (PB) operational class

Table 3 – Results of the binary logistic regression and entered variables that independently sustained associated to the risk for MB leprosy.

Table 4 – Allelic, genotypic and haplotypic frequencies of *MBL2* SNPs at promoter and exon 1 regions on the cases' contacts agrouped by gender and age and its association with in IgM anti-PGL-1 serology

Table 1

<b>A) Distribution by sex, age and <i>MBL2</i> variants (exon 1)</b>				
<b>Patient with Leprosy</b>	<b>Sex</b>	<b>Age median</b>	<b><i>MBL2</i> variants</b>	
			<b>Sufficient</b>	<b>Deficient</b>
	(M:F)	(± range)	AA/AO (%)	OO (%)
All patients (n= 244)	111:133	42 (31-58)	237 (97.14)	7 (2.86)
<b>Higher bacilli load</b>				
Multibacillary (n= 128)	76:52	50 (34-63)	127 (99.22)	1 (0.78)
Dimorph (n= 83)	48:35	53 (36-66)	82 (98.8)	1 (1.20)
Virchowian (n= 45)	28:17	45 (33-56)	45 (100)	-
<b>Lower bacilli load</b>				
Paucibacillary (n= 116)	35:81	37 (22-52)	110 (94.9)	6 (5.10)
Tuberculoid (n= 60)	14:46	38 (29-56)	58 (96.66)	2 (3.34)
Indeterminate (n= 56)	21:35	35 (19-48)	52 (92.86)	4 (7.14)
<b>B) Statistics</b>				
MB vs. PB		<i>p</i>		
Age median		<0.0001		
Sex		<0.0001		
<i>MBL2</i> deficiency variant		0.02		

Table 2

<b>A) Groups of comparisons</b>				
<i>MBL2</i> SNPs	Male (n= 111)		Females (n= 133)	
	MB (76/152)	PB (35/70)	MB(52/104)	PB (81/162)
<b>-550</b>				
L	100 (0.66)	55 (0.78)	80 (0.77)	119 (0.73)
H	52 (0.34)	15 (0.21)	24 (0.23)	43 (0.26)
[LL + HL]	68 (0.89)	34 (0.97)	49 (0.94)	73 (0.90)
HH	8 (0.11)	1(0.03)	3 (0.06)	8 (0.10)
<b>Exon-1</b>				
A	120 (0.79)	51 (0.73)	84 (0.81)	126 (0.78)
O	32 (0.21)	19 (0.27)	20 (0.19)	36 (0.22)
[AA + AO]	75 (0.99)	32 (0.91)	52 (1.00)	78 (0.96)
OO	1 (0.01)	3 (0.09)	0 (0)	3 (0.04)
<hr/>				
	$\leq 40$ years old (n= 112)		$> 40$ years old (n= 132)	
	MB (45/90)	PB (67/134)	MB (83/166)	PB (49/98)
<b>-550</b>				
L	71 (0.79)	96 (0.72)	109 (0.66)	78 (0.79)
H	19 (0.21)	38 (0.28)	57 (0.34)	20 (0.20)
[LL + HL]	42 (0.93)	62 (0.93)	75 (0.90)	45 (0.92)
HH	3 (0.07)	5 (0.07)	8 (0.10)	4 (0.08)
<b>Exon-1</b>				
A	67 (0.74)	107 (0.80)	137 (0.83)	70 (0.71)
O	23 (0.26)	27 (0.20)	29 (0.17)	28 (0.29)
[AA + AO]	44 (0.98)	66 (0.99)	83 (1.0)	44 (0.90)
OO	1 (0.02)	1 (0.01)	0 (0)	5 (0.10)
<hr/>				
<b>B) Significancia estatística (*)</b>	<i>p</i>		<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<hr/>				
<b>Genero Masculino</b>				
H vs. L	0.027		1.9	1.0 – 3.69
[AA + AO] vs. OO	0.028		7.0	0.7 – 70,0
<b>Idade &gt; 40 anos</b>				
H vs. L	0.016		2.04	1.10 – 3.88
A vs. O	0.034		1.89	1.00 – 3.57
[AA + AO] vs. OO	0.003		-	-

**Table 3**

<b>Variables</b>	<b><i>p</i>-value</b>	<b>OR</b>	<b>(95% C. I.)</b>
Male	< 0.0001	3.99	(2.23 – 6.94)
Age > 40 years	< 0.0001	3.00	(1.71 – 5.26)
<i>MBL2</i> exon 1 AA/AO	0.023	13.1	(1.42 – 121.5)

Table 4

## A) Groups os comparison

## Household Asymptomatic Contacts (n= 247)

<i>MBL2</i>	Male (n=80)		Female (n=167)	
	PGL + (26/52)	PGL - (54/108)	PGL + (64/128)	PGL - (103/206)
<b>Exon-1</b>				
A	38 (0.73)	91 (0.94)	110 (0.86)	165 (0.80)
O	14 (0.27)	17 (0.16)	18 (0.28)	41 (0.20)
AA	13 (0.50)	38 (0.70)	47 (0.73)	66 (0.64)
AO	12 (0.46)	15 (0.28)	16 (0.25)	33 (0.32)
OO	1 (0.04)	1 (0.02)	1 (0.02)	4 (0.04)
<b>Haplotypes</b>				
HYA	13 (0.25)	34 (0.31)	32 (0.25)	52 (0.25)
LYA	17 (0.33)	36 (0.33)	49 (0.38)	75 (0.36)
LXA	5 (0.10)	19 (0.18)	29 (0.23)	38 (0.18)
HYO	7 (0.13)	5 (0.05)	3 (0.02)	4 (0.02)
LYO	10 (0.19)	14 (0.13)	15 (0.12)	37 (0.18)

## B) Significant Statistics (\*)

<i>Male</i>	<i>p</i>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>
O vs. A	0.046	1.97	0.90 – 4.40
[HYO+ LYO] vs. [HYA+ LYA + LXA]	0.032	2.28	1.06 – 4.88

X<sup>2</sup> one tailed, considering variant allele O as risk for anti-PGL-1 positivity based on experimental studies.

## 6. CONCLUSÕES

- Em Recife a relação entre condição de vida e casos de hanseníase, mostrou-se positiva, porém de fraca intensidade;
- O teste sorológico ML Flow constitui mais um recurso diagnóstico na classificação dos casos e identificação de grupos de risco;
- Deficiência de MBL parece exercer papel protetor contra o desenvolvimento da hanseníase e da evolução à forma clínica Virchowiana;
- Genótipo OO parece funcionar como fator proteção para formas mais graves da hanseníase;
- Ser do sexo masculino; maior de 40 anos; associação com alelo H e A parece ser fator de risco para hansen MB;
- Associação do contato do sexo masculino com o alelo O e haplotipos HYO e LYO influencia na resposta imune e evolução da doença;
- MBL regula a imunidade não apenas por ativar o sistema complemento.

## 7. PERSPECTIVAS

- Estudo prospectivo para acompanhamento dos contatos com sorologia anti-PGL positivos;
- Dosagem sérica da MBL dos casos e contatos;
- Genotipagem dos alelos específicos dos pacientes com genótipo OO

## 7. ANEXOS

Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Pernambuco

Anexo 2 - Termo de consentimento livre esclarecido para maiores de 18 anos

Anexo 3- Termo de consentimento livre esclarecido para crianças ou menores de 18 anos

Anexo 4- Encaminhamento do artigo 1 para revista Ciência e Saúde Coletiva

Anexo 5- Encaminhamento do artigo 2 para Leprosy Review

Anexo 6- Encaminhamento do artigo 3 para Immunobiology

## Anexo 1-Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Pernambuco



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER

Registro CEP/UPE: 238/10

Registro CAAE: 0233.0.097.000-10

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde/ Educação Física

Grupo: II

Instituição de Origem: Instituto de Ciências Biológicas/ UPE

Título: Pesquisa de anticorpos contra o antígeno PGL-1 do *Mycobacterium leprae* e o polimorfismo da MBL: Um possível marcador genético para doença em casos e contactantes de áreas com maior risco no município do Cabo de Santo Agostinho – PE.

Pesquisador (a) Responsável: Maria do Socorro Mendonça Cavalcanti

Pesquisador: Jacyra Salucy Antunes Ferreira

O plenário do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Pernambuco CEP/UPE, no exercício de suas atribuições legais e em consonância com as Resoluções do Conselho Nacional da Saúde, resolve considerar **“APROVADO”**, a transferência do estudo referenciado no caput deste documento do município de Cabo de Santo Agostinho-PE para o município do Recife-PE.

O CEP/UPE informa ao pesquisador que tem por obrigação:

- Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e/ou do TCLE. Nestas circunstâncias, a inclusão de entrevistados deve ser, temporariamente suspensas até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas;
- Comunicar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo;
- Apresentar relatório parcial (se for o caso) e o final até 60 dias após o término da pesquisa.

O CEP/UPE agradece a oportunidade de poder contribuir na apreciação do referido projeto e encontra-se à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Certo de oportunamente poder contar com nova apreciação, reitero votos de sucesso.

Recife, 02 de março de 2012.

  
 Prof. Dr. Antonio Pereira Filho  
 Prof. Adjunto da Universidade de Pernambuco - UPE  
 Prof. Dr. Antonio Pereira Filho  
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
 da Universidade de Pernambuco

## Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título do projeto: Pesquisa de anticorpos contra o antígeno PGL-1 do *Mycobacterium leprae* e o polimorfismo da *MBL*: Um possível marcador genético para a doença em casos e contactantes de áreas com maior risco no município do Recife – PE**

Pesquisadoras responsáveis: 1. **Maria do Socorro Mendonça Cavalcante – ICB-UPE**

Endereço: **Rua Arnóbio Marques, S/N, Santo Amaro, Recife – PE, Brasil**

Telefone: (81) 31833512. Email: [msmcavalcanti@uol.com.br](mailto:msmcavalcanti@uol.com.br)

2. **Jacyra Salucy Antunes Ferreira – FENSG-UPE**

Endereço: **Rua Arnóbio Marques, S/N, Santo Amaro, Recife – PE, Brasil. Fone: 31833600. Email: [jacyrasalucy@uol.com.br](mailto:jacyrasalucy@uol.com.br)**

Telefone Comitê de Ética: (81) 31833775

Email: [comitê.etica@upe.gov.br](mailto:comitê.etica@upe.gov.br)

### Identificação do voluntário doente maiores de 18 anos

Nome: \_\_\_\_\_

Número do registro na pesquisa: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefones para contato: \_\_\_\_\_

Caso ( )

Contato ( )

Eu \_\_\_\_\_,

declaro que fui informado (a) que esta pesquisa se destina a um melhor entendimento a respeito da hanseníase, doença da qual fui diagnosticado (a). Fui esclarecido que o objetivo principal é saber o motivo pelo qual a hanseníase, doença infecciosa causada por uma bactéria conhecida como bacilo de Hansen, não está sendo controlada no que diz respeito ao número de novas pessoas atingidas. Além disso, verificar o potencial existente da utilização do gene *MBL2* como um novo marcador genético de hanseníase em casos e contactantes nas áreas de maior risco no município do Recife..

Fui esclarecido que para participar desta pesquisa deverei a responder a um questionário e que será necessário a coleta de 10 ml de sangue venoso para as análises sorológicas e de polimorfismo. Fui informado ainda que a coleta de sangue é um

método invasivo, por isso pode causar desconforto local, na hora da picada e que não devo friccionar o local para não haver a formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. Nestes casos, os cuidados iniciais serão realizados pela equipe responsável pela pesquisa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. Este exame será realizado sem custo para o menor.

Sendo assim, concordo em participar desta pesquisa como voluntário (a), não remunerado (a), estando ciente dos riscos e benefícios destes procedimentos para minha pessoa, conforme exposto pela equipe deste estudo.

Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo em meu tratamento.

Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento e autorizo que os pesquisadores envolvidos nesta pesquisa utilizem as informações obtidas em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, minha identidade.

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Identidade: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

Identidade: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

### Anexo 3- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título do projeto: Pesquisa de anticorpos contra o antígeno PGL-1 do Mycobacterium leprae e o polimorfismo da MBL: Um possível marcador genético para a doença em casos e contactantes de áreas com maior risco no município do Recife – PE**

Pesquisadoras responsáveis: 1. **Maria do Socorro Mendonça Cavalcante – ICB-UPE**

Endereço: **Rua Arnóbio Marques, S/N, Santo Amaro, Recife – PE, Brasil**

Telefone: (81) 31833512. Email: [msmcavalcanti@uol.com.br](mailto:msmcavalcanti@uol.com.br)

2. **Jacyra Salucy Antunes Ferreira – FENSG-UPE**

Endereço: **Rua Arnóbio Marques, S/N, Santo Amaro, Recife – PE, Brasil. Fone: 31833600. Email:**

**[jacyrasalucy@uol.com.br](mailto:jacyrasalucy@uol.com.br)**

Telefone Comitê de Ética: (81) 31833775

Email: [comitê.etica@upe.gov.br](mailto:comitê.etica@upe.gov.br)

#### Identificação do voluntário doente criança e ou menores de 18 anos

Nome da criança \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Responsável legal: \_\_\_\_\_

Parentesco ou relação de responsabilidade: \_\_\_\_\_

Número do registro na pesquisa: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefones para contato: \_\_\_\_\_

Caso ( )

Contato ( )

Eu \_\_\_\_\_,  
responsável legal do menor  
\_\_\_\_\_ declaro

que fui informado (a) que esta pesquisa se destina a um melhor entendimento a respeito da hanseníase, doença da qual fui diagnosticado (a). Fui esclarecido que o objetivo principal é saber o motivo pelo qual a hanseníase, doença infecciosa causada por uma bactéria conhecida como bacilo de Hansen, não está sendo controlada no que diz

respeito ao número de novas pessoas atingidas. Além disso, verificar o potencial existente da utilização do gene *MBL2* como um novo marcador genético de hanseníase em casos e contactantes nas áreas de maior risco no município do Recife.

Fui esclarecido que para o menor participar desta pesquisa deverei auxiliá-lo a responder a um questionário e que será necessário a coleta de 10 ml de sangue venoso para as análises sorológicas e de polimorfismo

. Fui informado ainda que a coleta de sangue é um método invasivo, por isso pode causar desconforto local, na hora da picada e que não se deve friccionar o local para não haver a formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. Nestes casos, os cuidados iniciais serão realizados pela equipe responsável pela pesquisa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. Este exame será realizado sem custo para o menor.

Sendo assim, concordo que o mesmo participe desta pesquisa como voluntário (a), não remunerado (a), estando ciente dos riscos e benefícios destes procedimentos para pessoa dele, conforme exposto pela equipe deste estudo.

Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo em seu tratamento.

Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento e autorizo que os pesquisadores envolvidos nesta pesquisa utilizem as informações obtidas em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a identidade do menor.

Assinatura do responsável: \_\_\_\_\_

Identidade: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

Identidade: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

## Anexo 4- Encaminhamento do artigo 1 a Revista Ciência e Saúde Coletiva

REVISTAS



**Ciência & Saúde Coletiva**  
*para a sociedade* ABRASCO

Prezado(a) **Jacyra Salucy Antunes Ferreira**

Informamos que o **Artigo / Tema Livre** abaixo foi submetido a Ciência & Saúde Coletiva, constando sua participação como autor.

Artigo: **1895/2013 - HANSENÍASE: identificação das áreas de maior risco em um município do Nordeste do Brasil**

Caso não concorde com a sua participação nesse artigo favor entrar em contato para que possamos tomar as ações necessárias.

Atenciosamente,  
Maria Cecília de Souza Minayo e Romeu Gomes, Editores Chefes

Revista Ciência & Saúde Coletiva da Associação Brasileira de Pós-Graduação em Saúde Coletiva  
Av. Brasil, 4036, sala 700 - Manguinhos - 21040-361 - Rio de Janeiro - RJ  
(21) 388-29153 e (21) 2290-4893 - Todos os direitos reservados para ABRASCO.  
[Desenvolvido por ZANDA Multimeios da Informação.](#)

Responder Responder a todos Encaminhar Apagar Spam Mais ações... ▲

## Anexo 5 Encaminhamento do artigo 2 a Leprosy Review Saúde

Voltar para lista (página 1) « Anterior Próxima »

[Responder](#) [Responder a todos](#) [Encaminhar](#) [Apagar](#) [Spam](#) [Mais ações...](#)

**RE: RE: scientific article** [Esconder detalhes](#)

De: IreneA@lepra.org.uk   
Para: jacyrasalucy@uol.com.br   
Cópia:  
Cópia oculta:  
Assunto: RE: RE: scientific article  
Data: 29/01/2014 12:37

Dear Jacyra,

Thank you very much for this. It has been registered as MS 1918 and it would be much appreciated if this number could be quoted on all correspondence for ease of reference.

your manuscript will shortly be sent out to independent referees for peer review, after which it will be assigned to a sub-Editor who will take it forward.

As soon as I have any information for you i will be in touch again.

All best wishes

Irene

-----Original Message-----  
From: jacyrasalucy [<mailto:jacyrasalucy@uol.com.br>]  
Sent: Tue 1/28/2014 18:18  
To: Irene Allen  
Subject: Re: RE: scientific article

Good afternoon  
As guidance is attached scientific paper for submission in Leprosy Review.  
Request proof of receipt.  
I'm waiting for a response from the magazine.

Thank you

**Anexo 6-Encaminhamento do artigo 3 para journal Immunobiology**

Elsevier Editorial System(tm) for Immunobiology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: MBL2 GENE VARIANTS ARE ASSOCIATED TO PAUCIBACILLARY LEPROSY AND TO IgM ANTI-PGL-1 POSITIVE SEROLOGY IN MALE HOUSEHOLD CONTACTS

Article Type: Research Paper

Keywords: Innate immunity; leprosy; MBL2; PGL-1; polymorphism.

Corresponding Author: Prof. Patricia Moura, Ph.D

Corresponding Author's Institution: University of Pernambuco

First Author: Jacyra Ferreira

Order of Authors: Jacyra Ferreira; Patricia Moura, Ph.D; Luydson Vasconcelos; Rodrigo do Carmo; Taciana de Mendonça; Kleyton Palmeira do Ó; Carla Vasconcelos; Marcus Wanderley; Maria do Socorro Cavalcanti

**Abstract:** Leprosy, a chronic disease of skin and nerves, caused by *Mycobacterium leprae* is classified in multibacillary (MB) and paucibacillary (PB), based on lower or higher bacilli count and number of nerve/lesions respectively. MBL2 SNPs causes structural and expression variations in the serum MBL and genetic variants related to higher levels were associated to MB leprosy. MBL may facilitate bacilli invasion by activating complement and facilitating bacilli phagocytosis. Also, the phenol glycolipid-1 (PGL-1), a cell wall antigen of *M. leprae* aids invasion into Schwann cells; and follow up of contacts of leprosy cases IgM anti-PGL-1 positive seems to be related to PB. Thus, we investigated the association of 3 MBL2 SNPs to leprosy cases (n= 250) and also, the association of those SNPs with IgM anti-PGL-1 serology of theirs contacts (n= 247). It was used real time PCR TaqMan or Syber green chemistry for genotyping MBL2, and ML Flow test for IgM anti-PGL-1 serology contacts. The  $\chi^2$  test was used for univariate and binary logistic regression for multivariate analysis with  $p < 0.05$ . MBL2 structural variant allele O and genotype OO were associated to PB in univariate ( $p= 0.034$  and  $0.003$ ) in man and cases older than 40 years; and in multivariate analysis the genotype OO also was independently associated to PB ( $p= 0.023$ ). Interestingly, the O allele and HYO and LYO haplotype were associated to IgM anti-PGL-1 positive serology ( $p= 0.046$  and  $0.032$ ). MBL2 polymorphism may influence leprosy development by an efficient modulation of anti-PGL-1 response and low complement activation.

Suggested Reviewers: Kazue Takahashi  
Laboratory of Developmental Immunology, Dept. of Pediatrics, Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital  
Ktakahashi1@partners.org

Jens Christian Jensenius  
Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark  
j.c.jensenius@immunology.au.dk

Norma Tiraboschi Foss  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil  
ntfoss@fmrp.usp.br

Valéria Rêgo Alves Pereira  
Fiocruz - CpqAM  
valeria@cpqam.fiocruz.br