

Talita da Silva Martinez

**Presença de *M. leprae* na mucosa bucal: identificação de uma potencial
via de infecção e transmissão da hanseníase**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabela Maria Bernardes Goulart

Uberlândia

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Talita da Silva Martinez

**Presença de *M. leprae* na mucosa bucal: identificação de uma potencial
via de infecção e transmissão da hanseníase**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Ciências da Saúde.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2010.

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Freitas Neves – UFG

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola – UFU

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira – UFU

Prof^ª. Dr^ª. Isabela Maria Bernardes Goulart – UFU

“Temos esse poder. O poder de dar significado às pessoas que amamos. O poder de tirá-las do meio da multidão e ajudá-las fraternalmente. Pessoas caídas que precisam de uma mão. Temos duas. Pessoas fragilizadas. Precisam de uma palavra. Temos tantas. E as usamos com tantas imprecisões, com tanto desperdício, que na hora certa acabamos calados, economizando elogios, ternura.”

Gabriel Chalita

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À Prof^ª. Dr^ª. Isabela Maria Bernardes Goulart, minha orientadora, por confiar em meu trabalho e aceitar a missão de transmitir o conhecimento e a experiência com tanta sabedoria.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pelo exemplo de respeito e paciência na arte de educar.

Aos meus amados pais, Angel e Conceição, pelo incentivo e torcida em mais uma etapa de minha vida. Sem vocês não chegaria aqui.

Aos meus irmãos, Angel e Diego, pelo carinho e companheirismo.

Ao meu namorado André, presença em todas as horas, sinônimo de paz e conforto.

À amiga Márcia, pelo auxílio em todas as etapas do trabalho, em especial na análise estatística.

À amiga Deyse, pela companhia sempre agradável.

À equipe do CREDESH e do Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, em especial ao Prof. Carlos Henrique Martins da Silva, pela oportunidade.

A todos os pacientes atendidos no CREDESH, pela confiança em nosso trabalho e por permitirem que aprendamos sempre.

RESUMO

Martinez, T S. Presença de *M. leprae* na mucosa bucal: identificação de uma potencial via de infecção e transmissão da hanseníase. [Dissertação]. Uberlândia: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia; 2010.

A hanseníase é um importante problema de saúde pública no Brasil, com elevada taxa de detecção, apesar da aplicação da poliquimioterapia. A mucosa nasal é considerada o local preferencial de entrada e saída do *Mycobacterium leprae*, embora algumas lesões tenham sido encontradas na mucosa bucal. No entanto, o envolvimento da mucosa oral na transmissão do bacilo nunca foi investigado. Nós mostramos a presença do DNA do *M. leprae* em *swab* bucal de pacientes com hanseníase (334) e contatos domiciliares (1288) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, e os resultados foram correlacionados com outras avaliações clínica e laboratorial. A positividade geral de pacientes foi de 18,26%, dividida em 12,03% e 21,23% para as formas paucibacilares e multibacilares, respectivamente. Entre os contatos, a positividade alcançou 6,83%, que foram considerados como portadores saudáveis ou infectados subclínicos, quando o teste ELISA anti-PGL-1 apresentou resultado positivo. Este estudo mostrou evidências importantes de que a mucosa bucal pode ser um sítio secundário de infecção e transmissão do *M. leprae*. Além disso, contatos com PCR positivo podem estar envolvidos ativamente na transmissão. Nossos resultados têm grande relevância epidemiológica, especialmente para os programas de controle da hanseníase e para as clínicas de odontologia, e devem ser considerados em novas estratégias de controle e prevenção.

Palavras-chave: Hanseníase; *swab* bucal; DNA de *M. leprae*; pacientes; contatos domiciliares; epidemiologia molecular.

ABSTRACT

Martinez, T S. *M. leprae* in the oral mucosa: identification of a potential route of infection and transmission of leprosy. [Dissertation]. Uberlândia: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia; 2010.

Leprosy is an important health problem in Brazil, with a high detection rate despite the application of the multidrug therapy. The nasal mucosa is considered the preferential site of entry and exit of the *Mycobacterium leprae*, although some lesions have been found in the buccal mucosa. However, the buccal mucosa involvement in bacilli transmission has never been investigated. We have shown the presence of the *M. leprae* DNA in buccal swabs of leprosy patients (334) and household contacts (1288) through conventional polymerase chain reaction (PCR), and results were correlated with clinical and other laboratorial evaluations. The overall positivity for patients was 18.26%, divided into 12.03% and 21.23% for paucibacillary and multibacillary forms, respectively. Among contacts, the positivity reached 6.83%, which were considered either as healthy carriers or sub-clinically infected, when the ELISA test presented a positive anti-PGL-1 result. This study showed important evidences that the buccal mucosa may be a secondary site of *M. leprae* transmission and infection. Furthermore, contacts with positive PCR may be actively involved in the transmission. Our findings have great epidemiological relevance, especially for the leprosy control programs and for the dentistry clinics, and must be considered in the new strategies of control and prevention.

Key words: Leprosy; buccal swab; *M. leprae* DNA; patients; household contacts; molecular epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Raspado de mucosa oral por meio de escova flexível tipo *swab*, esfregando-se pela mucosa bucal. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... 24
- Figura 2: Raspado de mucosa nasal por meio de escova flexível tipo *swab*, esfregando-se sobre o septo nasal pela fossa nasal esquerda. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... 25
- Figura 3: Materiais utilizados para coleta de *swabs* bucal e nasal para extração de DNA genômico do *M. leprae* A) Escova flexível para coleta de *swab*; B) Tubo contendo 500µl de tampão de lise nuclear para depósito do *swab* coletado. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... 25
- Figura 4: Porcentagem de positividade dos exames laboratoriais de pacientes com hanseníase, segundo formas clínicas de Ridley e Jopling. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... 30

Figura 5: Detecção do DNA de *M. leprae* por PCR. A) Qualidade do DNA total extraído, em amostras de *swab* bucal de pacientes com hanseníase, visualizado em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídeo. B) Amplicon de 130 pb observado nas colunas 1 (controle positivo), 2 e 6; colunas 2, 4, 5, 7-10: amostras negativas para *M. leprae*; B: controle negativo; M-marcador de peso molecular de 100pb. Fragmentos de 200pb observados nas colunas 1-10 correspondem à amplificação de parte do gene NRAMP1 e fragmentos de 130pb correspondem à amplificação da região RLEP3 do genoma do *M. leprae*.

CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... 31

Figura 6: Positividade para detecção do *M. leprae* em amostras de *swabs* bucal e nasal de pacientes com hanseníase segundo formas clínicas de Ridley e Jopling.

CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... 33

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Distribuição de pacientes com hanseníase de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling, segundo gênero e média de idade na abordagem. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 29 |
| Tabela 2: Detecção do DNA do <i>M. leprae</i> em amostras de <i>swab</i> bucal de pacientes classificados de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 32 |
| Tabela 3: Detecção do DNA do <i>M. leprae</i> em amostras de <i>swab</i> bucal de pacientes de acordo com a classificação operacional. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 32 |
| Tabela 4: Concordância entre a detecção do <i>M. leprae</i> em amostras de <i>swab</i> bucal e nasal de pacientes. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 32 |
| Tabela 5: Concordância entre a detecção do <i>M. leprae</i> em amostras de <i>swab</i> bucal e teste ELISA anti-PGL-1 de pacientes com hanseníase. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 34 |
| Tabela 6: Concordância entre a detecção do <i>M. leprae</i> em amostras de <i>swab</i> bucal e teste intradérmico de Mitsuda de pacientes. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 34 |

| | |
|--|----|
| Tabela 7: Distribuição de contatos domiciliares de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling do caso índice, segundo gênero e média de idade na abordagem. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 35 |
| Tabela 8: Detecção do DNA do <i>M. leprae</i> em amostras de <i>swab</i> bucal de contatos domiciliares de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling do caso índice. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 36 |
| Tabela 9: Concordância entre a detecção do <i>M. leprae</i> em amostras de <i>swab</i> bucal e teste ELISA anti-PGL-1 de contatos domiciliares. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 36 |
| Tabela 10: Concordância entre a detecção do <i>M. leprae</i> em amostras de <i>swab</i> bucal e teste intradérmico de Mitsuda de contatos domiciliares. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010..... | 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

CD – Cotovelo direito

CE – Cotovelo esquerdo

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CREDESH – Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase

DD – Dimorfo-dimorfo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DT – Dimorfo-tuberculóide

DV – Dimorfo-virchowiano

FAMED – Faculdade de Medicina

I – Indeterminado

IB – Índice Baciloscópico

IE – Índice ELISA

IgM – Imunoglobulina M

L - Lesão

LOD – Lóbulo da orelha direita

LOE – Lóbulo da orelha esquerda

M. leprae – *Mycobacterium leprae*

MB – Multibacilar

mm – milímetros

NRAMP1 – *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein One*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PB – Paucibacilar

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PEA – População economicamente ativa

PGL-1 – Glicolípídeo fenólico-1

PQT – Poliquimioterapia

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

V - Virchowiano

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. OBJETIVO | 19 |
| 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS | 20 |
| 3.1. Seleção dos participantes do estudo | 20 |
| 3.2. Aspectos Éticos | 20 |
| 3.3. Critérios para seleção dos doentes | 21 |
| 3.3.1. Diagnóstico clínico | 21 |
| 3.3.2. Teste de Mitsuda | 21 |
| 3.3.3. Índice Baciloscópico | 22 |
| 3.3.4. Classificação histopatológica da biópsia de lesão de pele | 22 |
| 3.3.5. Teste ELISA anti-PGL-1 | 23 |
| 3.3.6. Classificação Operacional | 23 |
| 3.4. Critérios para seleção dos contatos domiciliares | 24 |
| 3.5. Protocolo para coleta de <i>swabs</i> e extração de DNA | 24 |
| 3.6. Seleção dos <i>primers</i> | 26 |
| 3.7. Condições da PCR convencional | 27 |
| 3.8. Análise Estatística | 27 |
| 4. RESULTADOS | 29 |
| 4.1. Pacientes com hanseníase..... | 29 |
| 4.2. Contatos domiciliares..... | 35 |
| 5. DISCUSSÃO | 38 |
| 6. CONCLUSÃO | 43 |
| REFERÊNCIAS | 44 |

| | |
|---|----|
| Anexo A – Parecer nº099/03 do Comitê de Ética em Pesquisa | 49 |
| Anexo B – Parecer nº499/08 do Comitê de Ética em Pesquisa | 50 |
| Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 52 |

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, transmitida pelo convívio de pessoas susceptíveis com doentes contagiantes sem tratamento, com período médio de incubação de 2 a 5 anos (TALHARI E NEVES, 1997).

O bacilo causador da doença é um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, com 1,5 a 8 micra de comprimento e 0,2 a 0,5 micron de largura, não cultivável e lento, que faz uma divisão binária a cada 12 a 21 dias. É corado em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem no álcool e ácido, sendo, então, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (REES, 1985).

A hanseníase é considerada um problema de saúde pública, uma vez que o Brasil ocupa o 2º lugar no mundo, com prevalência de 41.817 casos no início de 2009 e incidência de 38.914 em 2008 (WHO, 2009).

A variação das formas clínicas dentro de um espectro está intimamente relacionada com padrões imunológicos distintos, dependendo da potencialidade de resposta do hospedeiro ao bacilo (RIDLEY E JOPLING, 1966). Em um dos pólos da doença está a forma tuberculóide (T), com uma vigorosa resposta imune mediada por células ao *M. leprae*; no outro extremo está a forma virchowiana (V), com ausência de resposta celular específica aos antígenos do *M. leprae* e exacerbação da resposta humoral (RIDLEY E JOPLING, 1966). Entre as formas polares existem as intermediárias, dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV), imunologicamente instáveis e que correspondem ao maior número de doentes em áreas endêmicas (PFALTZGRAFF E BRYCESON, 1985).

Para fins de tratamento, a Organização Mundial de Saúde (OMS) dividiu operacionalmente os doentes em paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB), de acordo com o Índice Baciloscópico (IB) e o número de lesões cutâneas. Isso permitiu a utilização de dois diferentes algoritmos de tratamento pela poliquimioterapia (PQT), composta por combinações entre as drogas dapsona, rifampicina e clofazimina (WHO, 1988).

A interrupção da cadeia de transmissão é o principal desafio dos programas de controle da hanseníase. A fonte de infecção é o paciente com alta carga bacteriana das formas multibacilares (MB) não tratados. Os contatos domiciliares dos pacientes MB têm um risco relativo cinco a dez vezes maior de desenvolver a hanseníase do que a população de não contatos e os contatos de doentes paucibacilares (PB) apresentam um risco duas vezes maior (NORDEEN, 1985).

Pessoas infectadas sem manifestação clínica da doença, com a presença do *M. leprae* na mucosa nasal, podem estar envolvidas com a transmissão subclínica do bacilo (MOET *et al.*, 2004). Sequências de DNA específicas do *M. leprae* têm sido detectadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em swab nasal de indivíduos aparentemente saudáveis, que residem em áreas endêmicas e grande parte desses mostram soropositividade contra antígenos específicos do bacilo, avaliada por testes ELISA e de fluxo lateral (ML-Flow) (RAMAPRASAD *et al.*, 1997; IZUMI *et al.*, 1999; VAN BEERS *et al.*, 1999; GOULART *et al.*, 2008; GOULART E GOULART, 2008).

A mucosa nasal é o sítio preferencial para entrada e saída do *M. leprae* (REES E MCDUGALL, 1977) e seu envolvimento na hanseníase está bem estabelecido e definido de acordo com as formas clínicas (PATROCÍNIO *et al.*,

2005; NAVES *et al.*, 2009). A detecção do DNA do bacilo também foi descrita na concha nasal de pacientes e contatos (PATROCÍNIO *et al.*, 2005), favorecendo a hipótese de que a infecção inicial do microrganismo ocorre nas vias aéreas superiores (RAMAPRASAD *et al.*, 1997) e que não apenas os pacientes são portadores de bacilos.

Entretanto, o envolvimento da cavidade oral tem sido raramente relatado (BARTON, 1974), sendo descritas lesões na boca e no palato em doentes com hanseníase virchowiana e em poucos casos de pacientes com as formas tuberculóide e dimorfa (REIS *et al.*, 1996; D'ABREU *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2002), ressaltando a importância epidemiológica da cavidade oral como fonte de infecção (COSTA *et al.*, 2003).

Dentre as manifestações bucais, as lesões podem apresentar-se como úlceras, nódulos, manchas, placas, fibroses, além de alterações gengivo-periodontais e dentárias (PFALTZGRAFF E BRYCESON, 1985; REIS *et al.*, 1996; D'ABREU *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2002).

Como resultado da utilização da PQT e detecção precoce de casos de hanseníase, as lesões causadas pelo *M. leprae* tiveram significativa redução. Conseqüentemente, algumas manifestações específicas como lesões maxilares e da mucosa bucal são cada vez menos comuns (COSTA, 2008).

Por outro lado, a boca pode atuar como via de transmissão e, dessa forma, ter importante papel na produção de novos casos de hanseníase. Por ser uma doença infecto-contagiosa, quanto mais precoce o diagnóstico, maior a possibilidade de um curso favorável. O diagnóstico tardio favorece a disseminação da hanseníase na comunidade, resultando em danos neurais mais severos, que levam à incapacidade física (GOULART E GOULART,

2008). Por isso, testes diagnósticos laboratoriais sensíveis e específicos poderiam ser de grande utilidade na detecção de portadores saudáveis, infecção subclínica e de pacientes com hanseníase no seu estágio inicial (CHO *et al.*, 2001).

Partes do genoma do *M. leprae* foram detectadas pela PCR em biópsias de mucosa bucal (palato duro e mole) de pacientes MB, presumindo-se resultado semelhante com amostras de *swab* bucal, embora esta análise não tenha sido realizada (SANTOS *et al.*, 2007).

Apesar de ser considerada um importante problema de saúde pública, a hanseníase praticamente não é discutida nos cursos de odontologia (COSTA *et al.*, 2002) e o envolvimento da mucosa oral na transmissão do bacilo nunca foi investigado.

2. OBJETIVO

Detectar o DNA do *M. leprae* por reação em cadeia da polimerase em amostras de *swab* bucal de pacientes com hanseníase, virgens de tratamento, e de seus contatos domiciliares, correlacionando os dados obtidos com a avaliação clínica e respostas humoral e celular, além da baciloscopia e detecção do DNA do bacilo em amostras de *swab* nasal dos doentes, a fim de investigar o envolvimento da mucosa oral como via de infecção e transmissão.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Seleção dos participantes do estudo

Para este estudo transversal foram selecionados os doentes com diagnóstico de hanseníase, virgens de tratamento, e seus contatos domiciliares, atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no período entre 2004 e 2009.

Foram considerados contatos domiciliares de pacientes com hanseníase aqueles que convivem ou conviveram com o paciente dentro do domicílio nos últimos cinco anos (BRASIL, 2009).

Partiu-se de uma seleção de 334 doentes e 1288 contatos, números estes estratificados à medida que os exames eram correlacionados, uma vez que era necessário que o doente ou contato apresentasse resultados de ambos os exames em questão.

3.2. Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia, com parecer de número 099/2003 (Anexo A) e parecer de número 499/2008 (Anexo B). Os doentes e contatos que concordaram em participar assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo C), e poderiam desistir da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo próprio.

3.3. Critérios para seleção dos doentes

3.3.1. Diagnóstico clínico

Para a classificação clínica, os doentes virgens de tratamento foram submetidos a exames dermato-neurológicos, com descrição detalhada das características macroscópicas, quantidade e distribuição das lesões mapeadas em diagrama corporal, contido nos prontuários. Em todos os pacientes ainda foram realizados teste intradérmico de Mitsuda e coleta de esfregaço dérmico e biópsia de lesão de pele para determinação do Índice Baciloscópico (IB) e classificação histopatológica.

3.3.2. Teste de Mitsuda

O teste de Mitsuda foi utilizado para avaliar a imunidade celular específica ao *M. leprae*. É uma reação intradérmica com 0,1 mL da Mitsudina humana, uma suspensão de 6×10^7 bacilos/mL mortos pelo calor, produzida pelo Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru/SP (ILSL-Bauru, SP), realizada na superfície de flexão do antebraço direito, 4 cm abaixo da dobra antecubital, com leitura na 4ª semana, considerando como resultado a medida do diâmetro da induração local, registrada em milímetros (mm). Utilizando-se os critérios da OMS (JOPLING E MCDUGALL, 1991), a reação de Mitsuda foi descrita levando-se em conta os dados relacionados abaixo:

Negativo: nada a observar e/ou sentir, 0 mm;

Duvidoso: pápula entre 0 a 3 mm de diâmetro;

Fracamente positivo: pápula com 4 a 7 mm de diâmetro sem ulceração;

Positivo intermediário: pápula com 7 a 10 mm de diâmetro sem ulceração;

Fortemente positivo: nódulo maior que 10 mm de diâmetro ou de qualquer tamanho, com ulceração.

Para fins de análise, foram considerados positivos valores maiores ou iguais a 4 mm.

3.3.3. Índice Baciloscópico

O Índice Baciloscópico foi realizado em esfregaços cutâneos de no mínimo cinco locais: o lóbulo das duas orelhas (LOD e LOE), os dois cotovelos (CD e CE) e uma lesão ativa (L) (BRASIL, 1994). A coloração usada para o *M. leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), foi de Ziehl-Neelsen. O resultado foi registrado de acordo com a Escala Logarítmica de Ridley (1990), baseada na média do número de bacilos vistos em campos de imersão em óleo, utilizando-se objetiva de imersão como descrita abaixo:

IB = 0 – nenhum bacilo em 100 campos de imersão em óleo;

IB = 1 – 1 a 10 bacilos, em média, em 100 campos;

IB = 2 – 1 a 10 bacilos, em média, em 10 campos;

IB = 3 – 1 a 10 bacilos, em média, em um campo;

IB = 4 – 10 a 100 bacilos, em média, em um campo;

IB = 5 – 100 a 1.000 bacilos, em média, em um campo;

IB = 6 – acima de 1.000 bacilos, em média, em um campo.

3.3.4. Classificação histopatológica da biópsia de lesão de pele

Foram utilizados os critérios de Ridley (1990), considerando algumas características histológicas como parâmetros imunoprognoticos para determinar classificação:

- Número e a distribuição de linfócitos nas lesões;
- Tipos de células presentes no granuloma, especialmente a presença de células gigantes tipo Langerhans;
- Envolvimento severo de nervo pelo granuloma ou caseificação;
- Erosão de uma parte da epiderme por um granuloma de células epitelióides;
- Presença de histiócitos – macrófagos espumosos;
- Presença de zona clara subepidérmica;
- Índice bacteriano no granuloma e/ou infiltrado.

Os pacientes foram classificados pelos critérios de Ridley e Jopling (1966), nas seguintes formas clínicas: tuberculóide (T), dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-virchowiano (DV), virchowiano (V).

3.3.5. Teste ELISA anti-PGL-1

O teste ELISA anti-PGL-1 é um teste indireto, imunoenzimático, para avaliação da resposta humoral frente ao antígeno PGL-1, específico do bacilo, pela detecção de anticorpos IgM no soro.

O resultado do teste é convertido em um Índice ELISA (IE), considerando-se positivo um $IE \geq 1,1$, conforme descrito por Lobato *et al.* (2008).

3.3.6. Classificação Operacional

Para fins de tratamento, os pacientes das formas T e DT com até 5 lesões e baciloscopia negativa em todos os sítios foram agrupados em paucibacilares; e os pacientes das formas DT com mais de cinco lesões e/ou

baciloscopia negativa ou positiva e das formas DD, DV e V (estas últimas com baciloscopia positiva) foram agrupados em multibacilares (WHO, 1988; BRASIL, 2009).

3.4. Critérios para seleção dos contatos domiciliares

Os contatos domiciliares foram submetidos ao exame dermatoneurológico para assegurar a condição de não doentes, bem como ao teste intradérmico de Mitsuda e teste sorológico ELISA anti-PGL-1.

3.5. Protocolo para coleta de *swabs* e extração de DNA

Nos doentes foi realizado raspado de mucosas bucal e nasal, bem como de mucosa bucal nos contatos, por meio da introdução de escovinhas flexíveis tipo *swabs* (uma para a cavidade oral e outra para a nasal), esfregando-se algumas vezes sobre a mucosa bucal e sobre o septo nasal pela fossa nasal esquerda (Figuras 1 e 2).



Figura 1: Raspado de mucosa oral por meio de escova flexível tipo *swab*, esfregando-se pela mucosa bucal. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.



Figura 2: Raspado de mucosa nasal por meio de escova flexível tipo *swab*, esfregando-se sobre o septo nasal pela fossa nasal esquerda. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

O material coletado foi depositado em tubos estéreis contendo 500 μ l de tampão de lise nuclear (TLN – NaCl 400 mM, EDTA, 50 mM pH 8,0 e Tris-Cl 25 mM pH 8,0) (Figura 3). Cada amostra foi individualmente acondicionada em microtubos de 2 mL estéreis e mantida a 4°C até a extração do DNA.

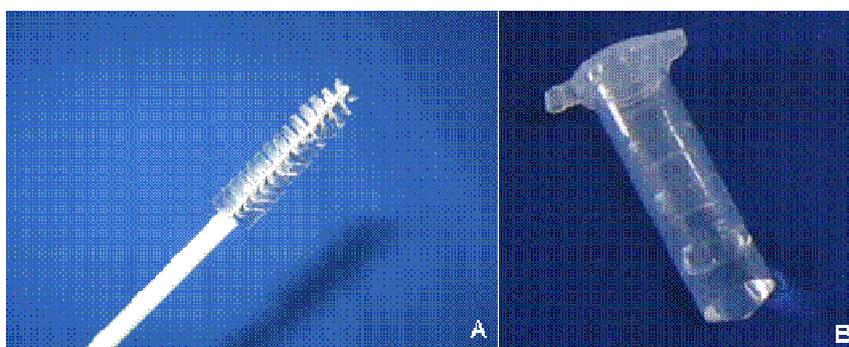


Figura 3: Materiais utilizados para coleta de *swabs* bucal e nasal para extração de DNA genômico do *M. leprae*. A) Escova flexível para coleta de *swab*; B) Tubo contendo 500 μ l de tampão de lise nuclear para depósito do *swab* coletado. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

Para a fase de extração, ao Tampão de Lise Nuclear (NaCl 400 mM, EDTA pH 50 mM 8,0, Tris-Cl 25 mM pH 8,0), contendo as amostras de *swabs*

(nasal e bucal) acrescentou-se 40 μL de dodecil-dissulfato de sódio (SDS) 10%, 25 μL de proteinase K a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incubando-se a 55°C. Após 18 horas, os tubos foram retirados do banho-maria e foram adicionados 250 μL de Tris-HCl (1M pH 8,0), 250 μL clorofórmio PA e 500 μL de fenol (pH 8,0). Os tubos foram homogeneizados, deixados em repouso por 5 minutos e centrifugados a 10621 x g por 10 minutos. Transferiu-se 700 μL do sobrenadante para tubos estéreis onde foram adicionados 700 μL de etanol absoluto. Estes foram incubados a -20°C por 24 horas. Na seqüência, os tubos foram centrifugados a 20817 x g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 750 μL de etanol absoluto e 250 μL de água, centrifugando-os por mais 10 minutos à velocidade de 20817 x g. O sobrenadante foi descartado deixando o precipitado secar. Após a secagem, os precipitados foram diluídos em 30 μL de água ultra pura e armazenados a -20°C.

3.6. Seleção dos *primers*

Em cada reação foram amplificados fragmentos do DNA genômico humano, *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein One* (NRAMP1) (GenBankAJ535670), utilizado como controle endógeno da reação e da qualidade do DNA total extraído. O par de *primers* utilizado para a amplificação do gene NRAMP1 foi: *forward*: 5'-CTCGCATTAGGCCAACGA-3' e *reverse*: 5'-TTCTGTGCCTCCCAAGTTAGC-3'). O tamanho do fragmento esperado foi de 200 pb.

Para a detecção do DNA do *Mycobacterium leprae* nas amostras foi utilizado um par de *primers*, que amplifica fragmentos de 130 pb da região

RLEP3 do genoma do *M. leprae* (*forward*: 5'-GCACGTAAGCATGTCTGGTGG-3', e *reverse*: 5'-CCGCGGCGCTAACAACTATC-3').

3.7. Condições da PCR convencional

As condições para a PCR foram descritas em trabalho anterior do nosso grupo (PATROCÍNIO *et al.*, 2005), seguindo o protocolo de desnaturação 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C, anelamento do *primer* a 58°C por 40 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e fotografados sob luz ultravioleta em um sistema de vídeo documentação (*Image Master VDS. Amersham Biosciences*).

3.8. Análise Estatística

Foi realizada estatística descritiva para os dados. O teste Kappa foi aplicado para avaliar os resultados de concordância, considerando-se: <0 (sem concordância), 0-0,19 (concordância muito fraca), 0,20-0,39 (concordância fraca), 0,40-0,59 (concordância moderada), 0,60-0,79 (concordância substancial), 0,8-1,0 (concordância excelente).

O teste do Qui-Quadrado foi utilizado para avaliar diferenças significativas ou não quanto às proporções dos acontecimentos (positividade) nas amostras.

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para avaliar as correlações entre os testes ELISA anti-PGL-1, teste intradérmico de Mitsuda, IB de esfregaço e IB de biópsia de lesão de pele.

Foi considerado estatisticamente significativo um p valor menor que 0,05.

A análise foi realizada utilizando-se os programas Excell e SSPSS.

4. RESULTADOS

Foram analisados 334 doentes e 1288 contatos domiciliares. O grupo envolvido no estudo foi estratificado à medida que os exames foram correlacionados, a fim de que o mesmo doente ou contato tivesse resultado dos dois exames em questão, evitando viés na pesquisa.

4.1. Pacientes com hanseníase

A média de idade dos 334 pacientes do estudo foi de $47,66 \pm 16,14$ anos, com predominância de 61,68% (206/334) do gênero masculino. Na classificação clínica, o maior número de doentes foi do grupo dimorfo, correspondendo a 67,66% (226/334), com predomínio de 38,32% (128/334) da forma DT (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição de pacientes com hanseníase de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling, segundo gênero e média de idade na abordagem. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| Formas Clínicas ¹ | Gênero | | | | Média de idade na abordagem | Total | |
|------------------------------|-------------------|--------------|------------------|--------------|-----------------------------|------------|------------|
| | Masc ² | | Fem ³ | | | n | % |
| | n | % | n | % | | | |
| T | 20 | 52,63 | 18 | 47,37 | 44,71 | 38 | 11,38 |
| DT | 70 | 54,69 | 58 | 45,31 | 46,97 | 128 | 38,32 |
| DD | 30 | 58,82 | 21 | 41,18 | 47,05 | 51 | 15,27 |
| DV | 34 | 72,34 | 13 | 27,66 | 52,55 | 47 | 14,07 |
| V | 52 | 74,29 | 18 | 25,71 | 47,70 | 70 | 20,96 |
| Total Geral | 206 | 61,68 | 128 | 38,32 | 47,66 | 334 | 100 |

1: Formas clínicas: T:tuberculóide; DT:dimorfo-tuberculóide; DD:dimorfo-dimorfo; DV:dimorfo-virchowiano; V:virchowiano; 2: Masc:Gênero Masculino; 3:Fem:Gênero Feminino.

Com relação à classificação operacional, houve maior prevalência dos pacientes MB com 67,66% (226/334).

A positividade dos exames laboratoriais no diagnóstico dos pacientes, segundo a classificação clínica (Ridley e Jopling, 1966), é apresentada na Figura 4, bem como o coeficiente de determinação (R^2) e a equação de tendência linear de cada exame. Observou-se forte correlação positiva entre ELISA anti-PGL-1 e IB de esfregaço dérmico ($r=0,9763$ e $p=0,0044$), ELISA anti-PGL-1 e IB de biópsia de pele ($r=0,9204$ e $p=0,0266$) e IB de esfregaço dérmico e IB de biópsia de pele ($r=0,9423$ e $p=0,0165$); e forte correlação negativa entre o teste intradérmico de Mitsuda e ELISA anti-PGL-1 ($r=-0,9994$ e $p<0,0001$), IB de esfregaço dérmico ($r=-0,9711$ e $p=0,0059$) e IB de biópsia de pele ($r=-0,9253$ e $p=0,0242$). As positivities do IB de esfregaço, de biópsia de pele e do teste ELISA anti-PGL-1 aumentaram em direção às formas bacilíferas, atingindo 100% nas formas DV e V. Ao contrário, o teste de Mitsuda obteve 100% de positividade na forma T, não bacilífera, sendo negativo em todos os doentes das formas DV e V.

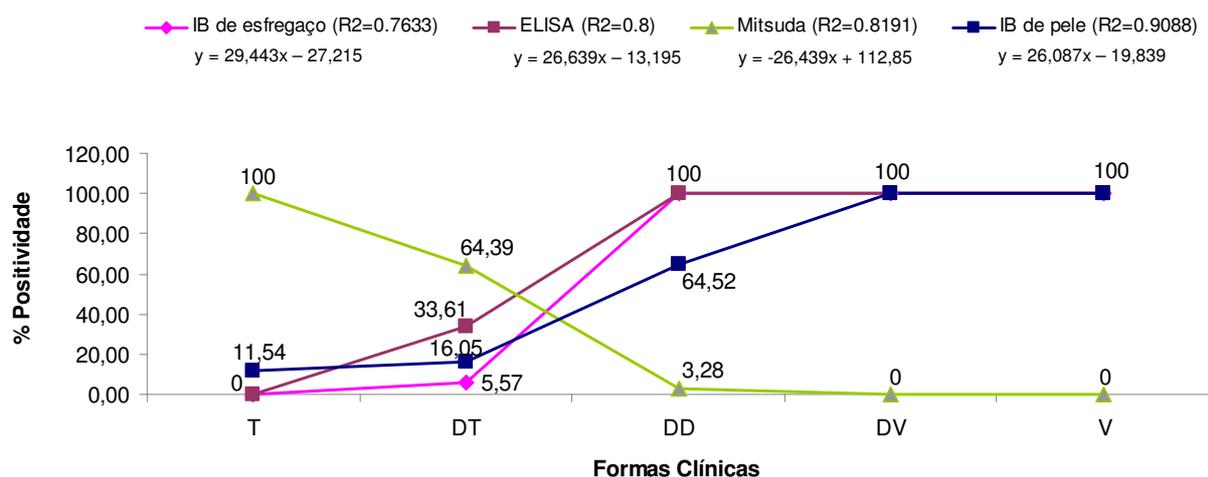


Figura 4: Porcentagem de positividade dos exames laboratoriais de pacientes com hanseníase, segundo formas clínicas de Ridley e Jopling. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

Quanto à detecção do DNA pela PCR em *swab* bucal de doentes (Figura 5) foi encontrada uma positividade geral de 18,26% (61/334), variando de 13,16% (5/38) na forma clínica T a 42,86% (30/70) na forma V, passando por 15,69% na forma DD (Tabela 2). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as positivities da forma V *versus* formas T ($\chi^2=15,746$; $p=0,0001$), DT ($\chi^2=21,457$; $p<0,0001$), DD ($\chi^2=12,608$; $p=0,0006$) e DV ($\chi^2=16,276$; $p<0,0001$).

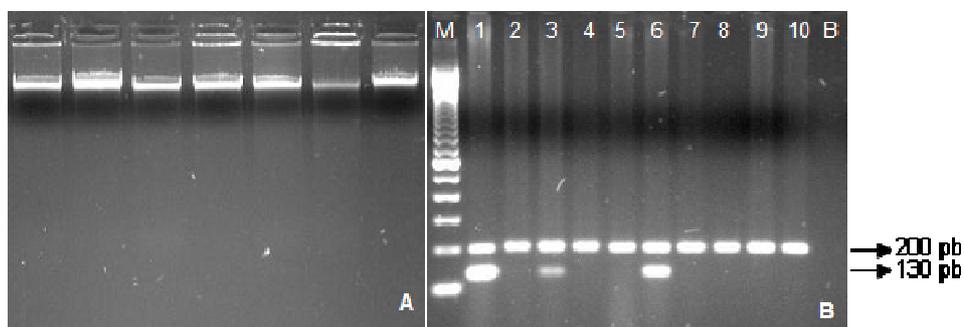


Figura 5: Detecção do DNA de *M. leprae* por PCR. A) Qualidade do DNA total extraído, em amostras de *swab* bucal de pacientes com hanseníase, visualizado em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídeo. B) Amplicon de 130 pb observado nas colunas 1 (controle positivo), 2 e 6; colunas 3, 4, 5, 7-10: amostras negativas para *M. leprae*; B: controle negativo; M-marcador de peso molecular de 100pb. Fragmentos de 200pb observados nas colunas 1-10 correspondem à amplificação de parte do gene NRAMP1 e fragmentos de 130pb correspondem à amplificação da região RLEP3 do genoma do *M. leprae*. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

Tabela 2: Detecção do DNA do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal de pacientes classificados de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| PCR Swab Bucal | | | | | | |
|-----------------|-----------|--------------|------------|--------------|------------|------------|
| Formas Clínicas | Positivo | | Negativo | | Total | |
| | n | % | n | % | n | % |
| T | 5 | 13,16 | 33 | 86,84 | 38 | 11,38 |
| DT | 12 | 9,38 | 116 | 90,63 | 128 | 38,32 |
| DD | 8 | 15,69 | 43 | 84,31 | 51 | 15,27 |
| DV | 6 | 12,77 | 41 | 87,23 | 47 | 14,07 |
| V | 30 | 42,86 | 40 | 57,14 | 70 | 20,96 |
| Total | 61 | 18,26 | 273 | 81,74 | 334 | 100 |

Com relação à classificação operacional, 12,04% (13/108) dos pacientes PB foram positivos para detecção do *M. leprae* por PCR em *swab* bucal (13,16% de T e 11,43% de DT-PB), enquanto que nos MB esse valor foi de 21,24% (48/226) (Tabela 3), com 6,9% de DT-MB, 15,69% de DD, 12,77% de DV e 42,86% de V. A diferença de positividade para detecção do bacilo entre os doentes PB e MB não foi estatisticamente significativa ($\chi^2=2,543$; $p=0,153$).

Tabela 3: Detecção do DNA do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal de pacientes de acordo com a classificação operacional. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| PCR Swab Bucal | | | | | | |
|-----------------|-----------|--------------|------------|--------------|------------|------------|
| CO ¹ | Positivo | | Negativo | | Total | |
| | n | % | n | % | n | % |
| PB | 13 | 12,04 | 95 | 87,96 | 108 | 32,34 |
| MB | 48 | 21,24 | 178 | 78,76 | 226 | 67,66 |
| Total | 61 | 18,26 | 273 | 81,74 | 334 | 100 |

1: CO: Classificação operacional; PB:Paucibacilares; MB:Multibacilares.

Dentre os 334 doentes, 290 tinham amostras de *swab* bucal e nasal. A positividade geral para DNA do bacilo em *swabs* bucal e nasal desses doentes foi de 17,59% (51/290) e 39,31% (114/290) (Tabela 4), respectivamente, com diferença estatisticamente significativa ($\chi^2=11,588$; $p=0,0012$).

A concordância geral entre os resultados de PCR de *swab* bucal e nasal foi de 71,37% (207/290; 41 positivos e 166 negativos), ($k=0,4956$; $p<0,0001$). Do total de pacientes, 3,45% (10/290) apresentaram resultado positivo para PCR de *swab* bucal e negativo para PCR de *swab* nasal (Tabela 4).

Tabela 4: Concordância entre a detecção do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal e nasal de pacientes com hanseníase. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| PCR <i>Swab</i> Bucal | PCR <i>Swab</i> Nasal | | | | Total | |
|-----------------------|-----------------------|--------------|------------|--------------|------------|------------|
| | Positivo | | Negativo | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Positivo | 41 | 14,14 | 10 | 3,45 | 51 | 17,59 |
| Negativo | 73 | 25,17 | 166 | 57,24 | 239 | 82,41 |
| Total | 114 | 39,31 | 176 | 60,69 | 290 | 100 |

A positividade de detecção do *M. leprae* em *swabs* bucal e nasal aumentou em direção ao pólo V, atingindo 44,07% (26/59) em *swab* bucal e 100% (59/59) em *swab* nasal ($\chi^2=77,643$; $p<0,0001$) (Figura 6).

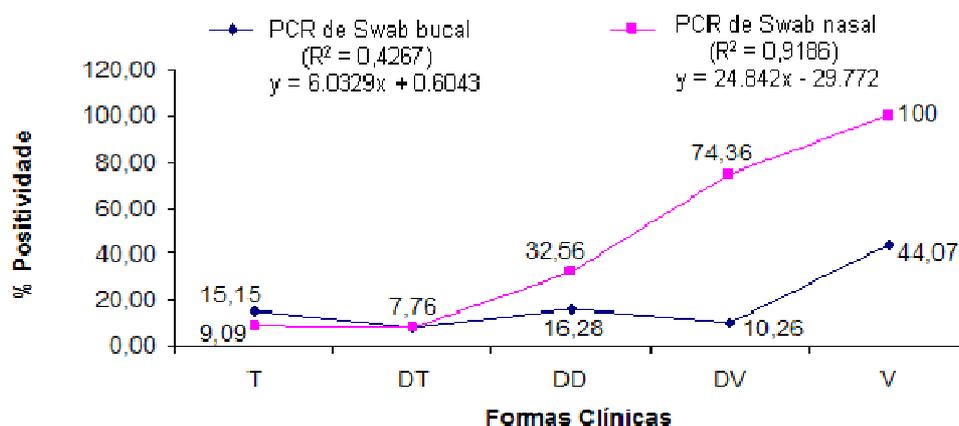


Figura 6: Positividade para detecção do *M. leprae* em amostras de *swabs* bucal e nasal de pacientes com hanseníase segundo formas clínicas de Ridley e Jopling. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

Com relação ao teste sorológico ELISA anti-PGL-1, 272 doentes apresentaram resultados deste exame e de PCR em amostras de *swab* bucal. Dentre os doentes que apresentaram positividade para o teste ELISA anti-PGL-1, 20,11% (36/179) foram positivos também para detecção do DNA do *M. leprae* em *swab* bucal. A concordância de ambos os testes foi de 43,75% (119/272; 36 positivos e 83 negativos), ($k=0,0697$; $p=0,0254$) (Tabela 5).

Tabela 5: Concordância entre a detecção do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal e teste ELISA anti-PGL-1 de pacientes com hanseníase. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| PCR <i>Swab</i> Bucal | ELISA anti-PGL-1 | | | | Total | |
|-----------------------|------------------|-------|----------|-------|-------|-------|
| | Positivo | | Negativo | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Positivo | 36 | 78,26 | 10 | 21,74 | 46 | 16,91 |
| Negativo | 143 | 63,27 | 83 | 36,73 | 226 | 83,09 |
| Total | 179 | 65,81 | 93 | 34,19 | 272 | 100 |

Para o teste intradérmico de Mitsuda, 260 doentes apresentaram resultado deste exame e de PCR em amostras de *swab* bucal. A concordância do teste de Mitsuda com a detecção do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal foi de 49,23% (128/260; 12 positivos e 116 negativos), ($k=-0,1322$; $p=0,0059$) (Tabela 6). Além disso, dos doentes que apresentaram teste de Mitsuda negativo, 23,18% (35/151) apresentaram *swab* bucal positivo.

Tabela 6: Concordância entre a detecção do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal e teste intradérmico de Mitsuda de pacientes. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| PCR <i>Swab</i> Bucal | Teste de Mitsuda | | | | Total | |
|-----------------------|------------------|-------|----------|-------|-------|-------|
| | Positivo | | Negativo | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Positivo | 12 | 25,53 | 35 | 74,47 | 47 | 18,08 |
| Negativo | 97 | 45,54 | 116 | 54,46 | 213 | 81,92 |
| Total | 109 | 41,92 | 151 | 58,08 | 260 | 100 |

4.2. Contatos domiciliares

A média de idade dos 1288 contatos domiciliares analisados foi de 28,46±19,3 anos e 55,90% (720/1288) eram do gênero feminino (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição de contatos domiciliares de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling do caso índice, segundo gênero e média de idade na abordagem. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| Caso Índice ¹ | Gênero | | Idade média na abordagem | | Total | | |
|--------------------------|-------------------|------------------|--------------------------|--------------|--------------|-------------|------------|
| | Masc ² | Fem ³ | | | n | % | |
| | n | % | n | % | | | |
| T | 43 | 51,19 | 41 | 48,81 | 28,83 | 84 | 6,52 |
| DT | 213 | 47,87 | 232 | 52,13 | 28,13 | 445 | 34,55 |
| DD | 99 | 44,20 | 125 | 55,80 | 28,26 | 224 | 17,39 |
| DV | 88 | 38,43 | 141 | 61,57 | 27,27 | 229 | 17,78 |
| V | 125 | 40,85 | 181 | 59,15 | 29,85 | 306 | 23,76 |
| Total Geral | 568 | 44,10 | 720 | 55,90 | 28,46 | 1288 | 100 |

1: Formas clínicas do caso índice: T:tuberculóide; DT:dimorfo-tuberculóide; DD:dimorfo-dimorfo; DV:dimorfo-virchowiano; V:virchowiano; 2: Masc:Gênero Masculino; 3:Fem:Gênero Feminino.

Com relação à classificação operacional do caso índice, houve predominância de 77,09% (993/1288) de contatos de MB. A positividade geral de detecção do DNA do *M. leprae* em *swab* bucal de contatos foi de 6,83% (88/1288) entre homens e mulheres (Tabela 8), sendo estatisticamente significativa a diferença com a positividade geral de 18,26% (61/334) encontrada nos doentes ($\chi^2=5,207$; $p=0,0373$).

Tabela 8: Detecção do DNA do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal de contatos domiciliares de acordo com as formas clínicas de Ridley e Jopling do caso índice. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| Caso índice ¹ | PCR Swab Bucal | | | | | |
|--------------------------|----------------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|
| | Positivo | | Negativo | | Total | |
| | n | % | n | % | n | % |
| T | 6 | 7,14 | 78 | 92,86 | 84 | 6,52 |
| DT | 29 | 6,52 | 416 | 93,48 | 445 | 34,55 |
| DD | 24 | 10,71 | 200 | 89,29 | 224 | 17,39 |
| DV | 16 | 6,99 | 213 | 93,01 | 229 | 17,78 |
| V | 13 | 4,25 | 293 | 95,75 | 306 | 23,76 |
| Total | 88 | 6,83 | 1200 | 93,17 | 1288 | 100 |

1: Formas clínicas do caso índice: T:tuberculóide; DT:dimorfo-tuberculóide; DD:dimorfo-dimorfo; DV:dimorfo-virchowiano; V:virchowiano.

Analisando os contatos domiciliares de doentes PB e MB, 5,08% (15/295) e 7,35% (73/993) apresentaram resultado de *swab* bucal positivo para detecção de *M. leprae*, respectivamente ($\chi^2=0,415$; $p=0,7187$).

Para o teste ELISA anti-PGL-1, 911 contatos apresentaram resultados deste exame e de PCR em amostras de *swab* bucal. A concordância observada entre *swab* bucal e teste ELISA anti-PGL-1 em contatos foi de 81,0% (738/911; 13 positivos e 725 negativos), ($k=0,0426$; $p>0,05$). Dentre os 60 contatos positivos para DNA de *M. leprae* em *swab* bucal, 21,67% (13/60) apresentaram ELISA anti-PGL-1 positivo (Tabela 9).

Tabela 9: Concordância entre a detecção do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal e teste ELISA anti-PGL-1 de contatos domiciliares. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| PCR Swab Bucal | ELISA anti-PGL-1 | | | | Total | |
|----------------|------------------|--------------|------------|--------------|------------|------------|
| | Positivo | | Negativo | | n | % |
| | n | % | n | % | | |
| Positivo | 13 | 21,67 | 47 | 78,33 | 60 | 6,59 |
| Negativo | 126 | 14,81 | 725 | 85,19 | 851 | 93,41 |
| Total | 139 | 15,26 | 852 | 93,52 | 911 | 100 |

Para o teste intradérmico de Mitsuda, 1217 contatos apresentaram resultados deste exame e de PCR em amostras de *swab* bucal. A concordância entre o teste de Mitsuda e *swab* bucal foi de 23,41% (285/1217; 68 positivos e 217 negativos), ($k=0,0624$; $p<0,001$). Dentre os 80 contatos positivos para DNA de *M. leprae* em *swab* bucal, 15% (12/80) foram negativos para o teste de Mitsuda (Tabela 10).

Tabela 10: Concordância entre a detecção do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal e teste intradérmico de Mitsuda de contatos domiciliares. CREDESH/HC/FAMED/UFU, 2010.

| PCR Swab Bucal | Teste de Mitsuda | | | | Total | |
|-------------------|------------------|-------|----------|-------|-------|-------|
| | Positivo | | Negativo | | n | % |
| | n | % | n | % | n | % |
| Positivo | 68 | 85 | 12 | 15 | 80 | 6,57 |
| Negativo | 920 | 80,91 | 217 | 19,09 | 1137 | 93,43 |
| Total | 988 | 81,18 | 229 | 18,82 | 1217 | 100 |

5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho da literatura que faz abordagem molecular por meio da detecção do DNA do *M. leprae* por PCR em *swab* bucal de pacientes com hanseníase e seus contatos domiciliares, comparando-a com a PCR em amostras de *swab* nasal e as formas clínicas do espectro da hanseníase (RIDLEY E JOPLING, 1966) em doentes, além da avaliação das respostas humoral e celular nos pacientes e contatos.

Os doentes analisados eram procedentes de área endêmica de hanseníase, com maior prevalência de indivíduos do gênero masculino, corroborando com trabalho anterior que aponta o estilo de vida e maior inserção no mercado de trabalho como fatores de aumento de risco para os homens (NOORDEEN, 1985). A faixa etária predominante foi da população economicamente ativa (PEA), como descrita em outro trabalho (NOORDEEN, 1985).

Na classificação operacional houve maior prevalência de pacientes MB, concordando com a literatura (LOMBARDI E SUÁREZ, 1997). Com relação às formas clínicas, houve predomínio do grupo dimorfo, de maior instabilidade imunológica, especialmente da forma DT, seguindo o padrão africano de prevalência da doença, provavelmente, refletindo um fator genético na habilidade de expressar a imunidade mediada por célula ao *M. leprae* (PFALTZGRAFF E BRYCESON, 1985).

Quanto à classificação das formas clínicas, os resultados do presente trabalho mostraram que a resposta humoral, avaliada pelo teste ELISA anti-PGL-1, é diretamente proporcional à carga bacilar, medida pelo IB de

esfregaço e de biópsia de lesão de pele (CHO *et al.*, 1983; SCOLLARD *et al.*, 2006), aumentando à medida que atravessa o espectro em direção ao pólo V; e inversamente proporcional ao teste intradérmico de Mitsuda (resposta celular), fortemente positivo no pólo T, corroborando com a classificação espectral da doença (RIDLEY E JOPLING, 1966).

Quanto à análise da PCR em *swab* bucal, a positividade em pacientes MB foi maior do que em PB, sem diferença estatisticamente significativa. No entanto, observou-se positividade para DNA do *M. leprae* na cavidade oral em todas as formas clínicas da doença, inclusive nos pacientes PB, da forma T, indicando que são portadores do bacilo, sendo que a boca poderia funcionar como via de infecção inicial e transitória para essa forma clínica, que apresenta IB negativo no esfregaço dérmico e na biópsia de lesão de pele. Além disso, a condição de positividade na forma T poderia contribuir para transmissão do bacilo para os contatos domiciliares.

No presente trabalho, a positividade de *swab* nasal em pacientes foi maior que a positividade de *swab* bucal nas formas clínicas do espectro, com exceção da forma T, corroborando com trabalhos na literatura que demonstraram que a mucosa nasal é o sítio preferencial para entrada e saída do *M. leprae* (REES E MCDUGALL, 1977). O envolvimento da mucosa nasal está bem estabelecido na hanseníase e definido de acordo com as formas clínicas (PATROCÍNIO *et al.*, 2005; NAVES *et al.*, 2009).

Este estudo permitiu analisar doentes que apresentaram positividade em PCR de *swab* bucal e negatividade para a detecção do bacilo em *swab* nasal, demonstrando que existem pacientes com carga bacilar na cavidade oral e que

estes podem ter sido infectados pela boca, além de contribuírem para a disseminação do bacilo por esta via.

A positividade de *M. leprae* por PCR obtida em *swab* bucal em pacientes com teste sorológico ELISA anti-PGL-1 positivo e teste intradérmico de Mitsuda negativo reforça o envolvimento dos doentes MB, com baciloscopia positiva em esfregaço dérmico e biópsia de lesão de pele, como principal fonte de transmissão do bacilo pelas vias aéreas superiores (PFALTZGRAFF E BRYCESON, 1985).

É importante ressaltar a diferença quase três vezes maior encontrada entre a positividade geral para detecção de DNA em *swabs* bucais de doentes com relação aos contatos, demonstrando que a maior fonte de infecção e transmissão do *M. leprae* são os doentes não tratados (NOORDEEN, 1985).

Com relação aos contatos domiciliares, a maior prevalência de indivíduos do gênero feminino e a média de faixa etária poderiam ser explicadas pelo maior número de mulheres adultas que procuram os serviços de saúde quando são convocadas para fazerem a vigilância de contatos de hanseníase (BRASIL, 2009), além da maior exposição ao doente no ambiente domiciliar.

Não houve diferença estatisticamente significativa da positividade para DNA do *M. leprae* em *swab* bucal de contatos domiciliares de doentes PB e MB, provavelmente, porque pacientes paucibacilares também apresentam DNA de *M. leprae* nas vias aéreas superiores, como demonstrado neste trabalho, e que podem eliminar bacilos, o que poderia justificar o risco desse contato adoecer duas vezes mais do que a população de não contatos (NORDEEN, 1985). Além disso, o fato de ambos os contatos, de casos PB e MB, viverem

em área endêmica da doença, poderia oportunizar novos contatos com bacilos (KLATSER *et al.*, 1993).

Nesta abordagem de epidemiologia molecular foi demonstrada a presença de DNA do *M. leprae* em *swab* bucal de contatos que são negativos para o teste ELISA anti-PGL-1, podendo-se inferir que eles estão sob pressão da carga bacilar do doente antes de ser tratado, com o qual conviveram dentro do domicílio, em um ambiente de alta infectividade e, dessa forma, em um primeiro momento passam a ser portadores do bacilo na cavidade oral, contribuindo para disseminá-lo em área endêmica (GOULART E GOULART, 2008).

Em um segundo estágio, esses contatos domiciliares sadios não apenas são portadores do bacilo na cavidade oral, como também passam a ter infecção subclínica, apresentando concomitância de soropositividade ELISA anti-PGL-1 e presença de DNA de *M. leprae* em *swab* bucal, como demonstrado no presente trabalho, reforçando um papel ativo desses contatos na transmissão da doença (CHO *et al.*, 1992; BAUMGART *et al.*, 1993; VAN BEERS *et al.*, 1999).

A associação da positividade de DNA do bacilo em *swab* bucal e negatividade para o teste de Mitsuda em contatos poderia aumentar o risco de contrair a hanseníase nesses indivíduos, uma vez que apenas o teste Mitsuda negativo já confere uma chance de ocorrência seis vezes maior para a doença (GOULART E GOULART, 2008).

Sabendo que a hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública, seria necessário monitorar os contatos positivos para o DNA do *M. leprae* em amostras de *swab* bucal, em especial aqueles soropositivos para o

ELISA anti-PGL-1 e negativos para o teste intradérmico de Mitsuda, que já apresentam infecção subclínica e ausência de imunidade celular específica ao *M. leprae*, conferindo uma chance maior de desenvolver a doença (GOULART E GOULART, 2008).

6. CONCLUSÃO

Este estudo sobre a detecção do DNA do *M. leprae* em *swabs* bucais demonstrou que a boca pode ser uma via de infecção e transmissão da hanseníase e que os contatos podem estar envolvidos na transmissão ativa do *M. leprae* em áreas endêmicas, apresentando grande relevância epidemiológica para a área médica e odontológica e possibilitando, assim, novas estratégias de prevenção e controle da doença.

REFERÊNCIAS

BARTON, R.P.E. Lesions of the mouth, pharynx and larynx in lepromatous leprosy. **Lepra India**, v.46, p.130-134, 1974.

BAUMGART, K.W.; BRITTON, W.J.; MULLINS, R.J.; BASTEN, A.; BARNETSON, R.S. Subclinical infection with *Mycobacterium leprae* – a problem for leprosy control strategies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, V.87, p.412-415, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária. **Relatório de Avaliação Nacional do Controle da Hanseníase**. Brasília, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 125/SVS-SAS de 2009**. Brasília.

CHO, S.N.; KIM, S.H.; CELLONA, R.V.; CHAN, J.P.; FAJARDO, T.T.; WALSH, G.P. *et al.* Prevalence of IgM antibodies to phenolic glycolipid I among household contacts and controls in Korea and the Philippines. **Leprosy Review**, v.63, p.12-20, 1992.

CHO, S.N.; YANAGIHARA, D.L.; HUNTER, S.W.; GELBER, R.H.; BRENNAN, P.J. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. **Infection and Immunity**, v.41, p.1077-1083, 1983.

CHO, S.N.; YANAGIHARA, D.L.; HUNTER, S.W.; REA, T.H.; GELBER, R.H.; BRENNAN, P.J. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in the serodiagnosis of leprosy. **Infection and Immunity**, v.41, p.1077-1083, 2001.

COSTA, A.P.; NERY, J.A.; OLIVEIRA, M.L.W.; CUZZI, T.; SILVA, M.R. Oral Lesions in Leprosy. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v.69, n.6, p.381-385, 2003.

COSTA, L.C.V.; ANDRADE, K.L.C.; CARMO, M.A.V.; FERREIRA, M.A.A.; GARROCHO, A.A. Manifestações bucofaciais da hanseníase. **Revista do CROMG**, v.8, n.3, p.191-197, 2002.

COSTA, M.R.S.N. Considerações sobre o envolvimento da cavidade bucal na hanseníase. **Hansenologia Internationalis**, v.33, n.1, p.41-44, 2008.

D'ABREU, P.C.; DURÃES, S.M.B.; ESTRELA, R.R.; BALTAZAR, M.C.N.P.; ROCHAEL, M.C. Hanseníase virchowiana diagnosticada através de exame histopatológico de lesão oral em paciente com pênfigo foliáceo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.75, n.3, p.339-46, 2000.

GOULART, I.M.B.; BERNARDES SOUZA, D.O.; MARQUES, C.R.; PIMENTA, V.L.; GONÇALVES, M.A.; GOULART, L.R. Risk and protective factors for leprosy development in na epidemiological surveillance of household contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.15, p.101-105, 2008.

GOULART, I.M.B.; GOULART, L.R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Archives of Dermatological Research** v.300, p.269-290, 2008.

IZUMI, S.; BUDIAWAN, T.; SAEKI, K.; MATSOUKA, M.; KAWATSU, K. An epidemiological study on *Mycobacterium leprae* infection and prevalence of leprosy in endemic villages by molecular biological technique. **Indian Journal of Leprosy**, v.71, p.37-43, 1999.

JOPLING, W.H.; MCDOUGALL, A.C. Manual de Hanseníase. Rio de Janeiro/São Paulo:Atheneu, p.61-61, 1991.

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

LOBATO, J.; COSTA, M.P.; REIS, E.M.; GONÇALVES, M.A.; COSTA, A.D.; SPENCER, J. *et al.* Detecção de infecção subclínica e diagnóstico sorológico em hanseníase. In: 11º Congresso Brasileiro de Hansenologia. Porto Alegre. **Hansenologia Internationalis**, 33, 2008.

LOMBARDI, C.; SUÁREZ, R.E.G. Epidemiologia da Hanseníase. In: **Hanseníase**. TALHARI, S.; NEVES, R.G. (Eds.). Manaus: Gráfica Tropical, p.127-136, 1997.

MOET, F.J.; MEIMA, A.; OSKAM, L.; RICHARDUS, J.H. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Leprosy Review**, v.75, p.310-326, 2004.

NAVES, M.M.; PATROCÍNIO, L.G.; PATROCÍNIO, J.A.; MOTA, F.M.N.; SOUZA, A.D.; FLEURY, R.N. *et al.* Contribution of nasal biopsy to leprosy diagnosis. **American Journal of Rhinology & Allergy**, v.23, n.2, p.177-180, 2009.

NOORDEEN, S.K. The epidemiology of leprosy. In: **Leprosy**. HASTINGS, R.C. (ED.). New York: Churchill Livingstone, p.15-30, 1985.

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

- PFALTZGRAFF, R.E.; BRYCESON, A. Clinical Leprosy. In: **Leprosy**. HASTINGS, R.C. (Ed.). New York: Churchill Livingstone, p.134-176, 1985.
- RAMAPRASAD, P.; FERNANDO, A.; MADHALE, S.; RAO, J.R.; EDWARD, V.K.; SAMSON, P.D. *et al*/ Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. **Leprosy Review**, v.68, p.301-315, 1997.
- RIDLEY, D.S. Skin biopsy in leprosy. Documenta Geigy. 3^a ed. Switzerland:CIBA-GEIGY Limited, 1990.
- RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **International Journal of Leprosy**, v.34, p.255-273, 1966.
- REES, R.J.W. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. (ED.).New York: Churchill Livingstone, p.31-52, 1985.
- REES, R.J.W.; MCDUGALL, A.C. Airbone infection with *Mycobacterium leprae* in mice. **Journal of Medical Microbiology**, v.10, p.63-68, 1977.
- REIS, S.R.A.; VIANA, L.C.; SOUZA, V.F.; MARCHIONNI, V.M.T. Manifestações Orais da Hanseníase. **Revista da Faculdade de Odontologia da UFBA**, v.16-17, p.53-58, 1996.
- SANTOS, G.G.; MARCUCCI, G.; GUIMARÃES JÚNIOR, J.; MARGARIDO, L.C.; LOPES, L.H.C. Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em biópsias de mucosa oral por meio da reação em cadeia da polimerase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.3, p.245-249, 2007.
- SCOLLARD, D.M.; ADAMS, L.B.; GILLIS, T.P.; KRAHENBUHL, J.L.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D.L. The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.2, p.338-381, 2006.
- TALHARI, S.; NEVES, R.G. Dermatologia Tropical: Hanseníase. Manaus:Editora Tropical, 1997.

VAN BEERS, S.; HATTA, M.; KLATSER, P.R. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid I among schoolchildren as an indicator of leprosy endemicity. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v.67, p.243-249, 1999.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) Expert committee on leprosy sixth report. **World Health Organization Technical Report Series**, n.768, 1988.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Global Leprosy Situation. **The Weekly Epidemiological Record**, v.84, p.333-340, 2009.

Anexo A – Parecer nº099/03 do Comitê de Ética em Pesquisa


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

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 099/03

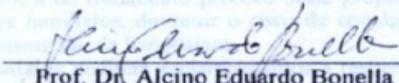
Uberlândia, 07 de julho de 2003.

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

Prezado(a). Professor(a),

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

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


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

Anexo B – Parecer nº499/08 do Comitê de Ética em Pesquisa



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

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

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

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

Pesquisador Responsável: Isabela Maria Bernardes Goulart

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

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

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega dos relatórios parciais: Dezembro de 2008.

Dezembro de 2009.

Dezembro de 2010.

Dezembro de 2011.

Data para entrega do relatório final: março de 2012.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

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

Uberlândia, 10 de outubro de 2008.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado

Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da

pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: Caracterização Imunológica e Molecular dos Pacientes com Hanseníase e seus Comunicantes para Identificação de Grupos de Risco.

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

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

Para isso, a equipe de saúde do Centro de Referência Nacional Hanseníase/Dermatologia Sanitária (CREDESH/UFU) está propondo uma pesquisa onde deverão ser realizados os exames de rotina para o diagnóstico da doença nos pacientes, tais como baciloscopia, teste de Mitsuda e biópsia de lesão de pele e, nos contatos domiciliares, serão realizados exames dermatoneurológico, teste de Mitsuda (uma injeção de 0,1 ml intradérmica no antebraço para avaliar a imunidade celular/resistência) e teste sorológico ELISA (para detectar anticorpos contra a bactéria que causa a hanseníase no sangue da pessoa testada, coletando uma gota de sangue com uma picada na ponta do dedo e 1 tubo de 8 ml, respectivamente, para avaliar se ela está ou foi infectada indicando que a pessoa corre um risco maior de desenvolver a hanseníase). Nos pacientes e seus contatos serão realizados ainda coleta de swabs das cavidades nasal/ bucal com escovinha própria e biópsia de pequeno fragmento de corneto nasal com pinça de nariz, ambos procedimentos para identificar DNA do bacilo de Hansen. Cabe ressaltar que todo material utilizado será estéril e descartável, e no caso das biópsias, serão realizadas com anestésico local. O material coletado será enviado ao laboratório do CREDESH/UFU, onde serão realizados os exames pela técnica de DNA e os resultados serão mantidos em sigilo.

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

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

Pelos presentes termos apresentados por este documento, eu,

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

Uberlândia, ____ de ____ de 20____.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)