



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

MÉDICA

ARACÉLIA GURGEL RODRIGUES

**ESTUDO DO POLIMORFISMO C2029T NO GENE DO  
RECEPTOR *tool-like* TIPO 2 E DA RESPOSTA IMUNE  
HUMORAL EM PACIENTES COM HANSENÍASE**

FORTALEZA/CE

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

ARACÉLIA GURGEL RODRIGUES

**ESTUDO DO POLIMORFISMO C2029T NO GENE DO  
RECEPTOR *tool-like* TIPO 2 E DA RESPOSTA IMUNE  
HUMORAL EM PACIENTES COM HANSENÍASE**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.a Dr.a Aparecida Tiemi Nagao-Dias  
Co-Orientadora: Prof.a Dr.a Silvia Helena Rabenhorst

FORTALEZA/CE

2008

ARACÉLIA GURGEL RODRIGUES

**ESTUDO DO POLIMORFISMO C2029T NO GENE DO RECEPTOR *tool-like* TIPO 2  
E DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM PACIENTES COM HANSENÍASE**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Data da Defesa: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Pesquisador Científica Dra. Vânia Nieto Brito de Souza  
Instituto Lauro de Souza Lima

---

Prof.a Dr.a Sílvia Helena Rabenhorst  
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

---

Prof.a Dr.a Lília Maria Carneiro Câmara  
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

---

Prof.a Dr.a Aparecida Tiemi Nagao-Dias (Orientadora)  
Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Ceará

*Dedico este trabalho aos meus amados pais que sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu mesma duvidava, aos meus queridos irmãos, minha família e amigos .*

## AGRADECIMENTOS

Acima de todas as coisas agradeço a Deus ter me dado força, paciência e determinação para que eu pudesse chegar a esse momento, em segundo agradeço aos meus pais por me acompanharem e me darem conforto e motivação nos momentos que eu mais precisei.

Agradeço aos meus irmãos, meus companheiros de luta, aos meus familiares pelo apoio e em especial as tias Assunção, Estela e a meus avós que não estão mais entre nós, mas que gostariam de participar desse momento, a tia Dejanira, tia Wilma e minha madrinha Raimunda.

Meu agradecimento a minha orientadora e amiga professora Aparecida Tiemi Nagao-Dias que tanto me ajudou e teve paciência nos meus momentos de crise e aos amigos(as) do laboratório de Imunologia da UFC que direta ou indiretamente me ajudaram Paula, Evandro, Fabrícia, Kaila e Luciana. Aos meus amigos de turma Luana, João Jaime, Lídia, Silviane e Renato pelo companheirismo.

A minha co-orientadora professora Sílvia Helena Rabenhorst que me acolheu no seu laboratório e tornou possível essa pesquisa e a todos os amigos do laboratório de Genética da UFC Marcelo, Valeska, Germano, Roberta, Rita, Débora, Markênia, Isabelle, Thiago, Gervina, Camilla e Vilena.

Ao professor Thalles que foi extremamente acessível e de fundamental ajuda nesse projeto e a aluna de iniciação científica Marina do laboratório de Biologia molecular que mesmo sem me conhecer me ajudou com extrema boa vontade.

A Dra. Márcia Brasil e a Dra. Tereza Prata que ajudaram em todo o percurso do trabalho e aos funcionários do setor de dermatologia do HUWC sempre tão dispostos a ajudar, agradeço também à prefeitura de Maracanaú e a Marizângela.

Aos professores do Mestrado em Microbiologia Médica – UFC, que contribuíram para minha formação, aos funcionários do Mestrado e a FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa).

*“A fé é a certeza de que vamos receber as coisas que esperamos  
e a prova de que existem coisas que não vemos.”*

Hb 11,1

## LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CD	Células Dendríticas
DG	Domínio globular
ENL	Eritema Nodoso Lepromatoso
FDA	Food Drug and Administration
GroEs	Proteína de Choque térmico
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IB	Índice Baciloscópio
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IKK	Kinase inibitória kB
IL-2	Interleucina 2
LAM	Lipoarabinomana
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
mAb	Anticorpo monoclonal
MB	Multibacilar
MHBB	Forma Boderline- Boderline da hanseníase
MHBT	Forma Boderline -tuberculóide da hanseníase
MHBV	Forma Boderline -Virchowiana da hanseníase
MHI	Forma Indeterminada da hanseníase
MHT	Forma Tuberculóide da hanseníase
MHV	Forma Virchowiana da hanseníase
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NK	Natural Killer
NRAMP1	Resistência natural associada a proteína 1 macrofágica
OMS	Organização Mundial de Saúde



PACRG	Gene co-regulado com parquina
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PARK2	Parquina
PB	Paucibacilar
pCBNA	Antígeno Bacilar Completamente Processado
PCR	Proteína C Reativa
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGL-1	Glicolípido fenólico 1
RNI	Reativos intermediários do nitrogênio
ROI	Reativos intermediários do oxigênio
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor da célula T
THP-1	Células da linha mielomonocíticas humana
Tir	Domínio Intracelular
TLR	Receptores Toll-like
TLR2	Receptores Toll-like tipo 2
TLR4	Receptores Toll-like tipo 4
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
TRAF6	Fator de necrose tumoral pelo fator 6
VDR	Receptor da vitamina D
WHO	World Health Committee

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Interação de <i>M. leprae</i> com a lâmina basal da unidade célula de Schwann-axônio. Fonte: Ng et al., 2000 .....	22
2	Baciloscopia com IB 6 cruces de amostra de linfa de paciente com a forma clínica virchowiana da hanseníase (#87). Fonte: RODRIGUES, 2008.....	24
3	Ligação entre o receptor Toll-like e PAMP. Fonte: CARRILLO-ESPER, 2003.....	31
4	Cascata de ativação da transcrição de citocinas através dos receptores Toll-like Fonte: MCINTURFF et al., 2005.....	32
5	Susceptibilidade genética da hanseníase na etapa de patogênese da doença (hanseníase per se) e na forma clínica manifestada pelo paciente infectado. Fonte: PREVEDELLO; MIRA, 2007.....	34
6	Níveis séricos de IgG anti-PGL1 em 83 amostras pacientes com hanseníase no momento de sua inclusão no projeto.....	50
7	Heredograma da família da paciente #ESMF.....	52
8	Sorologia realizada em 2007 na paciente ESMF (#38) com a forma boderline - tuberculóide e em seus comunicantes intra-domiciliares.....	52
9	Sorologia realizada em 2008 na paciente EMSF (#38) com a forma boderline-tuberculóide e em seus comunicantes intra-domiciliares.....	53
10	Produtos de amplificação da seqüência de tamanho 171 pb da região intra-celular do receptor <i>Toll-like 2</i> de 11 pacientes com hanseíase analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e revelado com brometo de etídio. Utilizou-se um padrão de peso molecular 100 pares de bases.....	54
11	Perfil eletroforético de 10 amostras de produtos de PCR do domínio intra-celular de receptores Toll-like 2 analisados pela técnica de SSCP. A linha 1 apresenta um padrão com 100 pares de base.....	55
12	PCR-SSCP de 14 amostras de produtos de PCR.....	55
13	Perfil eletroforético de 17 amostras de produtos de PCR do domínio intra-celular de receptores Toll-like 2 analisados pela técnica de SSCP. A linha 1 apresenta um padrão com 100 pares de base. As bandas de 171pb apresentadas no gel são produto do PCR.....	56

14	Eletroferograma do seqüenciamento das bases nucleotídicas da região de 171 pb de receptores Toll-like 2. Há um padrão de heterozigose, mostrando dois picos, A e G, na posição C2006T.....	59
15	Eletroferograma do seqüenciamento das bases nucleotídicas da região de 171 pb de receptores Toll-like 2. Há um padrão de heterozigose, mostrando dois picos, A e G, na posição C2029T.....	59
16	Eletroferograma do seqüenciamento das bases nucleotídicas da região de 171 pb de receptores Toll-like 2. Há um padrão de heterozigose, mostrando dois picos, A e C, na posição T2008G.....	59

## LISTA DE QUADROS

Quadro	Título	Página
1	Ligação de padrões moleculares associados com patógenos com receptores <i>Toll like</i> em humanos. Fonte: FORCHIELLI; WALKER, 2005.....	30
2	Seqüências de nucleotídeos de TLR-2 selecionadas para amplificação. Fonte: KANG; CHAE, 2001.....	45
3	Amostras de 2 pacientes MHV e 2 pacientes MHT seqüenciadas. Fonte: RODRIGUES, 2008.....	57
4	Seqüência de bases nucleotídicas da região intracelular amplificada dos receptores <i>Toll like 2</i> . As posições marcadas representam as posições onde os polimorfismos foram encontrados. Fonte: KANG; CHAE (2001).....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Número de pacientes avaliados no presente estudo segundo a forma clínica da hanseníase baseada nos critérios da Organização Mundial de Saúde(OMS) e de Ridley e Jopling. Fonte: RODRIGUES, 2008.....	48
2	Número de pacientes com hanseníase, segundo a forma clínica e condição de Tratamento.....	49
3	Positividade de IgG sérica anti PGL-1 entre os participantes com as formas clínicas MHT/MHBV ou MHT da hanseníase. Fonte: RODRIGUES, 2008.....	51

## RESUMO

Apesar do empenho do Ministério da Saúde para a eliminação da hanseníase, o Brasil é o segundo país em número de casos no mundo, precedido pela Índia, e responsável por 80% dos casos no continente americano, sendo o Nordeste do país e, em especial, o Estado do Ceará considerado uma região de alta endemicidade. De acordo com a classificação de Ridley e Jopling, as formas clínicas dividem-se em virchowiana, dimorfa-virchowiana, dimorfa-dimorfa, dimorfa-tuberculóide e tuberculóide. O trabalho foi realizado com 87 pacientes com hanseníase, sendo 51,72% do sexo feminino e 48,3% do sexo masculino; destes 87 pacientes, 77,01% vacinados em algum período da vida entre a infância a adolescência. Os pacientes incluídos no estudo encontravam-se não tratados (n=23) ou em tratamento (n=64), apresentando a maioria dos pacientes a hanseníase pela primeira vez e alguns apresentavam recidiva (n=11). A sorologia de IgG sérica anti-PGL1 foi realizada em 83 pacientes, tendo sido as concentrações de maiores diferenças ocorridas entre os grupos com a forma tuberculóide e dimorfa-tuberculóide e o grupo com a forma dimorfa-virchowiana. As 87 amostras analisadas foram amplificadas quanto à sequência de 171 pb de uma região altamente conservada dos aminoácidos 671-692 do C-terminal no domínio intracelular do receptor *Toll-like 2* e foi aplicada a técnica de Análise do Polimorfismo Conformacional de Fita Única (SSCP). O perfil eletroforético das amostras testadas encontradas foram de duas e três bandas, mostrando-se necessário o sequenciamento, este apresentou heterozigose marcado pela presença das bases C e T na posição C2029T, e além de dois outros perfis de heterozigose nas posições C2006T (encontrado em todas as amostras sequenciadas) e T2008G (amostra 82). O trabalho sugere que houve heterozigose na região do éxon 3 do gene do receptor *tool-like* tipo 2, diferentemente do encontrado por Kang e Chae (2001) o que pode significar que o perfil de suscetibilidade em nossa população é distinta daqueles encontrados na Índia e na Coréia.

## ABSTRACT

Although several efforts from Ministry of Health have been made in order to eliminate leprosy, Brazil is still the second country with the highest number of cases in world after India and is responsible for 80% of the cases in the American continent, the Ceara state situated in the Northeastern region is considered to have high incidence rates of leprosy cases. According to Ridley and Jopling classification, the clinical forms of leprosy can be divided in lepromatous leprosy, borderline lepromatous leprosy, borderline borderline leprosy, borderline tuberculoid leprosy, and tuberculoid leprosy. This work was done with 87 patients with leprosy, being 51.72 % of the female gender and 48.3% of the male gender; from the total of patients, 77.0% had been vaccinated with BCG once in life. All the patients enrolled in the study were not treated (n=23) or in treatment (n=64). Most of the patients had suffered from leprosy for the first time and some (n=11) had suffered from leprosy recidive. The anti-PGL1 serum IgG serology has been performed in 83 patients, and the most significant differences were found comparing the tuberculoid leprosy and borderline tuberculoid leprosy groups with the borderline lepromatous leprosy group. All DNA samples (n=87) were amplified in respect to the 171 bp highly conserved sequence of the aminoacids 671-692 from the C-terminal intra-cellular domain of Toll-like 2 receptor, and they were submitted to a Single Strain Conformation Polymorphism Technique (SSCP). The eletrophoretic profile found of the samples showed two and three bands, it is essential to the sequencing, this showed heterozygosis at position C2029T, and in addition two other sections of heterozygosity at positions C2006T (found in all four sequenced samples) and 2008 (sample 82). The work showed that the heterozygosity found in the gene exon 3 of the *tool-like* receptor type 2, unlike the one found by Kang and Chae (2001) which may mean that the susceptibility profile from our population is distinct from those found in India and Korea.

# ÍNDICE

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	Histórico.....	15
1.2	Epidemiologia da Hanseníase.....	16
1.3	Apresentação clínica da Hanseníase.....	17
1.4	Agente Etiológico da Hanseníase.....	20
1.5	Diagnóstico clínico e laboratorial da hanseníase.....	23
1.6	Tratamento da hanseníase.....	26
1.7	Resposta imune na hanseníase.....	27
1.8	Suscetibilidade genética do hospedeiro ao desenvolvimento da hanseníase.....	33
1.9	O papel da vacina BCG na prevenção de hanseníase.....	37
2	<b>PERGUNTA DE PARTIDA</b> .....	39
3	<b>HIPÓTESES CIENTÍFICAS</b> .....	40
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	41
4.1	Objetivo geral .....	41
4.2	Objetivos específicos .....	41
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
5.1	Casuística.....	42
5.2	Crítérios de Inclusão.....	42
5.3	Crítérios de Exclusão.....	42
5.4	Amostras de sangue.....	43
5.5	Aspectos Éticos.....	43
5.6	Determinação dos níveis séricos de IgG anti-PGL1.....	43
5.7	Extração de DNA de amostras de células mononucleares do sangue periférico.....	44
5.8	Amplificação da seqüência de nucleotídeos de TLR-2.....	45
5.9	Análise de polimorfismo de TLR-2.....	46
5.10	Análise da seqüência de nucleotídeos em amostras que apresentaram resultados alterados na técnica de SSCP.....	46
5.11	Análise Estatística.....	47
6	<b>RESULTADOS</b> .....	48



6.1	Dados clínicos dos paciente.....	48
6.2	Níveis séricos de IgG anti-PGL1.....	49
6.3	Amplificação da seqüência de 171 pb da região intra-celular do receptor Toll-like2.....	53
6.4	Análise do Polimorfismo Conformacional de Fita Única.....	54
6.5	Dados dos pacientes cujas amostras foram seqüenciadas.....	57
6.6	Seqüenciamento das amostras que apresentaram resultados alterados na técnica de SSCP.....	57
6.7	BLAST.....	60
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	61
7.1	Resposta imune humoral nos pacientes.....	61
7.2	Polimorfismo dos receptores Toll-like 2 nos pacientes.....	62
7.3	Polimorfismo Conformacional de Fita Única (SSCP).....	66
7.4	Análise da seqüência de nucleotídeos da região polimórfica.....	67
7.5	Polimorfismo <i>versus</i> Mutação.....	69
8	<b>CONCLUSÕES</b> .....	71
9	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	72
10	<b>ANEXOS</b> .....	80
	Anexo I – Carta de Aprovação do Comitê de Ética do HUWC.....	81
	Anexo II– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	82
	Anexo III – Questionário aplicado ao paciente.....	83
	Anexo IV – Fotos de pacientes com hanseníase.....	84
	Anexo V – Dados dos pacientes.....	86
11	<b>PUBLICAÇÃO</b> .....	90

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico

O caráter infeccioso da hanseníase foi demonstrado pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen (1841-1912), quando o mesmo, realizando estudos anatomo-patológicos com linfonodos de indivíduos normais e de pacientes com a doença, verificou a presença de massas granulares de aspecto amarelado, além de nódulos nos doentes. Com a aquisição de maior conhecimento em histopatologia, o pesquisador identificou o *Mycobacterium leprae* que, em 1874, foi reconhecido pela Sociedade Médica de Christiania (atualmente Oslo, capital da Noruega) como sendo o agente etiológico da hanseníase, conhecida anteriormente como lepra (TAN; GRAHAM, 2008). A Hanseníase existe desde há muitos séculos, não estando determinado o período exato de quando e onde a doença originou-se. Segundo alguns relatos, os primeiros casos da doença remontam de cerca de 600 anos antes de Cristo na Índia, durante a cultura helenística. A doença era conhecida pela tradução hebraica como *tsaraath*, que significava “manchas brancas deprimidas em que os pelos também se tornavam brancos”. A palavra *tsaraath* foi traduzido em grego para lepra, que significava “algo que descama”(WALKER, 1998).

Na China, um tratado médico terapêutico milenar chinês, conhecido como *Nei Ching Su Wen*, descreve os sinais da hanseníase, por volta de 2600 a.C., porém, uma autêntica descrição escrita por Hua To, chinês nascido aproximadamente no ano de 190 d.C. no *Complete Secret Remedies*, o autor relata que a pele apresenta-se inicialmente dormente, onde manchas vermelhas aparecem gradualmente, tornando-se inchadas e ulceradas, sendo que as sobrancelhas caem e os olhos tornam-se cegos, os lábios deformados e a voz rouca, as juntas dos dedos caem e o nariz torna-se achatado (SKINSNES, 1973 apud TRAUTMAN, 1984).

No período de 1411-1314 a.C., durante o período do Êxodo, acredita-se que a doença tenha sido introduzida em Canaã pelos israelitas. Na Grécia, há especulações que a hanseníase foi possivelmente introduzida por tropas de Darius e Xerxes (conquistadores persas) cerca de 400 a.C. Por outro lado, tropas de Alexandre o Grande introduziram a doença na Índia, chegando até o Egito, cerca de um século depois (TRAUTMAN, 1984).

Na Itália, a doença foi introduzida pelos soldados de Pompeu no ano de 62 a.C. Posteriormente, conquistadores romanos podem ter disseminado a doença na Europa, através das Cruzadas. Arataeus, o Capadociano, em 150 d.C., descreveu uma doença com nódulos e

úlceras na pele, absorção ou perda de dedos, referindo ainda que a doença não era fatal e sugeriu que a mesma teria surgido nos países Mediterrâneos da Europa séculos antes (TRAUTMAN, 1984)

Em geral, a incidência da hanseníase, entre outras patologias, aumentou no final da Idade Média, devido às colonizações de terras distantes da Europa. A identificação da doença levava o portador ao exílio até sua morte (HASTINGS, 1994).

No período de 1700 d.C., escravos oriundos de países como Angola, Congo e Guiné introduziram a doença no Canadá e posteriormente nos Estados Unidos. A hanseníase praticamente desapareceu da Inglaterra e em outros países aproximadamente no século XIX, estando presente atualmente em baixos números, em países, como Espanha, Portugal, Turquia, Itália, Região Báltica e Grécia (TRAUTMAN, 1984).

## **1.2 Epidemiologia da Hanseníase**

Em nível mundial, o número de casos novos de hanseníase registrado anualmente varia de 500 000 a 700 000 (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). A prevalência da doença tem declinado e a meta de eliminação estabelecida de um caso a cada 10000 habitantes foi alcançada em vários países (World Health Committee - WHO, 1991). No ano de 2005, o Brasil e outros países como a República do Congo, Moçambique, Madagascar, Nepal, Tanzânia e Índia não haviam alcançado a meta estipulada (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS, 2006).

Apesar de todo o empenho para sua eliminação, o Brasil continua sendo o segundo país em número de casos no mundo, precedido apenas pela Índia. Além de ser o primeiro nas Américas em número de casos, é responsável por 80% dos casos no continente, com uma taxa de prevalência de 4,2 casos/ 10 000 habitantes (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004). A região do Brasil mais afetada pela hanseníase é o Nordeste do país, sendo o Estado do Ceará considerado uma região de alta endemicidade (CAMPOS, 2005).

No ano de 2003, o Estado do Ceará apresentou um coeficiente de detecção da hanseníase de 3,53 casos novos/10000 habitantes, situando o Ceará como o quarto em números de casos no Nordeste, precedido pelos Estados do Maranhão, Piauí e Sergipe (MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS, 2005). Em 2004, foram notificados 850 novos casos da

doença em uma população estimada de 7.976.914 habitantes no Ceará, com uma taxa de detecção de 3,35 casos por 10000/habitantes e no ano de 2006, observou-se uma taxa de detecção de 2,8 (DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS – DATASUS, 2004, 2007). Em 2007, o Ceará ocupou o 9º lugar em coeficiente geral de detecção no Brasil e o 4º no Nordeste, sendo neste mesmo ano, diagnosticados 2513 novos casos, com coeficiente de detecção de 3,0/10000 habitantes no Ceará (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ, 2008).

Os fatores de riscos mais conhecidos para a aquisição desta patologia são o contato domiciliar (principalmente quando em contato com pacientes com a forma multibacilar da hanseníase), idade, poucas informações e falta de saneamento básico. A possibilidade de transmissão da hanseníase aumenta de cinco a dez vezes em contactantes familiares de pacientes com hanseníase, principalmente daqueles com a forma virchowiana da doença. Estima-se que das pessoas expostas ao bacilo, cerca de 3 a 5% terminam contraindo a doença (FINE et al, 1997 *apud* KERR-PONTES, 2006.)

Embora a hanseníase hoje se mantenha nos estratos da população menos favorecidas, não se sabe ao certo o peso de variáveis como moradia, estado nutricional, infecções concomitantes e infecções prévias por outras micobactérias na susceptibilidade à doença. O papel de fatores genéticos tem sido avaliado há muito tempo, uma vez que existe uma propensão ao seu estabelecimento entre indivíduos com antecedentes genéticos comuns (ARAÚJO, 2003).

### **1.3 Apresentação clínica da hanseníase**

O aparecimento da doença é geralmente gradual, aparecendo os primeiros sinais e sintomas de dois a 10 anos após a infecção, sendo que as manifestações clínicas podem ser cutâneas, neurais e/ou sistêmicas. Segundo a classificação de Ridley e Jopling (ARAÚJO, 2003), a hanseníase pode ser dividida em dois pólos. O pólo tuberculóide (MHT) é a forma de alta resistência à infecção pelo *M. leprae*, na qual as reações estão relacionadas com exacerbação da resposta imunológica celular, levando à formação de granuloma bem definido, o que limitaria as lesões e resultaria em destruição completa ou de grande parte dos bacilos. Observa-se na forma tuberculóide que o número de lesões geralmente é pequeno e de distribuição irregular, com alteração na sensibilidade térmica, dolorosa e, nas lesões mais

antigas, também a tátil, perda de pêlos e ausência ou diminuição da sudorese (TALLARI; NEVES, 1997).

A forma virchowiana (MHV) caracteriza-se pela deficiência da resposta imune celular, com grande multiplicação dos bacilos e disseminação da infecção para outros órgãos, além da pele. Esta forma adquire uma importância epidemiológica, pois os bacilos estão maciçamente presentes nas lesões cutâneas, na proporção média de  $10^{10}$  bacilos/g tecido, o que propicia a transmissão da doença através do contato físico para outros indivíduos (FOSS, 1997). As bordas desse tipo de lesão são imprecisas e, durante a evolução da doença, formam-se pápulas, nódulos, tubérculos e infiltrações em placa (TALHARI; NEVES, 1997).

As orelhas podem tornar-se infiltradas, as sobrancelhas podem cair (madarose) e alguns pacientes apresentam uma mudança nas suas fisionomias, a chamada “face leonina”, na qual o paciente apresenta uma infiltração intensa na face, alterando os sulcos naturais do rosto. Mãos e pés podem também se encontrarem infiltrados, ocorrendo “mãos suculentas ou inchadas” com pele brilhosa, ressecada e as regiões palmares e plantares tornam-se arroxeadas e cianóticas. Na MHV, é freqüente o comprometimento das mucosas nasais que, sem tratamento, pode levar à destruição do septo nasal (TALLARI; NEVES, 1997).

Entre os dois pólos há formas que ora se aproximam do pólo virchowiano, ora do pólo tuberculóide, chamadas dimorfas. De ordem decrescente de intensidade de resposta celular para a humoral, são elas, a forma dimorfa-tuberculóide, dimorfa-dimorfa e dimorfa-virchowiana. A forma dimorfa-tuberculóide (MHDT) apresenta maior número de lesões que a MHT, variando de 5 a 25 mm, tendendo à simetria, sendo pouco definidas, com granulomas e alguns bacilos nos nervos, e acometimento de troncos nervosos e baciloscopia de linfa geralmente negativa (WHO, 1998).

A forma dimorfa-dimorfa (MHDD) apresenta maior número de lesões que a MHT, poucos granulomas, alguns bacilos nas lesões e nos nervos, sendo que suas lesões caracterizam-se pelas bordas externas pouco definidas e região central com aparência de “queijo suíço”, observando-se infiltrações semelhantes as das encontradas na MHV, e baciloscopia de linfa geralmente positiva. Por fim a, a forma dimorfa-virchowiana (MHDV) apresenta lesões de formas variadas como placas, infiltrações, nódulos e bordas externas mal definidas, sem granulomas, com alguns bacilos nas lesões e nos nervos. Comparando-se à forma virchowiana da hanseníase, na MHDV as lesões são menos simétricas com

espessamento de troncos nervosos, com baciloscopia de linfa positiva (TALLARI; NEVES, 1997; WALKER., 1998).

De acordo com a OMS, a definição de um caso de hanseníase é “um paciente que apresenta uma ou mais das seguintes características e que requer quimioterapia, ou seja, lesão ou lesões de pele (manchas, máculas, pápulas) com alteração da sensibilidade, acometimento de nervo(s) com espessamento neural e/ou resultado positivo da baciloscopia (GUIA PARA CONTROLE DA HANSENÍASE - MS, 2002). A classificação da hanseníase é baseada na extensão da infecção, isto é, quando as lesões da pele são pré-foveolares (eritematopigmentares de tonalidade ferruginosa ou pardacenta) e em números acima de cinco com bacterioscopia positiva (com bacilos isolados e/ou globias – bacilos ligados por uma substância chamada gléia), a doença é considerada multibacilar (MB) para fins terapêuticos (MS, 2002; WALKER.,1998). Quando ocorrem menos de cinco lesões hipocrômicas na pele sem induração, eritema ou neurite, apresentando alterações de sensibilidade com áreas hipoestésicas ou de anestesia e baciloscopia negativa nas mesmas, com ou sem diminuição da sudorese e rarefação de pêlos, a doença é classificada como paucibacilar (PB) para fins terapêuticos (MS, 2002).

As formas reacionais ocorrem em 30 a 50% dos pacientes não tratados, em tratamento ou já tratados, sendo causas freqüentes de atendimentos de emergência em hospitais, devido à injúria causada nos nervos. Sabe-se que o *M. leprae* afeta os nervos periféricos, levando rapidamente à perda de sensibilidade, deformidades e paralisia. A reação do tipo I, também denominada de reação reversa, ocorre em pacientes com as formas dimórficas da hanseníase e leva à formação de lesões com indurações, edema e eritemas, seguida de neurite com neuropatia motor e sensorial e até ulcerações. Nesse tipo de reação, há um aumento da resposta imune celular durante semanas, requerindo altas doses de corticosteróides para melhora do quadro de neurite. Nos pacientes multibacilares (MHV e MHBV) ocorrem as reações do tipo II ou eritema nodoso hansênico, reação que dura em torno de 2 semanas, caracterizada pelo aparecimento súbito de nódulos inflamatórios que podem se desenvolver na face e extremidades, freqüentemente dolorosos ao toque. Podem ocorrer também pápulas, máculas e placas e manifestações extra-cutâneas como artralguas, até quadros de artrites, linfadenopatias, febre, hepatoesplenomegalia e comprometimento renal, além de envolvimento ósseo. Esse tipo de reação responde bem à talidomida, mas como se

trata de uma droga teratogênica, os médicos recomendam inicialmente o uso de corticosteróide (TADESSE et al., 2006).

#### **1.4 Agente etiológico da Hanseníase**

*M. leprae* é considerado um bacilo álcool ácido resistente, da ordem dos Actinomicetos, família das *Mycobacteriaceae* (REZWAN et al., 2006). Possui forma de um bastonete ligeiramente encurvado, de aproximadamente 4 a 7 µm de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de largura, podendo ser visualizado de forma isolada, em grupos ou em forma característica de arranjos conhecidos como globias (bacilos unidos por uma substância denominada de gléia) (WALKER, 1998).

*M. leprae* é imóvel, cora-se pela coloração álcool ácida de Ziehl Nielsen, não é cultivável, divide-se por divisão binária, com tempo de duplicação lenta, em torno de 11 a 13 dias. Apesar de não crescer em meios artificiais, a micobactéria pode ser mantida em culturas axênicas, mantendo-se em estado metabólico estável por poucas semanas; desta forma, seu crescimento tem sido restrito a animais, como o tatu. Este modelo animal tem servido de fonte para estudos genéticos, metabólicos e antigênicos acerca de *M. leprae* (KRAHENBUHL; ADAMS, 2000).

A temperatura ótima para a reprodução da micobactéria é de cerca de 27°C a 33°C, o que explicaria sua predileção pelas áreas do corpo mais frias, tais como a pele, os nervos periféricos e as mucosas da via aérea. Trata-se de um parasita intracelular obrigatório que infecta células de Schwann (presentes no sistema nervoso periférico), células endoteliais, macrófagos e células epiteliais (WALKER, 1998; VISSA et al., 2001; GOULART et al., 2002) e, apesar de possuir um elevado poder infectante, apresenta baixa patogenicidade (HASTINGS., 1994).

O genoma do *M. leprae* já foi seqüenciado e está disponível para comparação com outras micobactérias (BROSCH et al., 2004). Quando se compara o genoma de *M. leprae* com *M. tuberculosis*, o primeiro parece ter sofrido uma evolução reduativa, com altos níveis de inatividade ou pseudogenes e com apenas 50% dos seus genes funcionais (COLE et al., 2001).

Quanto aos componentes estruturais do *M. leprae*, sabe-se que sua membrana celular é composta de fosfolipídios e de proteínas. Estudos de fracionamento bioquímico

identificaram dois polipeptídeos, o MMP-I (35 kD) e o MMP-II (22kD), com massas moleculares determinadas por eletroforese, com uma sequência de 14 aminoácidos já estabelecida. Foi observado que MMP-II é capaz de estimular células dendríticas humanas a secretarem IL-12 p70 e de induzir aumento da expressão de MHC classe I e MHC classe II, e moléculas CD86 e CD83; além disso, pode induzir células T de pacientes PB e MB a secretarem tanto IFN- $\gamma$  como IL-5 e macrófagos a produzirem TNF- $\alpha$  e IL-10 (MAEDA et al., 2005). Além dessas proteínas, estão presentes na membrana também citocromos, sistemas de transportes, fosfolipídios (MARQUES et al., 1998).

Em pacientes Mitsuda-negativos, foi verificado que há geração de lisossomas ricos em enzimas que degradam parcialmente as micobactérias, no entanto, fosfolípidos não processados permanecem depositados no citoplasma, levando a uma deficiência funcional nas fosfolipases dos lisossomas. A função das enzimas é restituída com o tratamento com a dapsona e clofazimina (atividade de fosfolipase A2) (ABULAFIA; VIGNALE, 2001).

A parede celular das micobactérias já foi bastante estudada, usando como ferramenta a genética e bioquímica de cepas cultiváveis como o *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. smegmatis* e *M. bovis*. Abordagens semelhantes foram realizadas com relação ao *M. leprae*, no entanto sua composição assemelha-se às demais micobactérias. A parede celular do *M. leprae* é composta de peptidoglicanos, de estrutura idêntica aos de bactérias Gram positivas, ligada a uma camada de arabinogalactana através de pontes dissacarídicas. Ácidos micólicos e ácidos micocerosídicos estão ligados com a arabinogalactana e a parede mais externa é composta de glicolipídios sulfatados conhecidos como sulfátides. A camada de peptidoglicanos e arabinolactana está presente em todas espécies, no entanto, a lipoarabinomanana, ácidos micólicos, ácidos micocerosídeos e outras macromoléculas ligadas variam entre as espécies (WALKER et al., 1998).

Os ácidos micólicos são ácidos graxos complexos,  $\beta$ -hidroxilados, que ocorrem como ésteres. O complexo glicopeptídeo ácido micólico-arabinogalactana forma o esqueleto da parede celular micobacteriana. As cadeias de carbono dos ácidos micólicos intercalam-se com lipídios e glicolipídios presentes na parede, sendo que estes contribuem com 60% do peso seco da parede celular das micobactérias (KONEMAN et al., 2001). O lipídio dominante da parede celular é o glicolipídio fenólico 1(PGL-1). A parte lipídica de PGL é composta de fenol-glicol esterificado por cadeias longas de ácidos graxos, unido por uma porção trissacarídica, que é espécie-específica e consiste de açúcar O-metilados.



O PGL-1 contém uma unidade trissacarídica que não é encontrada em outras bactérias. Ele compõe 2% da massa bacteriana, sugerindo que as cadeias de açúcar podem ter propriedades únicas para o *M. leprae*. Sabe-se hoje que o PGL-1 liga-se à laminina-2, o que facilita sua interação com a lâmina basal das células de Schwann, resultando na invasão das mesmas. Isto poderia explicar o neurotropismo da bactéria (NG et al., 2000).

A célula de Schwann faz parte de um complexo célula-axônio ou de uma unidade que pode ou não estar mielinizada envolta por uma camada da lâmina basal. RAMBUKKANA et al. (1997) postularam que há uma interação específica do bacilo com a lâmina basal do complexo célula-axônio, como primeiro passo para a invasão da célula de Schwann (Figura 1). Esses pesquisadores demonstraram que a laminina-2 é o alvo inicial do bacilo na busca pelo nicho da célula. As lamininas existem em pelo menos 11 isoformas, cada uma com restrição quanto à distribuição tecidual, na lâmina basal da célula de Schwann, a laminina-2 está expressa em sua superfície mais externa (SHIMOJI et al., 1999).

A laminina-2 é composta de cadeias  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  e  $\gamma 1$  e seu domínio globular (DG) é a subunidade específica com a qual o *M. leprae* interage (RAMBUKKANA et al., 1997; SHIMOJI et al., 1999). A infecção parece ocorrer mais especificamente através da interação da laminina com um receptor específico da unidade célula de Schwann-axônio, denominado  $\alpha$ -DG, no entanto, outros receptores podem estar envolvidos (RAMBUKKANA et al., 1998).

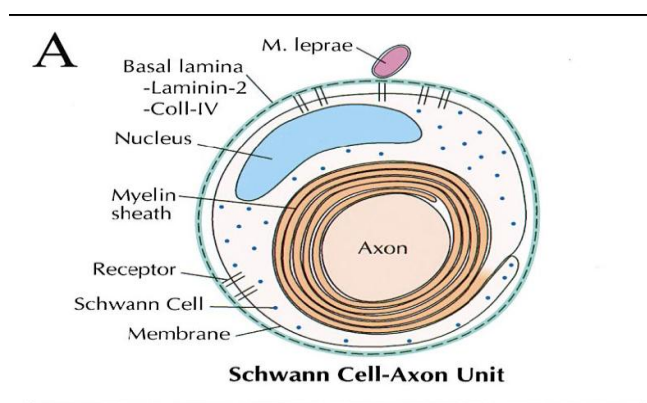


Figura 1: Interação do *M. leprae* com a lâmina basal da unidade célula de Schwann-axônio. Fonte: Ng et al., 2000.

Ng et al. (2000), em estudo de co-culturas de células de Schwann- neurônio com várias concentrações de PGL-1 seguido de um teste de reatividade com anti-PGL-1 marcado com fluorocromo, demonstraram a presença de PGL-1 no local de interação. Os achados ainda indicaram que a ligação ocorria através do domínio G da laminina  $\alpha 2$ , com afinidade

maior observada entre os módulos  $\alpha 2$  LG1,  $\alpha 2$  LG3,  $\alpha 2$  LG5 e a porção trissacarídica do PGL-1. Dois possíveis desfechos essenciais para a desmielinização em consequência da infecção pelo *Mycobacterium leprae* podem ocorrer. Primeiramente, as células de Schwann não mielinizadas são mais suscetíveis à invasão do *M.leprae*. O segundo efeito reside no fato de que o microorganismo pode desmielinizar as células de Schwann mielinizadas, causando o dano axonal, o que poderia em parte explicar a progressão da doença (RAMBUKKANA, 2004).

### **1.5 Diagnóstico clínico e laboratorial da hanseníase**

Admite-se que as vias aéreas superiores constituem a principal porta de entrada do bacilo, no entanto, o mecanismo exato de transmissão não está bem elucidado. A pele erodida, eventualmente, pode ser porta de entrada para o microorganismo. As secreções orgânicas como leite, esperma, suor, e fluido vaginal, podem eliminar os bacilos, mas não possuem importância na transmissão da infecção. Sua disseminação para outros tecidos pode ocorrer nas formas mais graves da doença, naquelas em que o agente infectante não encontra resistência contra a sua multiplicação. Nesses casos, os linfonodos, os olhos, os testículos e o fígado podem abrigar grande quantidade do bacilo (ARAÚJO, 2003).

Observa-se com frequência a presença de células endoteliais infectadas com *M. leprae* (MCDOUGALL, 1995). Scollard et al (2006) verificaram, através de técnicas histopatológicas, que as células endoteliais dos vasos sanguíneos epineural e perineural teriam a função de reservatório para a replicação do microorganismo, após a infecção das células de Schwann do tecido adjacente.

Os aspectos clínicos são de extrema importância para o diagnóstico da hanseníase. Os sinais e sintomas mais comuns são manchas, placas, infiltrações, tubérculos e nódulos encontrados na pele com alteração da sensibilidade, localizadas em qualquer parte do corpo, que podem acometer até as mucosas nasal e oral do paciente. As lesões dos nervos periféricos geralmente são dolorosas e encontram-se espessadas, havendo perda de sensibilidade nas áreas inervadas pelos mesmos, em especial, os membros superiores e inferiores, como também as pálpebras. Se não tratado, o comprometimento neural pode levar a deformidades e incapacidades (MS, 2002).

O Ministério da Saúde considera o teste de sensibilidade limitado para ser realizado em crianças muito novas, adultos ansiosos, manipuladores ou naqueles incapazes de compreender as instruções dadas antes de sua execução. Em caso de dúvida, deve-se lançar mão de provas complementares que são o teste da histamina e da pilocarpina, de fácil realização. A palpação de nervos e sua avaliação funcional têm como objetivo pesquisar possíveis alterações neurológicas provocadas pela hanseníase. Deve-se realizar a palpação dos troncos nervosos acessíveis e a avaliação funcional (sensitiva, motora e autonômica) daqueles mais comprometidos pela doença (ARAÚJO, 2003).

A baciloscopia é o exame complementar mais útil no diagnóstico, sendo de fácil execução e baixo custo. Raspado de tecido dérmico dos lóbulos das orelhas direita e esquerda, cotovelos direito e esquerdo e em lesão suspeita são coletados e examinados através da coloração de Ziehl-Nielsen, onde os resultados são expressos sob a forma de índice baciloscópico (IB), em uma escala que varia de 0 a 6 cruzes (Figura 2). A baciloscopia é geralmente negativa na forma tuberculóide, positiva na forma virchowiana, e com resultados variáveis nas formas dimórficas (ARAÚJO, 2003).

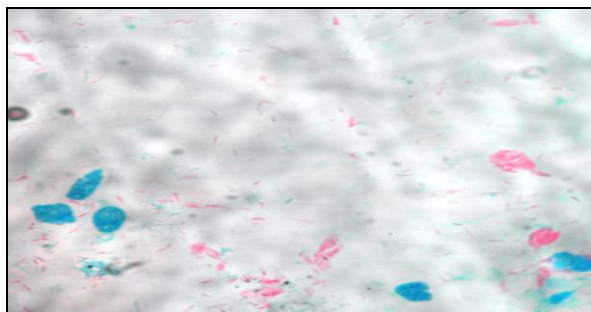


Figura 2: Baciloscopia com IB 6 cruzes de amostra de linfa de paciente com a forma clínica virchowiana da hanseníase (#87). Fonte: Rodrigues, 2008. (Paciente #77)

A avaliação da função motora de grupos musculares específicos deve ser feita principalmente nos pacientes em tratamento, com a finalidade de detecção precoce de incapacidades. Sequelas bem definidas podem ser encontradas já no período do diagnóstico, tais como, paralisia facial do tipo periférico unilateral ou bilateral, ou paralisia do ramo orbicular do nervo zigomático, provocando o lagoftalmo, epífora e exposição da córnea, mão em garra (garra do quarto e quinto quirodátiles ou garra completa), mão caída, pé caído, garra de artelhos que pode ser acompanhada do mal perfurante plantar (ARAÚJO, 2003).

Testes imunológicos foram desenvolvidos para detectar anticorpos dos isotipos IgM e IgG contra o antígeno glicolípide fenólico-1 (PGL-1). Os títulos de anticorpos parecem estar correlacionados com a forma clínica e a atividade da doença. Níveis aumentados de anti PGL-1 têm sido descritos na forma virchowiana da hanseníase e tendem a decrescer com o tratamento específico. Por outro lado, observa-se ausência de anticorpos na forma tuberculóide da doença. A avaliação dos títulos de anti-PGL-1 tem sido utilizada em estudos epidemiológicos e não para fins diagnósticos, uma vez que a sensibilidade e especificidade diagnósticas não são o suficientemente satisfatórias. Há estudos inconclusivos que procuram estabelecer uma relação entre a positividade de anti-PGL-1 e o risco de adoecer ou de identificar infecção subclínica (BUHRER et al., 1998; DOUGLAS et al., 2004).

Nos últimos 15 anos, houve tentativas de avanços laboratoriais no diagnóstico da hanseníase, quando foram desenvolvidos métodos de extração, amplificação e identificação do *M. leprae*, empregando-se técnicas moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR). Esta técnica tem sido estudada em centros de pesquisa, mas não é realizada rotineiramente em laboratório, por ser um teste de custo relativamente alto e de não diferenciar estado de infecção e estado de doença (SCOLLARD et al., 2006).

O teste da lepromina ou de Mitsuda não é usado para o diagnóstico da hanseníase, tampouco serve para mensurar exposição ao *M. leprae*. Trata-se de um teste de avaliação de imunidade celular, onde uma suspensão de bacilos mortos é injetada via intradérmica no indivíduo. Quatro semanas após injeção, mede-se a induração (em milímetros), podendo assim avaliar a capacidade de resposta imune celular do indivíduo contra os antígenos presentes. O teste não é muito específico para a hanseníase, já que pessoas que nunca entraram em contato com o bacilo podem apresentar resposta positiva ao teste (SCOLLARD et al., 2006).

O teste de Mitsuda não é aprovado pelo “*Food and Drug Administration*” (FDA) e não é recomendado nos Estados Unidos ou Brasil com finalidade diagnóstica. Os resultados negativos do teste podem estar associados com a forma virchowiana da hanseníase, uma vez que o paciente apresenta resposta imune celular deprimida. O teste é geralmente considerado positivo em indivíduos com a forma paucibacilar da doença e envolve uma resposta granulomatosa, incluindo células apresentadoras de antígenos e células T CD4+ (SCOLLARD et al., 2006).

## 1.6 Tratamento da hanseníase

Os fármacos disponíveis para tratamento da hanseníase são divididas em 3 grupos, ou seja, primários, secundários e de investigação. Os fármacos primários incluem dapsona, clofazimina e rifampicina. Os fármacos secundários consistem em etionamida/protionamida, tiacetazona, tiambutazona, sulfonamidas e alguns aminoglicosídeos. Já os fármacos de investigação englobam as fluoroquinolonas, macrolídeos e claritromicina (HASTINGS,1994). Além disso, o tratamento da hanseníase compreende quimioterapia específica, supressão dos surtos reacionais, prevenção de incapacidades físicas, reabilitação física e psicossocial (WHO, 1997).

A dapsona, no ano de 1940, foi a primeira droga a ter um efeito positivo contra a hanseníase, tendo sido introduzida no mercado em 1950 como monoterapia para pacientes multibacilares e paucibacilares. No entanto, foi observado desenvolvimento de resistência ao medicamento em parte dos pacientes (SCOLLARD et al., 2006).

Para superar a resistência à dapsona, a OMS recomendou a multidrogaterapia contra a hanseníase, no ano de 1981, administrando ao paciente uma dose diária de dapsona e clofazimina associada com uma dose mensal de rifampicina e clofazimina durante dois anos ou até as lesões da pele sumirem. Desde então, as recomendações foram sendo alteradas, de forma que foram estabelecidas duas categorias baseadas na apresentação da doença, isto é, paucibacilar e multibacilar. A classificação como paucibacilar era considerado, quando havia um número abaixo de 5 lesões e baciloscopia negativa. A classificação como multibacilar era considerada, quando havia acima de 5 lesões com baciloscopia positiva, ou dois ou mais troncos acometidos (SCOLLARD et al., 2003).

A ofloxacina (bactericida com meia vida de 6 horas e bastante efetiva contra a hanseníase, age inibindo a síntese de DNA), claritromicina (derivado semi-sintético do grupo dos macrolídeos, inibe a síntese protéica) e minociclina (derivado semi-sintético da tetraciclina, inibe a síntese de proteínas) podem ser utilizados em ocasiões em que ocorra necessidade de substituição de fármaco do tratamento clássico, principalmente devido à resistência a algum desses fármacos (RAMU, 1998).

O desenvolvimento de resistência aos fármacos foi estudado com o *M. tuberculosis*, já que o cultivo do *M. leprae* ainda não é possível. Os estudos mostraram que as

mutações cromossômicas resultadas de erros na replicação do DNA são as responsáveis por essas resistências. Um número considerável da população hanseníaca apresenta alterações em consequência de tratamentos inadequados. Fármacos como a levamisole e o zinco podem ser utilizados como adjuvantes da dapsona (HONORE et al., 2001).

## **1.7 Resposta imune na hanseníase**

As imunodeficiências primárias, defeitos hereditários e/ou congênitos que levam ao aumento de susceptibilidade a infecções, são os melhores modelos da natureza que revelam a existência de fatores de resistência no hospedeiro às micobactérias, uma vez que foram descritos poucos casos de infecção por micobactérias decorrente de imunodeficiência primária, tendo sido eles, na maioria das vezes, sido decorrentes de pacientes com imunodeficiência primária combinada grave vacinados com o bacilo de Calmette-Guérin atenuado (BCG) (REICHENBACH et al., 2001).

A interação de células T com APC(s) e *M. leprae* pode resultar em resposta imunológica Th1 ou Th2 OU Th17, dependendo das citocinas e sinais co-estimulatórios que acompanham esse processo (KANG et al., 1992).

A ativação adequada dos macrófagos dos tecidos é de suma importância para a eliminação das micobactérias intra-vesiculares e depende de uma adequada resposta imune mediada por células, ou seja, da presença de citocinas do perfil Th1, entre elas a interleucina 2 (IL-2), que participa da diferenciação de linfócitos TCD8, do próprio linfócito T CD4, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que auxilia na ativação dos macrófagos e induz aumento de expressão de MHC classe I e MHC classe II, fator de necrose tumoral (TNF), que atua como um pirógeno endógeno, é quimiotático para neutrófilos, induz síntese de proteínas de fase aguda, entre outras funções (FOOTE., 1999).

A interleucina 12 (IL-12) é produzida por macrófagos ativados e induz ativação de células *Natural killer* (NK), além de favorecer a diferenciação de linfócitos Th1 (FOOTE, 1999). Por outro lado, a presença de citocinas Th2, tais como, a IL-10 suprime síntese de citocinas Th1 e regula a produção de IL-12, chamado de efeito imunomodulatório que, durante uma infecção, estaria suprimindo a produção de mediadores inflamatórios, favorecendo o perfil Th2 da imunidade (AKDIS, 2001). Muitos microorganismos são capazes de induzir a ativação das células apresentadoras de antígenos (APC), resultando em produção

de citocinas, como a IL-12 e TNF- $\alpha$  e expressão de moléculas co-estimulatórias que juntas promovem a diferenciação de células Th1.

As células dendríticas imaturas, tais como as células de Langerhans, estão presentes nos tecidos, processam os antígenos, talvez sendo umas das primeiras células a interagirem com *M. leprae*, e rapidamente migram para os linfonodos. Nestes locais, perdem sua capacidade de processar os antígenos, sintetizam novas moléculas MHC e expressam moléculas co-estimulatórias B7, adquirindo alta capacidade de estimular células T específicas em repouso (STEINMAN et al., 2003). Isto significa dizer que as células apresentadoras de antígeno (APC) sinalizam para as células T em repouso para estas serem ativadas, o que ocorre através de dois sinais de ativação. O primeiro sinal depende do reconhecimento do antígeno apresentado pelas moléculas MHC II localizadas na superfície das APC pelo receptor de célula T. O segundo sinal depende da interação de moléculas co-estimulatórias nas APC com as células T e o terceiro através de citocinas e mediadores solúveis.

A captura do bacilo por essas células tem como consequência a produção de citocinas e quimiocinas bem como a regulação da inflamação, além de influenciar a resposta imunológica Th1 e Th2 na hanseníase (SANTOS et al., 2001). Análise em amostras de biópsias de pele saudável ou lesionada mostrou que pacientes com a forma virchowiana (MHV) apresentam um número consideravelmente menor de células de Langerhans que pacientes com a forma tuberculóide (MHT) da hanseníase (GIMENEZ et al., 1989).

Tem sido observado que pacientes com a forma virchowiana ou com a forma dimórfica-virchowiana apresentam elevadas concentrações de anticorpos no soro, especificamente o anti-PGL1 (antígeno glicolipídico fenólico-1) específico para *M. leprae*, fenômeno que parece estar associado com a supressão da imunidade celular (FOSS, 1997).

Tem sido sugerido que o PGL-1 pode desempenhar uma ação na patogenicidade da hanseníase, uma vez que apresenta uma função supressora sobre a atividade dos macrófagos. À medida que o bacilo vai produzindo esses antígenos, consegue desviar da cascata oxidativa dos macrófagos, tendo ação também inibitória sobre a produção de TNF (CHAN et al., 1992)

Estudos relacionados com as subclasses de IgG associadas com resposta ao antígeno PGL-1, mostram que a subclasse IgG1 poderia ser empregada como um marcador de gravidade da doença, enquanto a IgG3 poderia estar relacionada com a eficácia do tratamento

(BEURIA et al, 1998). Níveis elevados do antígeno PGL-1 estão associados com a forma multibacilar da hanseníase, o que reflete ativação da resposta imune humoral e alta carga de bacilos. Níveis baixos ou ausentes de PGL podem ser encontrados em pacientes com a forma paucibacilar da doença, e podem ser detectados em 5 a 60% dos pacientes. A sensibilidade diagnóstica do teste é de 80 a 90% nos MB e 30 a 60% nos PB, e sua especificidade diagnóstica de 98% (BARROS; OLIVEIRA, 1999).

Como os mecanismos de defesa ou de disseminação da hanseníase são dependentes da subpopulação de células T em atividade, pode-se inferir que a resistência à infecção está relacionada com a presença de TNF- $\alpha$  e com a liberação de metabólitos reativos intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), elementos fundamentais para a destruição bacilar, no interior dos macrófagos. Por outro lado, os mecanismos de escape do metabolismo oxidativo intra-macrofágico parecem residir na presença dos antígenos PGL1 e LAM (lipoarabinomanana), que possuem função supressora da ativação de macrófagos, proporcionando condições para que o bacilo fique protegido no citoplasma desta célula, multiplicando-se e formando globias (FOSS,1997).

Quanto à citocina TNF- $\alpha$ , ela está presente no soro de doentes com a forma tuberculóide da hanseníase e ausente na forma virchowiana da doença, sendo que seus níveis séricos estão correlacionados com os níveis de TNF- $\alpha$  produzidos por células mononucleares de pacientes com a forma clínica TB, indicando que a destruição do *M. leprae* e a formação de granuloma podem estar associados com a presença desta citocina. Observa-se igualmente que durante o estado reacional, especialmente na reação do tipo eritematoso, comum na forma multibacilar da doença, há aumento da produção de TNF- $\alpha$ , associado com elevação dos níveis de proteína-C-reativa (PCR). Isto poderia sugerir que TNF- $\alpha$ , estaria estimulando a reação inflamatória aguda, medida pelos altos níveis de PCR, o que estaria favorecendo o aparecimento dos sintomas característicos do surto reacional (FOSS, 1993).

As células fagocíticas expressam em sua membrana receptores *Toll-like* (TLR), que se ligam especificamente a padrões moleculares existentes em microorganismos (PAULO et al., 2004). Os receptores TLRs são moléculas homólogas aos descritos em drosófilas, similaridade baseada nas porções citoplasmáticas (designada TLR-IL-1R, ou domínio TIR). Os membros da família TLR são diferencialmente expressos entre as células imunes e parecem responder a diferentes estímulos. Sua expressão na superfície, medida pela ligação de anticorpos monoclonais (mAb), parece ser muito baixa, correspondendo uns poucos



milhares de moléculas por células monocíticas e poucas centenas por células dendríticas imaturas. No entanto, a expressão de receptores TLR é observada numa variedade de outras células, incluindo células endoteliais, adipócitos, miócitos cardíacos, células endoteliais intestinais e macrófagos (AKIRA, 2001).

A família dos TLR(s) compreende pelo menos 10 membros, sendo definidos como receptores que se ligam especificamente a padrões moleculares associados com patógenos (PAMP), como os lipossacarídeos, flagelos bacterianos, paredes de fungos, RNA viral, DNA bacteriano (MCINTURFF et al., 2004). O quadro 1 apresenta alguns PAMPs que interagem com os TLR. Alguns não apresentam função conhecida. Outros, como o TLR-2 interage com *M.leprae*, enquanto que tanto TLR-2, como TLR-4 interagem com *M. tuberculosis*.

Família	Ligante	Microorganismos (exs.)
TLR-1	Triacil lipopeptídeos	
TLR-2	Ácido lipoteicóico, peptidoglicano, lipoarabinomanana, zimosan	<i>M.tuberculosis</i> , <i>M. leprae</i> , <i>Leptospira</i> , <i>S.aureus</i> , <i>B. burgdorferi</i>
TLR-3	Fita dupla RNA	Vírus
TLR-4	Lipopolissacáride	Bactérias Gram negativas, <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i>
TLR-5	Flagelina	Bactérias
TLR-6	Diacil lipopeptídeos	Bactérias Gram positivas, fungos
TLR-7e8	Fita simples RNA	vírus
TLR-9	CpG DNA	Bactérias em atividade
TLR-10	desconhecido	

Forchielli & Walker, Br J Nutr 2005;93:541-548

Quadro 1: Ligação de padrões moleculares associados com patógenos com receptores *Toll like* em humanos.

TLR-2 e TLR-4 foram encontrados presentes constitutivamente em linhagens de células cancerígenas intestinais (CaCO-2, HT-29, T-84), e dessa forma, são os mais estudados. A descoberta das moléculas nessas linhagens celulares tem propiciado o estudo da interação entre bactérias e células epiteliais no desenvolvimento da resposta imune intestinal (WALKER, 2002).

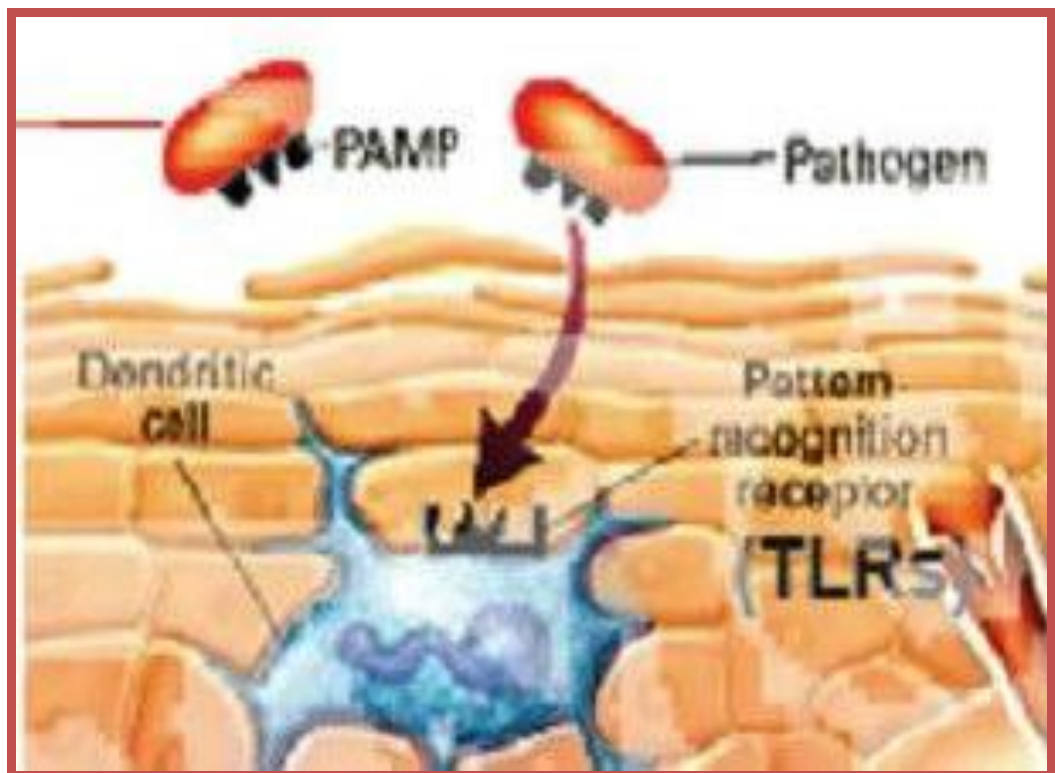


Figura 3: Ligação entre o receptor Toll-like e PAMP. Fonte: CARRILLO-ESPER, 2003.

A estrutura dos TLR é composta por proteínas transmembrânicas com domínio extra-celular rico em leucinas e de um domínio intra-celular (TIR) homólogo ao receptor de IL-1 (BOCHUT et al., 2003). Uma vez estimulado (Figura 3), o domínio intra-celular (TIR) associado à uma serina-treonina quinase (IRAK), associa-se com uma proteína denominada de MyD88 que, por sua vez, ativa uma série de moléculas intermediárias como o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral pelo fator 6 (TRAF 6). Este pode ativar o complexo IKK que leva à fosforilação e conseqüente degradação do I $\kappa$ B, resultando na translocação nuclear do fator NF $\kappa$ B, que ativa, por sua vez, a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (DOYLE et AL., 2002; SUZUKI et al., 2002).

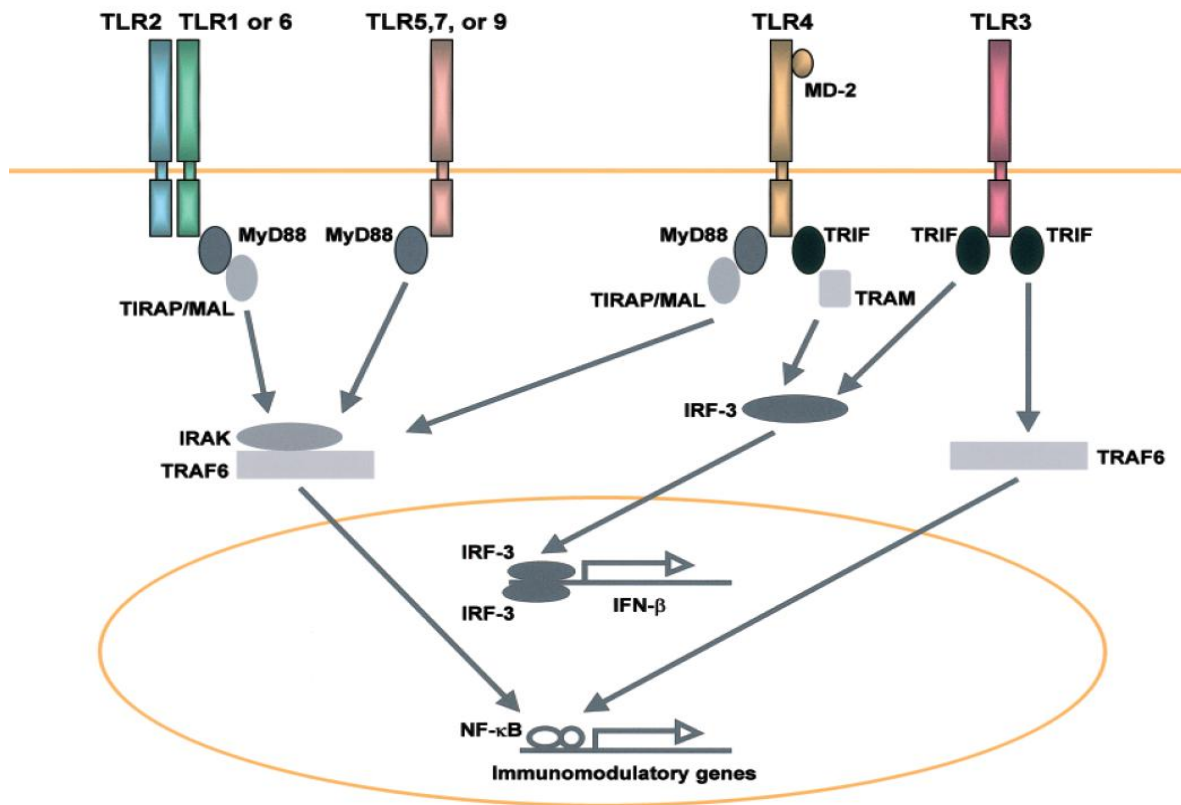


Figura 4: Cascata de ativação da transcrição de citocinas através dos receptores Toll-like. Fonte: MCINTURFF et al., 2005.

Lipoproteínas contendo lipídeos covalentemente ligados a cisteínas com terminal amina (-NH<sub>2</sub>) presentes em uma variedade de bactérias, tais como *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum* e *Mycoplasma fermentans* interagem com TLR-2. Além disso, o TLR2 medeia resposta celular a uma variedade de componentes celulares de outros patógenos, incluindo a parede celular das leveduras, lipoarabinomanana, peptidoglicano de bactérias Gram positivas e glicolipídios de *T.pallidum* (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

O receptor TLR-2 parece ainda apresentar importante função na resposta imune a produtos de micobactérias, incluindo *M.leprae*, *Mycobacterium avium* e *M. tuberculosis* (BOCHUD et al., 2003). Enquanto a resposta imune a *M. leprae* depende basicamente de TLR-2, a resposta a *M. tuberculosis* pode ocorrer pela interação com TLR-2 ou com TLR-4. Quanto ao receptor TLR-4, o mesmo está expresso constitutivamente em macrófagos ativados e em outras células, e parece atuar como molécula de transdução de sinal, quando associado com a molécula CD14, cuja função é de se ligar a lipopolissacárides (LPS), presentes em bactérias Gram negativas. Os complexos de CD14/LPS associam-se com o domínio externo

de TLR-4, enquanto o domínio interno serve como molécula transdutora de sinal de ativação. O receptor TLR-5 parece interagir com flagelina bacteriana e não interfere na resposta imune a *M. leprae* (PARSLOW; BAINTON, 2001).

Sabe-se que os TLR-2 podem ser ativados por lipoproteínas do *M. leprae*, e a capacidade de iniciar a resposta protetora está diretamente relacionada com a secreção de IL-12 e IL-23 e a diferenciação de macrófagos e células dendríticas. Estas últimas apresentam o antígeno e causam a ativação de células T em repouso através da secreção de IL-12. Esse processo pode levar à expansão e diferenciação de células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , que induz os elementos da resposta imune responsáveis pela eliminação do bacilo, controlando assim a evolução da doença. Em alguns estudos realizados com o *M. tuberculosis*, os TLRs têm sido apontados como necessários para produção ótima de IL-12, citocina pró-inflamatória responsável pela indução da imunidade celular (Th1), assim como de TNF- $\alpha$ , citocina envolvida na ativação celular e formação do granuloma, que também está relacionada com a destruição tecidual associada aos surtos reacionais da hanseníase (PREVEDELLO; MIRA, 2007)

## **1.8 Susceptibilidade genética do hospedeiro ao desenvolvimento da hanseníase**

Estudos genéticos têm mostrado que a imunidade ao *M. leprae* é controlada basicamente em dois níveis, primeiro, os determinantes genéticos que influenciam na suscetibilidade, independentemente de sua forma de manifestação clínica da doença, e na segunda, a definição das diferentes formas clínicas da doença no indivíduo infectado (Figura 5) (JACOBSON; KRAHENBUHL, 1999; PREVEDELLO; MIRA, 2007).

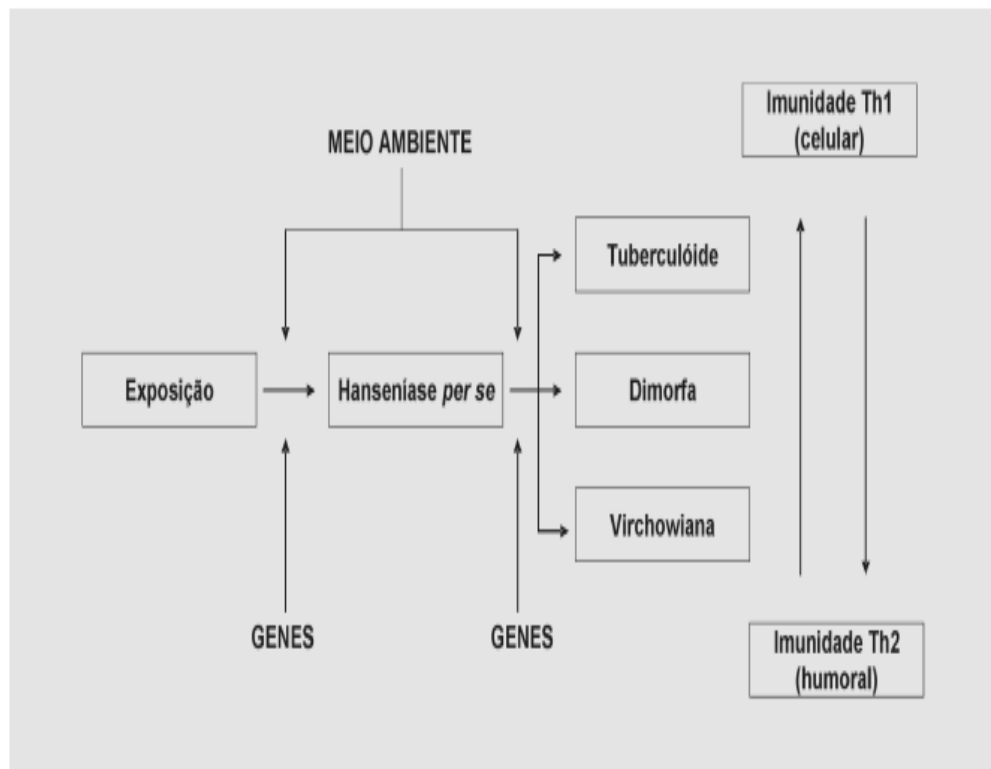


Figura 5: Suscetibilidade genética da hanseníase na etapa de patogênese da doença (hanseníase per se) e na forma clínica manifestada pelo paciente infectado. Fonte: PREVEDELLO; MIRA, 2007.

A investigação de polimorfismos genéticos em hansenianos recebeu, inicialmente, muita atenção, tendo sido analisados cerca de quarenta sistemas polimórficos, na esperança de encontrar associação significativa entre a hanseníase e algum marcador genético. Alguns desses sistemas investigados foram antígenos HLA, alfa-1-antitripsina, beta-2-glicoproteína 1, beta-lipoproteína, Componente C3 do Complemento, ceruloplasmina, adenosina desaminase, glicose-6-fosfato desidrogenase, fosfatase ácida, glioxalase, haptoglobinas, hemoglobina S, pseudocolinesterase, secreção de substâncias ABH, sistemas sanguíneos ABO, Diego, Duffy, Kell, Kidd, Lewis, MNSs, Rh, talassemia beta, transaminase glutâmica pirúvica e transferrinas (BEIGUELMAN, 2002).

Tais sistemas foram estudados em hansenianos sem que houvesse alguma indicação lógica de que a suscetibilidade à hanseníase pudesse depender dos genes polimórficos analisados. Os antígenos HLA, evidentemente, fazem parte das raras exceções, no entanto, eles não podem ser os únicos responsáveis pela susceptibilidade genética para o desenvolvimento da hanseníase (BRENNAN; VISSA, 2001).

Até o momento, a hanseníase foi a única doença infecciosa em que se mostrou associação com mutação nos genes PARK2 (parquina) PACRG (gene co-regulado com parquina). Estes genes podem ser encontrados em células de Schwann e em macrófagos.

Polimorfismos nos genes foram primeiramente encontradas em pacientes com doença de Parkinson autossômica recessiva, e parecem levar a um maior grau de apoptose das células neuronais (SHINKEIGAKU, 2004).

Estudos com vietnamitas (SHINKEIGAKU, 2004), assim como em estudos com brasileiros, foi encontrada forte evidência de ligação entre susceptibilidade à hanseníase e mutação na região cromossômica 6q25-q27. Foram identificados 17 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nessa população, sendo que 15 dos 17 SNPs encontravam-se em um único bloco com 80 kb de extensão, em uma região responsável pela regulação de dois genes PARK2 e PACRG. Sabe-se que esses genes estão envolvidos com a produção de parquininas, que são enzimas responsáveis de encaminhar proteínas ubiquitinadas para o proteassoma onde serão degradadas. Isto justificaria um papel fundamental que exerce o sistema proteassoma-ubiquitinina nas doenças neurológicas. A probabilidade de pessoas, apresentando os alelos de risco, de desenvolver a forma clínica multibacilar ou paucibacilar da hanseníase é igual para ambas (SCHURR et al., (2007).

Outro fator genético que influencia na resistência e sensibilidade ao bacilo de Hansen é a resistência natural associada à proteína 1 macrófagica (NRAMP1). No ser humano, o gene localiza-se na região cromossômica 2q25, e a proteína pode ser encontrada no baço, fígado, pulmões e principalmente nos leucócitos do sangue periférico (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Do ponto de vista funcional, a proteína NRAMP murina parece viabilizar e /ou ajudar na replicação do patógeno dentro dos macrófagos, através do transporte de ferro e de cátions divalentes pela membrana do fagossoma (GRUENHEID, S.; GROS P., 2000).

Um outro gene candidato a estar envolvido com a resposta imune contra micobactérias é o gene do receptor da vitamina D (VDR). A forma ativa da vitamina D é produzida por macrófagos e poderia estar exercendo atividade imunorregulatória sobre a produção de citocinas. Verificou-se que existe uma associação entre variantes do gene VDR e as diferentes formas clínicas da hanseníase (PREVEDELLO; MIRA, 2007).

Os sistemas ABO e HLA têm certos aspectos em comum, mas são diferentes pelo menos em um aspecto importante, ou seja, o sistema HLA é mais complexo e polimórfico. O ABO possui um locus, enquanto o HLA apresenta pelo menos seis loci; além desse aspecto, o ABO possui três alelos e o HLA mais de cem. Os genótipos possíveis que resultam dessa combinação são milhões do sistema HLA enquanto do sistema ABO, apenas seis (HASTINGS,1994).

As estruturas dos antígenos HLA e do receptor da célula T (TCR) são fundamentais para a resposta imune adaptativa (WARD, 1997). Desde 1848, pesquisadores procuram estabelecer fatores genéticos que possam explicar a susceptibilidade familiar à hanseníase. Trabalhos realizados na Índia revelam que os antígenos HLA-DR2 podem estar relacionados com susceptibilidade à hanseníase, sendo que nenhuma evidência convincente relacionou a resposta virchowiana aos loci HLA-DR (SCOLLARD et al., 2006). Shankarkumar et al (2002) evidenciaram subtipos moleculares do HLA-A, -B e -C associados com a hanseníase. Os subtipos alelos A\* 0206, A\* 1102, B\* 4016, Cw\* 0407 e Cw\* 0703 foram associados com a hanseníase, quando comparados à população controle. Os haplótipos encontrados que foram associados à forma virchowiana da hanseníase foram A\* 1102, B\* 4006, Cw\* 1502. O HLA A\* 0206 foi significativamente relacionado com a forma tuberculóide da hanseníase.

Por fim, sabe-se que a interleucina 12 produzida por macrófagos é essencial à diferenciação de células Th1, uma vez que estas serão as grandes responsáveis pela produção de citocinas como IFN $\gamma$  e IL-2, essenciais na resposta imune celular na hanseníase. Os receptores TLR-2 parecem mediar a produção de IL-12 através da ligação a componentes células da micobactéria (KANG et al., 2002). Uma mutação no domínio intra-celular do TLR-2, em uma região de aminoácidos altamente conservada 671-692, com substituição da base nucleotídica citosina (C) por timina (T) na posição 2029 e conseqüente mudança do aminoácido Arg<sub>677</sub> Trp, resultando em modificação de um resíduo de arginina para um resíduo de triptofano em pacientes que apresentam a forma virchowiana da hanseníase (KANG; CHAE, 2001). Segundo autores, 10 entre 45 pacientes com a forma virchowiana apresentaram polimorfismo, enquanto que tal alteração não foi verificada entre pacientes com a forma tuberculóide ou entre os controles.

O estudo do polimorfismo no TLR-2 pode vir a auxiliar na investigação da patogênese da hanseníase como também de outras patologias, como, por exemplo o *M.tuberculosis* que, além de utilizar este receptor, ativa resposta imune através de TLR-4 (KANG; CHAE, 2001).

A descoberta do polimorfismo mutação no TLR2 Arg<sub>677</sub> Trp pode implicar no entendimento da patogênese, mostrando que um polimorfismo na mesma anula a capacidade do TLR-2 de mediar uma resposta contra o *M. leprae*. Em estudo realizado por Kang et al (2004), em uma população de 15 pacientes com hanseníase (8 com a forma virchowiana, 7

com a forma tuberculóide), 5 pacientes com a forma virchowiana da hanseníase apresentaram mutação no domínio intracelular na posição Arg677Trp do TLR-2. Não foi observada mutação nos pacientes MHT. No mesmo trabalho, avaliou-se a função desses receptores polimórficos, relacionando-se com seu perfil de citocinas encontradas nessas condições, a partir de experimentos com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas com LPS. Verificou-se que a produção de IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estava significativamente menor nas células mononucleares mutantes do que nas PBMC controles.

Um polimorfismo no receptor Toll-like tipo 2 significaria que ele poderia ser incapaz de mediar a ativação do NF $\kappa$ B, comprometendo a resposta imunológica por essa via e desviando a resposta Th1 para Th2, esta associada com a forma disseminada da hanseníase (KANG; CHAE, 2001).

## **1.9 O papel da vacina BCG na prevenção de hanseníase**

A vacinação por bacilo Calmette Guérin (BCG) contra doenças causadas por micobactérias é bastante controversa. O uso da vacina para prevenção da hanseníase começou em 1939 (SHEPARD, 1965), tendo se verificado uma taxa de proteção da mesma que variava de de 20 a 90% (ZOPDEY et al., 1999), dependendo de fatores como dose, características genéticas, fisiológicas da população alvo (ZOPDEY, 2008). No Brasil, a vacina é recomendada durante a infância até 4 anos de idade para prevenção de neurotuberculose e tuberculose miliar e em casos de contactantes de pacientes com tuberculose e hanseníase (RODRIGUES et al., 2005).

Segundo Hastings (1994) estudo realizado na Uganda mostrou que de 8065 crianças não vacinadas com BCG, surgiram 201 casos novos de hanseníase em um período de 8 anos; por outro lado, de 8085 crianças vacinadas no mesmo período de 8 anos, foram observados apenas 41 novos casos, fazendo com que a vacina demonstrasse uma taxa de proteção de 80% (HASTINGS, 1994).

Sabe-se que a vacina BCG é uma excelente indutora da produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que o *M. leprae*. Em estudo realizado por Oliveira et al em 2001, empregou-se um modelo *in vitro* para a investigação da capacidade da BCG de estimular a produção de TNF- $\alpha$  nas células da linha mielomonocíticas humana (THP-1) A BCG induziu um pico de secreção



de TNF- $\alpha$  após 2h, no entanto, o mesmo não ocorreu com as células infectadas por *M.leprae*. Quando usados conjuntamente, *M. leprae* e BCG, como estímulo para essas células THP-1, observou-se que o primeiro inibiu a produção de TNF- $\alpha$ , sugerindo que *M. leprae* afeta a capacidade das células THP-1 de responder a BCG (OLIVEIRA et al., 2001)

## **2 PERGUNTA DE PARTIDA**

Será que existe uma real associação entre polimorfismo C2029T do gene *Toll like-2* com as formas clínicas da hanseníase?

### **3 HIPÓTESE**

Se há evidências de polimorfismo Arg<sub>677</sub>Trp dos receptores *Toll like* tipo 2 em pacientes coreanos e indianos com a forma virchowiana da hanseníase, dessa forma, o mesmo poderia estar ocorrendo em nossa população.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Caracterizar os pacientes com hanseníase de acordo com os seus resultados sorológicos, e analisar possíveis polimorfismos presentes no receptor *Toll-like* tipo 2 e avaliar os níveis séricos de anti-PGL nos pacientes.

### **4.2 Objetivos Específicos**

1) Descrever o perfil epidemiológico dos pacientes com as formas multibacilar e paucibacilar da hanseníase;

2) Detectar a frequência do polimorfismo nos receptores *Toll-like* tipo 2 nas diferentes formas clínicas da hanseníase.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Casuística:**

Participaram do estudo 87 pacientes com hanseníase, diagnosticados por médicos dermatologistas do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio e dos Postos de Saúde da Prefeitura de Maracanaú, locais estes escolhidos por apresentarem alto número de pacientes atendidos. Os critérios de diagnóstico basearam-se no exame clínico, baciloscopia de linfa e análise baciloscópica em biópsia de lesões. A forma clínica da doença foi classificada, conforme critérios da OMS (MS, 2002), em paucibacilar ou multibacilar, e conforme classificação de Ridley e Jopling (HASTINGS, 1994), em Virchowiana (MHV), Boderline-Virchowiana (MHBV), Boderline -Tuberculóide (MHBT) ou Tuberculóide (MHT), as formas indeterminadas e dimorfa-dimorfa não fizeram parte desse estudo, por poucos pacientes apresentarem essas formas clínicas, portanto com número de casos estatisticamente insignificante para a pesquisa. O grupo com a forma paucibacilar foi constituído por 39 pacientes (21 com a forma tuberculóide e 18 com a forma dimorfa-tuberculóide. O grupo com a forma multibacilar foi constituído de 48 pacientes, (30 com a forma Virchowiana e 18 com a forma dimorfa-virchowiana da hanseníase). Os pacientes foram previamente esclarecidos quanto ao projeto, antes da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aceitando participar do estudo (anexo 2). O grupo controle não foi necessário uma vez que o objeto de interesse do estudo era o paciente.

### **5.2 Critérios de inclusão**

Pacientes com diagnóstico confirmado de hanseníase não tratada ou em vigência de tratamento, vacinados ou não com BCG (considerado vacinado quando com cicatriz).

### **5.3 Critérios de exclusão**

Pacientes com a forma indeterminada da doença, sem diagnóstico confirmado da doença, ou aqueles que já haviam completado o tratamento.

## 5.4 Amostras de sangue

Foram coletadas amostras de sangue por punção venosa do sangue periférico em tubos com ou sem anti-coagulante (volume de 5 ml por tubo). Após realização da coleta do material e aplicação de um questionário (anexo 3), as amostras eram levadas ao laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFC para avaliação dos níveis séricos de IgG anti-PGL1. As amostras de sangue coletadas sem anti-coagulante permaneciam durante 20 minutos em temperatura ambiente para depois serem centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min para obtenção do soro. As amostras de sangue contendo EDTA a 6% foram encaminhadas para o laboratório de Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Patologia da UFC para extração de DNA.

## 5.5 Aspectos Éticos

O trabalho foi previamente aceito pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio, protocolo 043.06.07 em 02 / 07 / 2008 (anexo 1) .

## 5.6 Determinação dos níveis séricos de IgG anti-PGL1

O antígeno glicolipídico fenólico, PGL-1, de *Mycobacterium leprae* foi gentilmente doado pelo Dr. John Spencer, Colorado State University, USA.

Uma concentração de 10 mg/L de PGL-1 em álcool etílico absoluto foi adicionada a placa de poliestireno (Costar, USA) e incubada durante 18 h, coberta com papel de filtro, a temperatura ambiente. Foi realizada a etapa de bloqueio, adicionando-se 100 µl de solução de albumina bovina 3% (Sigma, USA) em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), por 2 h a temperatura ambiente. Após lavagens (3x) com PBS-BSA 0,01 %, amostras de soro diluídas a 1:50 em PBS-BSA 3% foram adicionadas (50µl por poço) em duplicatas à placa e deixada por 18 h a 4° C em câmara úmida. Em seguida às lavagens, o conjugado anti-IgG foi marcado com peroxidase (Sigma, USA) na diluição 1:1000, 50 µl por poço, foi deixado por 1h30min a temperatura ambiente. Novas lavagens foram realizadas, sendo a placa a seguir incubada por 30 min com 100 µl por poço da solução de substrato contendo 0,4 mg ortofenilenodiamina/ ml de tampão citrato-fosfato 0,01 M, pH 5,0. O bloqueio da reação foi

feita a partir da adição de 25 µl de solução de ácido sulfúrico 6 N. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas a 492 nm. Os resultados foram expressos a partir da relação de absorbância da amostra teste/ amostra controle (*pool* de soro humano normal). Considerou-se valores positivos para Anti-PGL1 IgG resultado igual ou superior a 1.3, indeterminado entre 1.1 e 1.2 e negativo abaixo de 1.0.

## **5.7 Extração de DNA de amostras de células mononucleares do sangue periférico**

A extração de DNA foi realizada conforme protocolo de Hemocentro de Botucatu de São Paulo baseado no manual de laboratório de Sambrook et al.(1992).

As amostras de sangue coletadas em tubos contendo EDTA a 6% foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, sendo, o plasma desprezado. Em seguida, as células brancas hemácias eram transferidas para um tubo tipo Falcon, sendo acrescentado solução de cloreto de amônio 0,144M na proporção de 10:1 com solução de bicarbonato de amônio 0,01M num volume 2,5 vezes maior que o “buffe coat”. Após homogeneização por inversão durante 15 min a temperatura ambiente, o material era submetido à centrifugação durante 20 minutos a 2000rpm. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi lavada com solução de lise das hemácias TKM-1, centrifugando-se a amostra a 4000 rpm por 5 min, repetiu-se a operação. Em seguida, lavou-se com TKM-1. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado tomando o cuidado de não desprezar o sedimento.

Ao sedimento final contendo leucócitos, adicionou-se 1 mL de solução TKM-1, e, após homogeneização, a suspensão foi centrifugada a 11000 rpm durante cinco minutos. A operação foi repetida. Após a nova centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e, em seguida, um volume de 800 µL de solução TKM-2 e 50µL de solução de duodecil sulfato de sódio a 10% foram adicionados ao sedimento final, em seguida a suspensão foi deixada em banho-maria a 55°C por 1h. Após esse período, 360 µL de solução de cloreto de sódio a 5M foram adicionados. Após nova homogeneização, a amostra foi centrifugada a 11000 rpm durante 10 minutos para remoção das proteínas que restaram na suspensão. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de capacidade de 15 mL, e acrescentado de 2 mL de etanol absoluto gelado para precipitação de DNA. Uma “nuvem” de DNA aparecia com a adição do álcool absoluto, essa “nuvem” era transferida para eppendorf e o material deixado durante a

noite no freezer a  $-20^{\circ}$  C. Após esse período adicionava-se 1mL de etanol a 70% , fez-se uma centrifugação a 5000 rpm durante 10 min, o sobrenadante era desprezado. O sedimento contendo DNA era deixado para secar durante um período aproximado de 8h. Após esse período, 200 $\mu$ L de água Milli-Q eram adicionados aos tubos. Em seguida, as amostras eram deixadas a  $-20^{\circ}$  C para análise da qualidade do material através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% e revelação com solução de brometo de etídio.

## 5.8 Amplificação da seqüência de nucleotídeos de TLR-2

A seqüência de nucleotídeos de TLR-2 selecionada para amplificação baseou-se na proposição de Kang e Chae (2001), pois segundo estes autores há polimorfismo presente em cerca de 22% dos pacientes com a forma clínica Virchowiana da hanseníase. Essa seqüência apresenta 171 pb e está presente em uma região altamente conservada do domínio intracelular do TLR2 (GenBank acesso n° 88878). Foi utilizado um par de *primers* elaborados por Kang e Chae (2001), conforme apresentado no Quadro 2:

Seqüência	Posição	Tamanho(pb)	<i>primers</i>
5'-ACCTTATGGTCCAGGAGCTG-3'	1969-1988	171	TLR2-1F
5'-TGCACCACTCACTCTTCACA-3'	2120-2139		TLR2-1R

Quadro 2: Seqüências de nucleotídeos de TLR-2 selecionadas para amplificação. Fonte: KANG e CHAE, 2001.

As amostras de DNA extraídas anteriormente foram submetidas a 35 ciclos de amplificação através de reação em cadeia de polimerase (PCR). Inicialmente, as amostras de DNA (1 $\mu$ l) foram adicionadas de 8 $\mu$ l H<sub>2</sub>O com BSA 0,01%, 10 $\mu$ L de solução de *Mastermix* (Promega, USA - contendo MgCl<sub>2</sub>, KCl, dNTP, Taq polimerase); 0,5 $\mu$ l de *primer* TLR2-1F, 0,5 $\mu$ l de *primer* TLR2-1R na concentração 12,5 pmol/ $\mu$ L. Cada ciclo compreendeu uma etapa



de desnaturação inicial a 94°C durante 5min, seguida de outra etapa desnaturante a 94°C por 1min, uma etapa de anelamento a 65°C por 45 s, uma etapa de extensão a 72°C durante 1 min e uma etapa de extensão final a 72°C durante 7 min. A seguir, os produtos do PCR-TLR2 foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% e revelados com brometo de etídio.

## **5.9 Análise de polimorfismo de TLR-2**

Empregou-se a técnica de polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) para análise de polimorfismo em TLR-2, conforme proposto por Kang e Chae (2001). SSCP é uma técnica de separação de fitas simples de DNA, cujo princípio baseia-se na diferença da mobilidade eletroforética em seqüências polimórficas de ácidos nucléico.

Inicialmente, um volume de 3µL de solução desnaturante (constituída de formamida, xileno cianol e azul de bromofenol) foi acrescido a 7 µL do produto do PCR (obtido no máximo 2 semanas antes). A seguir, o produto desnaturado (5 µL) foi aplicado em um gel de poliacrilamida a 12% (Amersham Biosciences, Sweden) e submetido a eletroforese no aparelho para análise do SSCP (Pharmacia, Biotech - GenePhor). A corrida eletroforética foi realizada em 40 V , durante aproximadamente 13h. Em seguida, o gel foi corado com coloração de prata de acordo com o procedimento proposto pelo fabricante do kit (Amersham Biosciences, Sweden).

## **5.10 Análise da seqüência de nucleotídeos em amostras que apresentaram resultados alterados na técnica de SSCP**

A análise da seqüência de nucleotídeos em amostras que apresentaram resultados alterados na técnica de SSCP foi realizado no laboratório de Biologia Molecular da UFC, sob responsabilidade do Prof. Dr. Thalles Barbosa Granjeiro.

Os produtos da reação do PCR, contendo 20ng de DNA, foram inicialmente precipitados com isopropanol 80%, seguida de lavagem com etanol 70% e então ressuspensos em 10µL de formamida 70%, contendo EDTA 1mM, seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante do kit de seqüenciamento “*DYEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing*”

(Amersham Biosciences, USA). A corrida eletroforética foi realizada sob a voltagem 9 kV durante 90 min. A região seqüenciada foi analisada através do seqüenciador MegaBACE 1000 (Amersham Bioscience, USA) que fornece a seqüência de bases nitrogenadas, ou seja, Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) e Citosina (C), através de um eletroferograma. Cada amostra foi seqüenciada 12 vezes (6 vezes com o *primer* TLR2-1F e 6 vezes com o *primer* TLR2-1R) para evitar resultados ambíguos durante a montagem das seqüências.

A montagem das seqüências foi realizada de forma manual, comparando-se com a seqüência gênica do receptor *Toll-like* tipo 2 obtida através do NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2008).

### **5.11 Análise estatística**

Foram utilizados testes estatísticos não paramétricos de Kruskal-Wallis e Dunn para comparação dos níveis séricos de IgG anti-PGL1 entre os grupos de pacientes com as diferentes formas clínicas da hanseníase. A correlação de Spearman foi empregada para comparar os índices baciloscópicos com os níveis séricos de IgG anti-PGL1. O teste de Fisher foi utilizado para estabelecer associação entre positividade de anti-PGL1 e as formas clínicas da hanseníase. Foi considerado valor estatisticamente significante quando  $p$  era igual ou abaixo de 0,05 ou 5%.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Dados clínicos dos pacientes

O trabalho foi realizado com 87 pacientes com hanseníase na faixa etária de 15 a 80 anos, tendo sido 45 (51,7 %) do sexo feminino e 42 (48,3%) do sexo masculino. A tabela 1 apresenta o número de pacientes avaliados no presente estudo segundo a forma clínica da hanseníase baseada nos critérios da Organização Mundial de Saúde e de Ridley e Jopling.

Classificação da doença	Pacientes com hanseníase (n=48)		Pacientes com hanseníase (n=39)	
	n			n
OMS	30	18	21	18
Ridley- Jopling	Virchowiana (MHV)	Boderline- virchowiana (MHBV)	Tuberculóide (MHT)	Boderline - tuberculóide (MHBT)

Tabela 1. Número de pacientes avaliados no presente estudo segundo a forma clínica da hanseníase baseada nos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) e de Ridley e Jopling.

A tabela 2 apresenta o número de pacientes avaliados no estudo segundo a situação de tratamento da hanseníase. 26,44 % dos pacientes estudados não estavam em tratamento no momento da coleta, sendo que a maioria equivalente a 73,56% estava em algum momento do tratamento. A média do tratamento dos pacientes foi de 6 meses .

Forma clínica	Condição de tratamento	
	Não tratados (n=23)	Em tratamento (n=64)
MHV	8	23
MHBV	3	15
MHT	8	12
MHBT	4	14

Tabela 2: Número de pacientes com hanseníase, segundo a forma clínica e condição de tratamento. Fonte: RODRIGUES, 2008.

A maioria dos pacientes (n=76) havia contraído a hanseníase pela primeira vez, enquanto os demais (n=11) estavam sofrendo recidiva da doença, cuja forma clínica muitas vezes não era a mesma da primeira vez da doença.

Quanto à vacinação com BCG, 67 pacientes (77,0 %) haviam sido vacinados em algum período da vida entre a infância e a adolescência, e 20 (23,0 %) nunca haviam sido vacinados. Foi considerado um indivíduo vacinado àquele cuja cicatriz estava presente e cujo paciente informava ter sido vacinado, mas aqueles cuja cicatriz estava ausente e mesmo assim informavam vacinação foram considerados não vacinados.

Quanto ao contato prévio com a doença, 55 (63,22%) afirmaram que haviam tido contato prévio prolongado com pessoas que apresentam ou já apresentaram hanseníase, na sua maioria, familiares dos mesmos.

## 6.2 Níveis séricos de IgG anti-PGL1

No momento da inclusão dos pacientes no projeto, foi coletada uma amostra de sangue sem anti-coagulante de cada paciente para determinação dos níveis de IgG sérica anti-PGL-1 (figura 6).

A dosagem foi realizada em 83 pacientes, pois em quatro deles esta não foi realizada com sucesso.

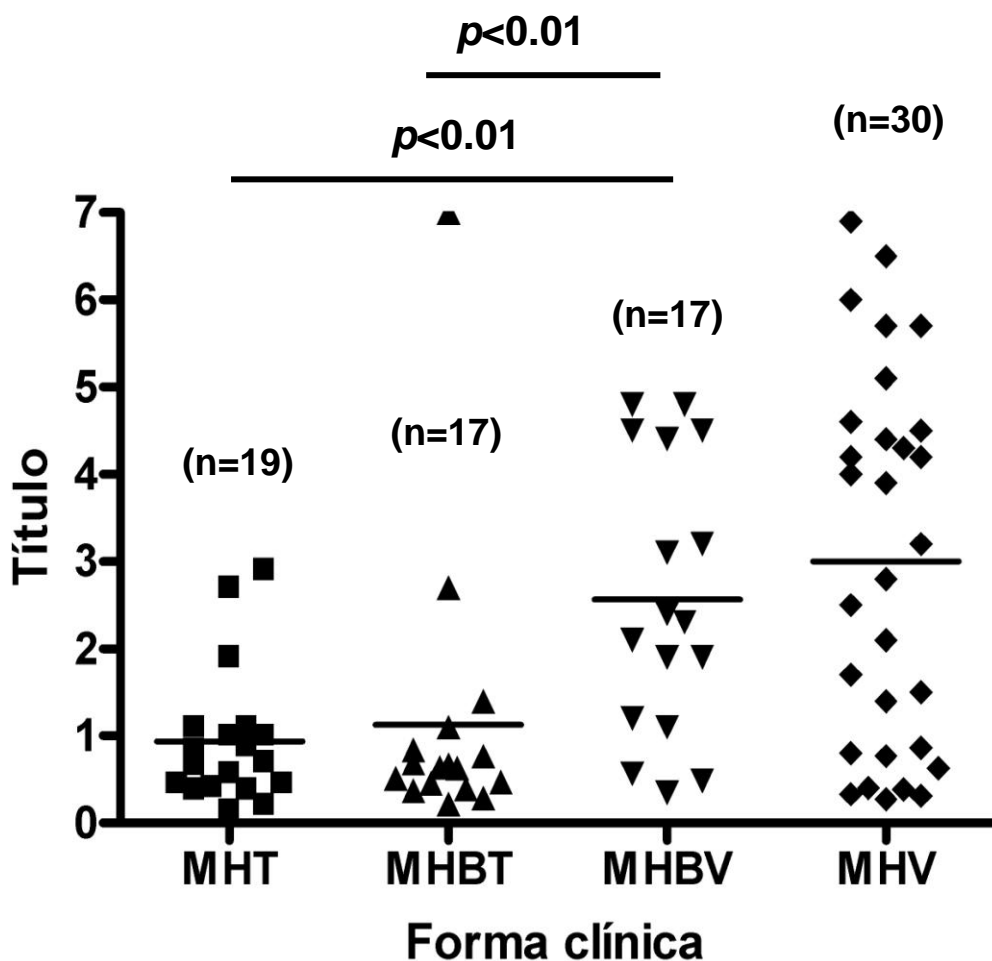


Figura 6: Níveis séricos de IgG anti-PGL1 em 83 amostras pacientes com hanseníase no momento de sua inclusão no projeto.

A análise estatística dos dados mostra que houve diferença significativa entre os grupos (teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,003$ ), tendo sido as maiores diferenças ocorridas entre o grupo com a forma tuberculóide (MHT) e o grupo com a forma borderline-virchowiana (MHBV, teste de Dunn,  $p<0,01$ ) e entre a forma borderline-tuberculóide (MHBT) com a forma MHBV ( $p<0,01$ ). Entre a forma MHBV e a forma virchowiana não houve diferença estatisticamente significativa ( $p>0,1$ ).

Houve correlação estatisticamente significativa entre os índices baciloscópicos e positividade de IgG sérica anti-PGL1 (n=81, correlação de Spearman,  $r=0,486$ ,  $p<0,0001$ ). Observou-se também uma forte associação (Tabela 3) entre a positividade de anti-PGL1 e as formas clínicas da hanseníase (Teste de Fisher,  $p<0,0001$ ; Odds ratio: 13,95;  $3,48<OR<55,96$  IC:95%).

<b>Níveis de IgG</b>						
<b>anti-PGL1</b>	<b>MHV/MHBV</b>		<b>MHT</b>		<b>Total</b>	
<b>positivos</b>	34	72,3 %	3	15,8 %	37	56,1 %
<b>negativos</b>	13	27,7 %	16	84,2 %	29	43,9 %
<b>Total</b>	47	100 %	19	100 %	66	100 %

Teste de Fisher,  $p<0,0001$ ; Odds ratio: 13,95;  $3,48<OR<55,96$  IC:95%

Tabela 3: Positividade de IgG sérica anti PGL-1 entre os participantes com as formas clínicas MHV/MHBV ou MHT da hanseníase.

Foi incluído no estudo uma família (figura 7) cujo acesso à paciente e seus familiares foi facilitado, além de mostrarem interesse pelo trabalho, por isso resolveu-se estudar toda a família cujos parentes residiam na mesma moradia com contato diário com a paciente, a paciente (EMSF, # 38), de 27 anos de idade, apresentava a forma clínica borderline - tuberculóide da hanseníase. No momento do diagnóstico, a paciente apresentava mácula hipocrômica anestésica em um dos membros inferiores e parestesia do pododáctilo contralateral, com baciloscopia negativa e teste de Mitsuda, com um diâmetro de 3mm. Os contactantes familiares também foram avaliados, mas nenhum apresentou qualquer lesão. Os marcadores sorológicos foram realizados por duas vezes, com um intervalo de um ano entre as dosagens.

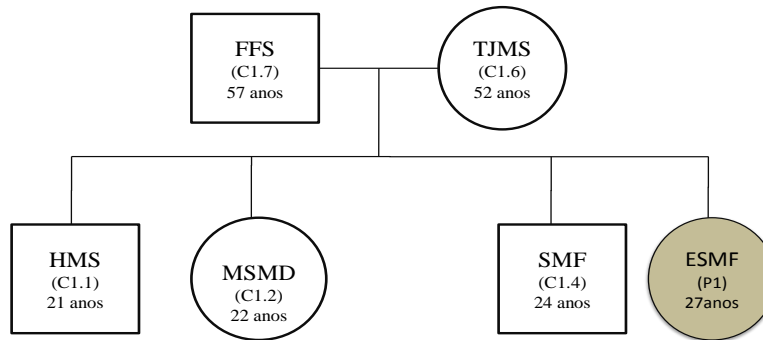


Figura 7: Heredograma da família da paciente #ESMF.

As amostras de DNA foram submetidas à análise por SSCP. Durante a primeira sorologia, a paciente apresentou negatividade em anti-PGL1 e seu pai apresentou positividade nesse parâmetro. A figura 8 mostra a paciente #38 (P.1) com títulos baixos de IgG anti-PGL1 (0,3), enquanto seu pai apresentou sorologia positiva (1,6).

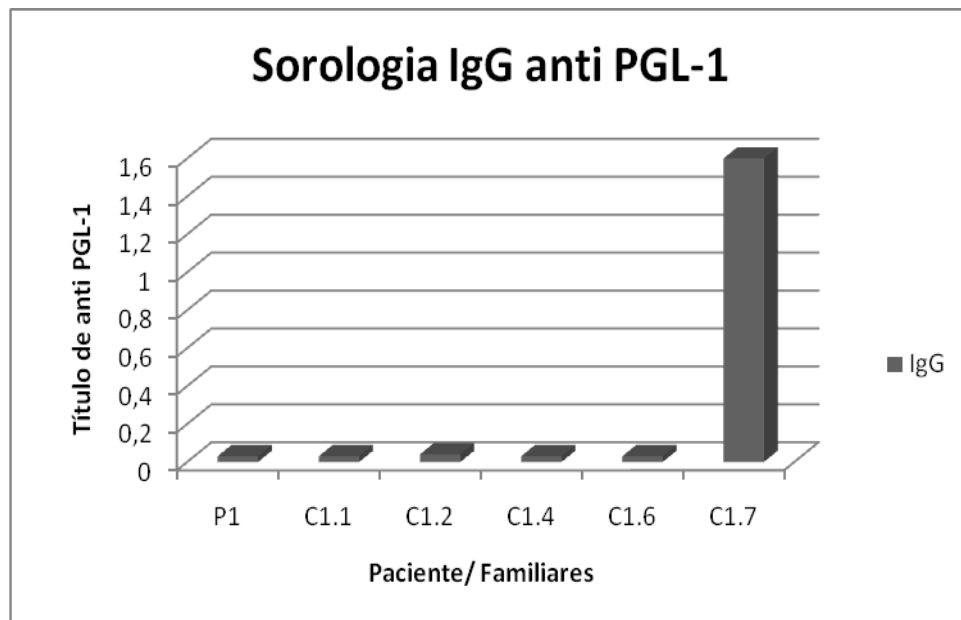


Figura 8: Sorologia realizada em 2007 na paciente ESMF (#38) com a forma borderline - tuberculóide e em seus comunicantes intra-domiciliares.

Um ano depois, essa família continuou sendo monitorada e observou-se que a paciente continuava com sorologia negativa, enquanto seu pai apresentou níveis ainda mais elevados de anti-PGL1. Seus outros familiares apresentaram negatividade no exame.

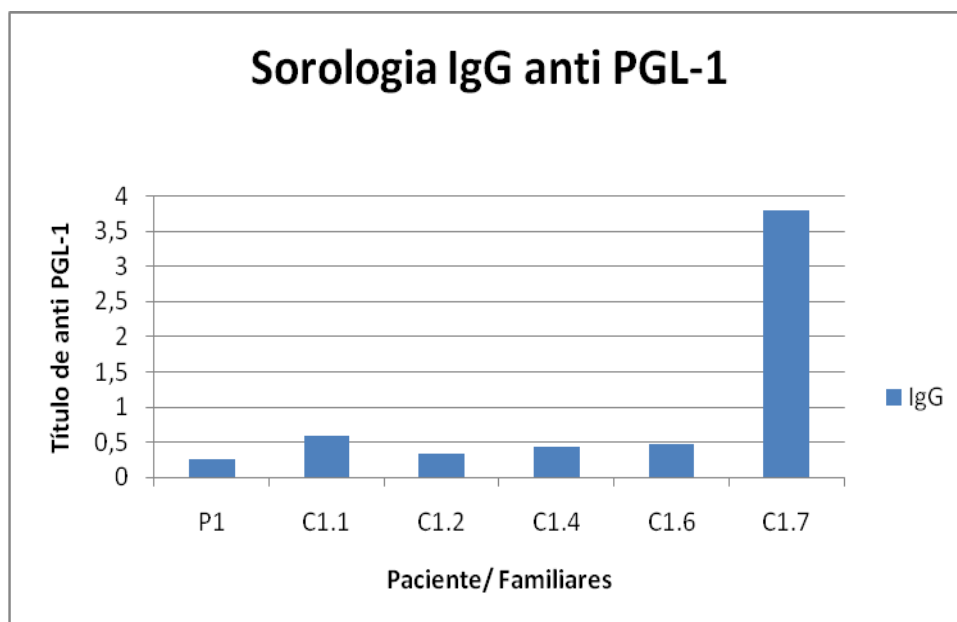


Figura 9: Sorologia realizada em 2008 na paciente ESMF (#38) com a forma borderline-tuberculóide e em seus comunicantes intra-domiciliares

### 6.3 Amplificação da seqüência de 171 pb da região intra-celular do receptor Toll-like2

Todas as 87 amostras de pacientes com hanseníase analisadas tiveram como produto de PCR 171 pb e a região amplificada foi de aminoácidos altamente conservados até a região do C-terminal 671-692 do gene TLR-2. Usou-se como padrão 100pb.



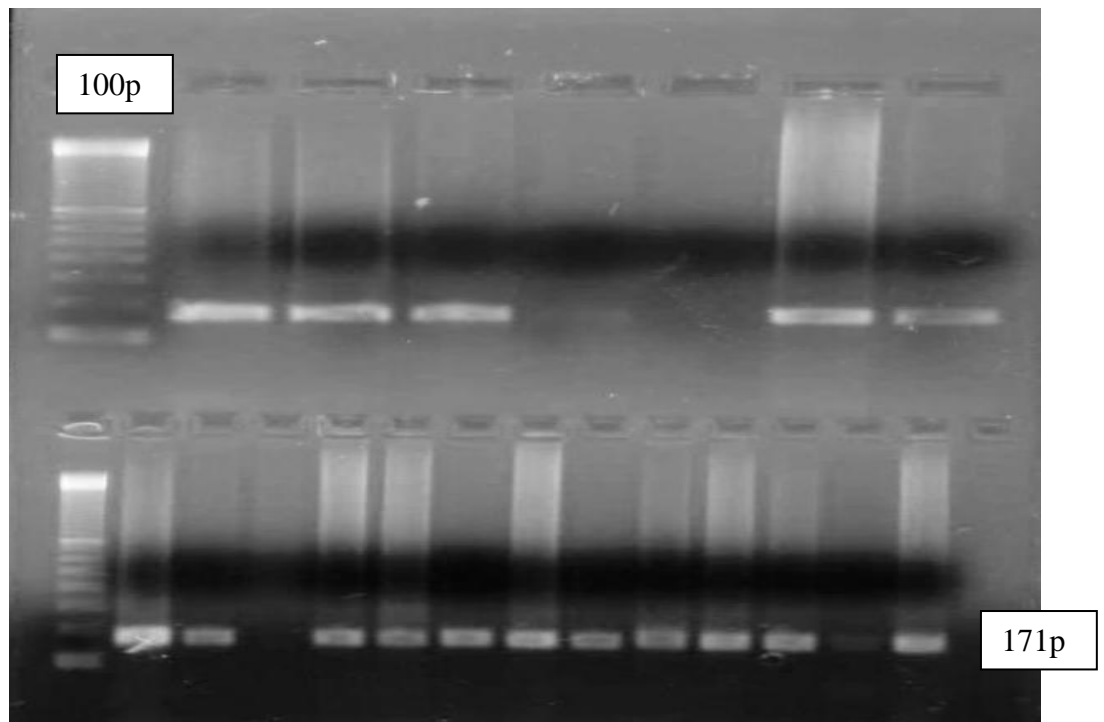


Figura 10: Produtos de amplificação da seqüência de tamanho 171 pb da região intra-celular do receptor *Toll-like 2* de amostras de pacientes com hanseníase analisados pelo PCR, onde a eletroforese em gel de agarose foi a 1,5% e revelação com brometo de etídio. Utilizou-se um padrão 100 pb.

#### 6.4 Análise do Polimorfismo Conformacional de Fita Única

A figura 11 observa-se o perfil eletroforético de 10 amostras de produtos de PCR do domínio intra-celular de receptores Toll-like 2 analisados pela técnica de SSCP. Conforme mostra a figura, uma amostra #22 (linha 11) apresentou um perfil diferenciado das demais, sugerindo alteração na seqüência de DNA da amostra. Esta amostra foi submetida ao seqüenciamento.

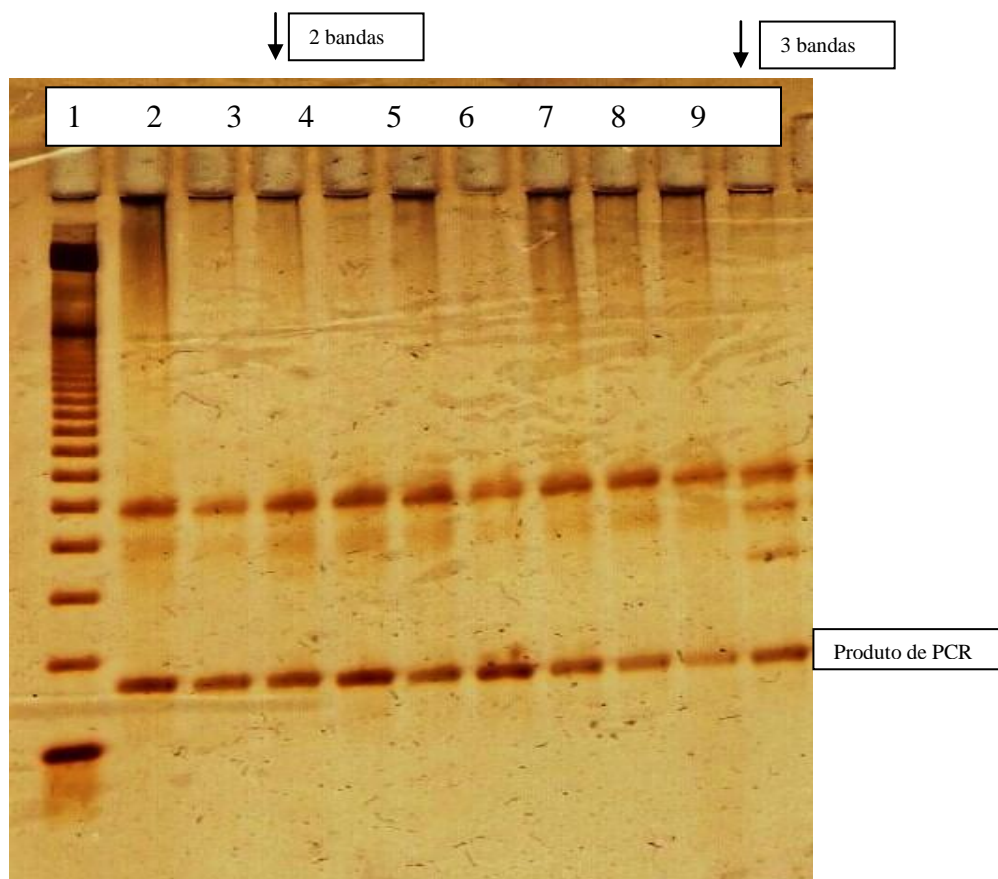


Figura 11: Perfil eletroforético de 10 amostras de produtos de PCR do domínio intra-celular de receptores Toll-like 2 analisados pela técnica de SSCP. A linha 1 apresenta padrão 100 pb.

Foram realizados sete corridas eletroforéticas para a realização do SSCP, as amostras analisadas apresentaram perfis com duas ou três bandas, como mostram as figuras 11 e 12.

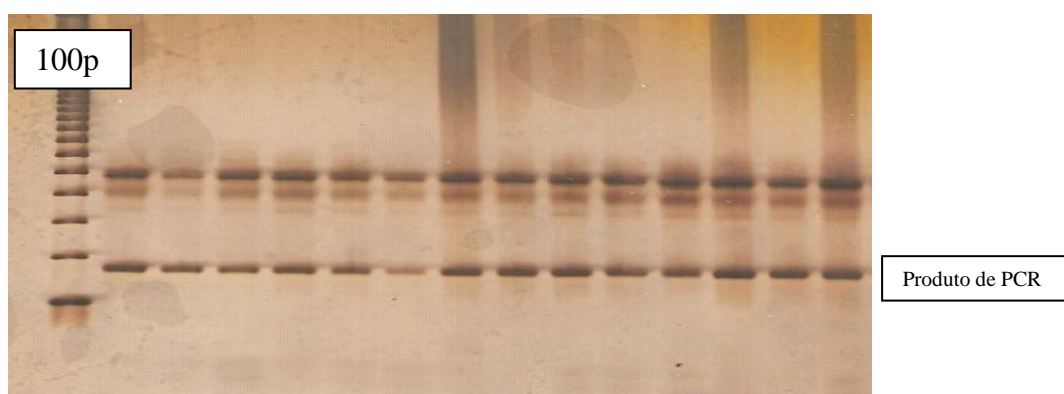


Figura 12: PCR-SSCP de 14 amostras de produtos de PCR

Em um teste com outras 17 amostras (figura 13), observou-se que pelo menos quatro amostras (sinalizadas por setas) apresentaram um perfil eletroforético diferenciado das demais, sendo assim, as mesmas (linha 1, amostra #56; linha 4, amostra #82; linha 12, amostra #35; linha 17, amostra #22) foram submetidas ao seqüenciamento.

Foram também testadas as amostras da paciente ESMF (#38) e de seus contactantes familiares não tendo sido verificada nenhuma alteração quanto ao perfil da mobilidade eletroforética dos produtos de PCR do domínio intra-celular de receptores Toll-like 2 analisados pela técnica de SSCP na paciente, entretanto um de seus familiares apresentou 3 bandas eletroforéticas, fazendo-se necessário o seqüenciamento da amostra para a análise da sequência amplificada.

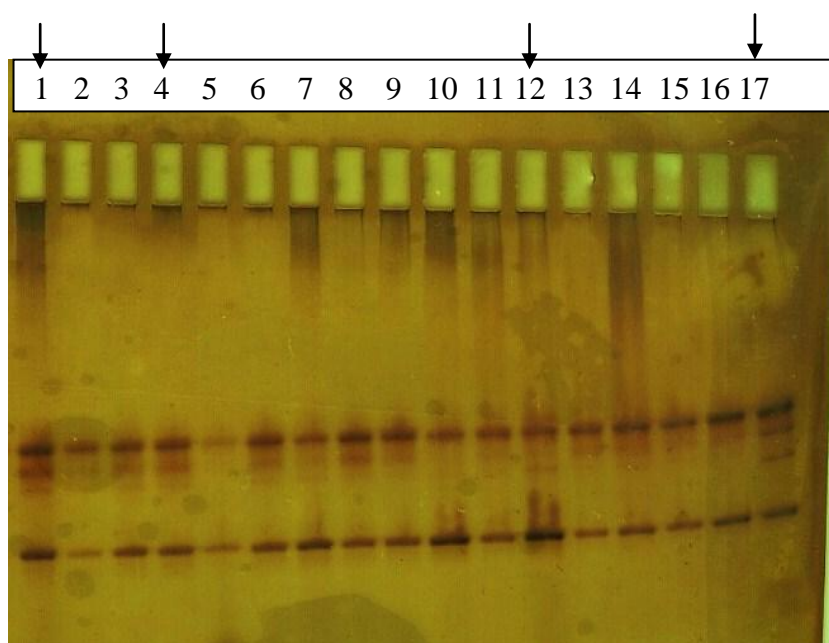


Figura 13: Perfil eletroforético de 17 amostras de produtos de PCR do domínio intra-celular de receptores Toll-like 2 analisados pela técnica de SSCP.

## 6.5 Dados dos pacientes cujas amostras foram seqüenciadas

Paciente	Forma clínica	Vacinado com BCG	Número de lesões	Índice baciloscópico	IgG anti-PGL1
MKSO #22	MHV	SIM	Acima de 5	2,5	3,2
PSP # 35	MHV	SIM	Acima de 5	1,8	2,5
AF # 56	MHT	SIM	2	0,0	1,1
FAFS # 82	MHT	NÃO	3	0,0	1,9

Quadro 3: Amostras de 2 pacientes MHV e 2 pacientes MHT seqüenciadas.

## 6.6 Seqüenciamento das amostras que apresentaram resultados alterados na técnica de SSCP

As figura 14 e 15 apresentam os eletroferogramas das quatro amostras (#22, #35, #56, #82) seqüenciadas. Observou-se em todas as amostras seqüenciadas há alterações em duas posições, a posição C2029T já descrita anteriormente por Kang e Chae (2001) e a outra posição encontrada foi C2006T, descrita em 2005 por Malhotra et al. Isto pode ser visualizado, pois, de acordo com a figura 14, há um pico representando a base A (adenina) e um pico representando a base G (guanina) na posição 2006 (CT), e conforme a figura 15, há um pico representando a base G (guanina) e um pico representando a base A (adenina) na posição 2029 (CT). Tais padrões foram considerados heterozigose.

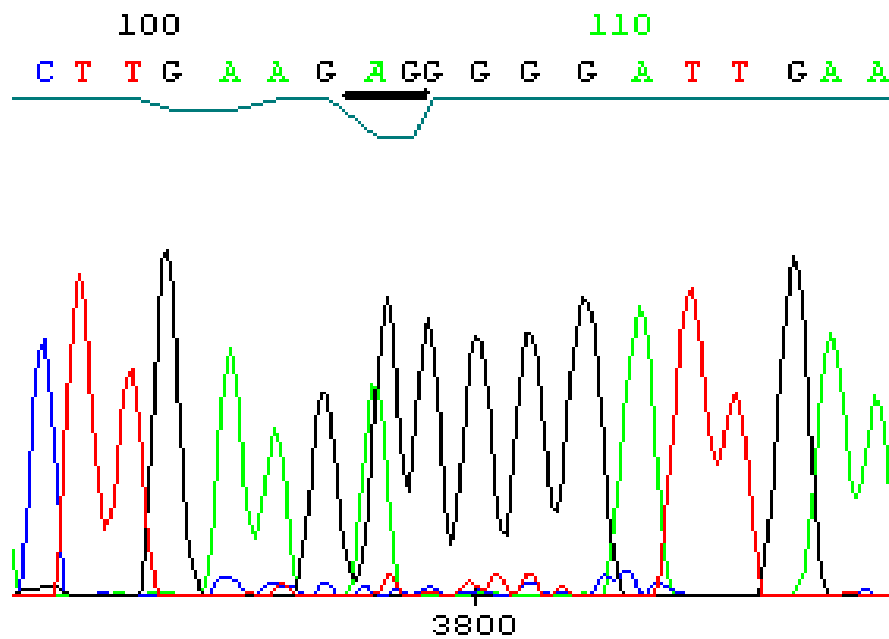


Figura 14: Eletroferograma do seqüenciamento das bases nucleotídicas da região de 171 pb de receptores Toll-like 2. Há um padrão de heterozigose, mostrando dois picos, A e G, na posição C2006T.

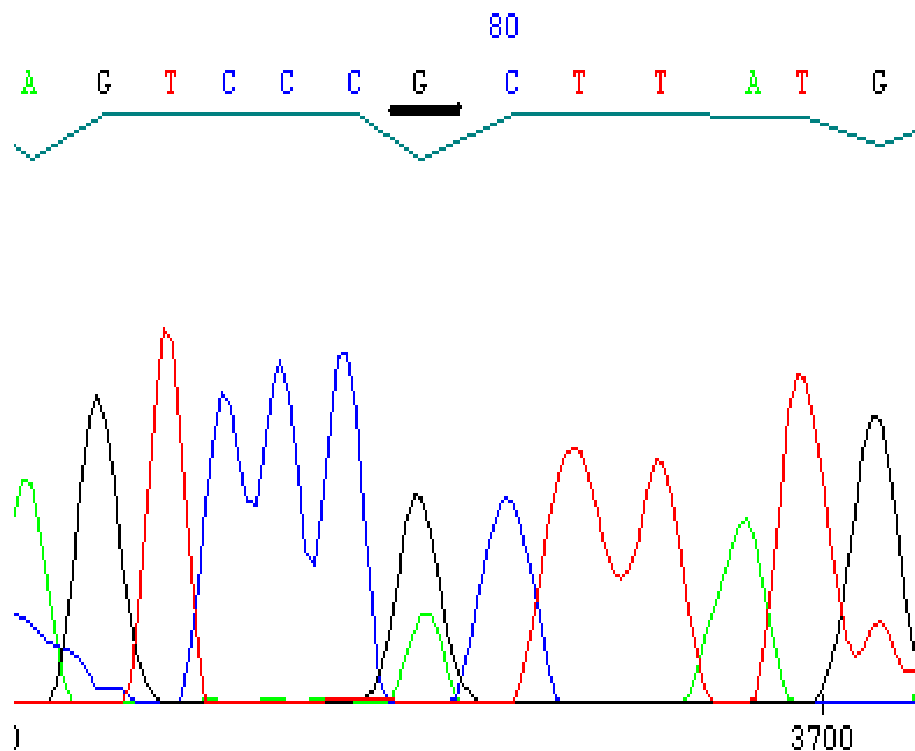


Figura 15: Eletroferograma do seqüenciamento das bases nucleotídicas da região de 171 pb de receptores Toll-like 2. Há um padrão de heterozigose, mostrando dois picos, A e G, na posição C2029T .

Na figura 16, observa-se eletroferograma da amostra #82 seqüenciada, apresentando um pico da base A (adenina) e um outro da base C (citosina), essa alteração não foi observada em nenhuma das demais amostras seqüenciadas.

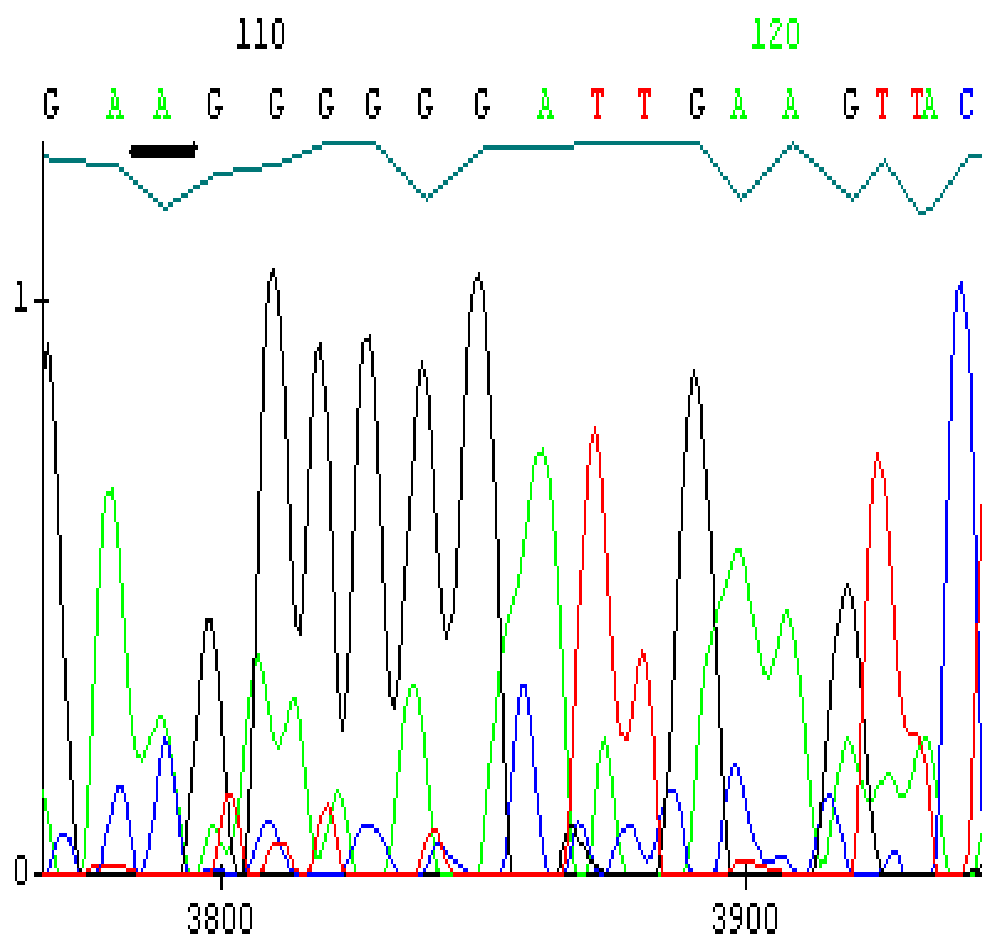
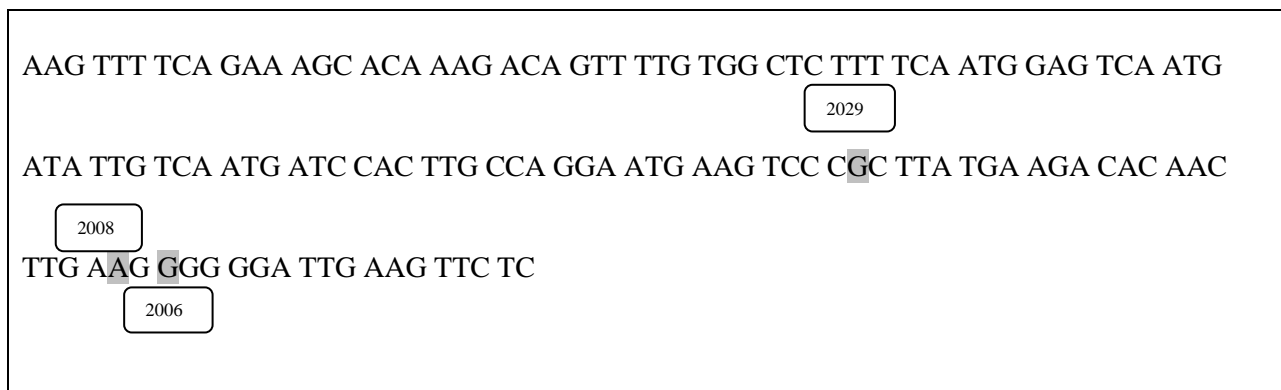


Figura 16: Eletroferograma do seqüenciamento das bases nucleotídicas da região de 171 pb de receptores Toll-like 2. Há um padrão de heterozigose, mostrando dois picos, A e C, na posição T2008G.

O quadro 3 apresenta a seqüência de bases nucleotídicas amplificadas por PCR com as posições onde poderiam estar ocorrendo polimorfismo, segundo Kang e Chae (2001):



Quadro 4: Seqüência de bases nucleotídicas da região intracelular amplificada dos receptores *Toll like 2*. As posições marcadas representam as posições onde os polimorfismos foram encontrados.

## 6.7 BLAST

Realizou-se o alinhamento das amostras seqüenciadas através do banco de dados do site NCBI - BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2008) comparando-se a seqüência das amostras (acesso GenBank U88878) seqüenciadas com as depositadas no banco de dados do site do NCBI.

As amostras #22, #35 e #56 apresentaram 99 % de homologia quando relacionadas com as outras amostras da espécie *Homo sapiens* depositadas no site, entretanto a amostra #82 apresentou 98% de homologia com determinada amostra já depositada (também *Homo sapiens*) em virtude da presença de heterozigose na posição 2008, esta como já citado, não ocorreu nas demais amostras.

## **7 DISCUSSÃO**

### **7.1 Resposta imune humoral nos pacientes**

Sabe-se que a presença do anticorpo anti-PGL-1 no sangue periférico corresponde à ativação humoral da resposta imune humoral do paciente e os maiores títulos do anticorpo são observados nos pacientes com as formas multibacilares (LEFFORD et al., 2001). Dessa forma, o motivo pelo qual realizou-se a determinação dos níveis séricos de anti-PGL1 foi exatamente o fato de que a resposta imune humoral está exarcebada, enquanto a resposta imune celular encontra-se deprimida, resultante de desbalanço Th1/Th2, nas formas multibacilares da hanseníase e desta definiu-se uma maneira indireta de se verificar o estado atual de tal resposta nos participantes do estudo.

72,3% dos pacientes com a forma multibacilar avaliados no presente estudo apresentaram resultados positivos de IgG anti-PGL1, demonstrando uma resposta imune humoral ativa e exarcebada. Por outro lado, 84,2% dos pacientes com a forma clínica paucibacilar apresentou uma resposta imune humoral correspondente similar aos controles normais, ou seja, abaixo de 1,0. Alguns pacientes com a forma multibacilar apresentaram resultados baixos ou negativos de IgG anti-PGL1, assim como alguns com a forma paucibacilar apresentaram resultados positivos de anti-PGL1. Quanto às formas intermediárias, esperava-se que houvesse maior frequência de positividade dos anticorpos, como de fato ocorreu. É importante lembrar que as coletas das amostras de sangue eram realizadas no momento de inclusão do paciente no estudo, isto é, que não coincidiam necessariamente com o momento do diagnóstico da doença. Isto pode explicar algumas discrepâncias ocorridas na correlação entre a forma clínica da doença e negatividade ou positividade dos anticorpos anti-PGL1 (NAGAO-DIAS et al., 2007).

Um outro aspecto importante que deve ser ressaltado é que as formas clínicas são classificadas pelo clínico, baseando-se em número de lesões e resultados da baciloscopia. Isto significa dizer que alguns casos principalmente aqueles com formas intermediárias podem ter sido classificadas de forma errônea. Considerou-se que os níveis de anti-PGL1 deveriam ser incluídos como um dos critérios de classificação, visto que em já em trabalho anterior, demonstrou-se positividade nesses parâmetros em pacientes com a forma dimorfo-tuberculóide (NAGAO-DIAS et al., 2007).



Decidimos averiguar o isotipo IgG, ao invés de IgM, contrariando a maioria dos trabalhos realizados dentro desse tema, visto que, em outras patologias infecciosas, não é incomum serem encontrados resultados falso positivos com IgM, havendo a grande possibilidade de se ter presente fatores reumatóides, por exemplo, como ocorre em outras doenças infecciosas, como dengue, doença de Chagas, toxoplasmose. Poder-se-ia ainda contestar a avaliação do isotipo IgG, visto que PGL-1 é um antígeno glicofenólico, e portanto, trata-se de um antígeno timo-independente 1. Entretanto, já foram realizados outros trabalhos, demonstrando a presença de IgG contra antígenos lipopolissacarídicos, considerados também antígenos timo-independentes 1 (NAGAO et al., 1998).

Na análises deste estudo, constatou-se que IgM anti-PGL1 está presente em amostras de soro de indivíduos clinicamente saudáveis (dados não apresentados); por outro lado, IgG anti-PGL1 estava ausente nesses indivíduos e presente apenas nos pacientes com hanseníase, principalmente naqueles com as formas virchowiana e dimorfo-virchowiana da doença, mas também naqueles com a forma dimorfo-tuberculóide (NAGAO-DIAS et al., 2007).

Uma porcentagem correspondente a 63% dos pacientes apresentou contato prévio com algum conhecido ou familiar com hanseníase. Sabe-se que 90% da população possuem uma resistência natural ao bacilo de Hansen e dificilmente contraem a doença, entretanto uma pessoa saudável que convive frequentemente com um paciente hanseniano apresenta uma maior probabilidade de desenvolver a doença, lembrando que o círculo de transmissão não é limitado aos contatos domiciliares, podendo abranger contatos peri-domiciliares e contatos sociais (LOMBARDI et al., 1997; CALADO et al., 2005). É importante lembrar que considera-se a hipótese de que a positividade de anti-PGL1 no soro representa um risco 7,5 vezes maior de desenvolvimento da doença (DOUGLAS et al., 2004).

## **7.2 Polimorfismo dos receptores Toll-like 2 nos pacientes**

Acredita-se que há um conjunto de genes que podem influenciar a susceptibilidade à hanseníase, sendo alguns relacionados com a infecção *per se*, ou seja, a doença independentemente de sua manifestação clínica, e um conjunto de genes definiria a forma clínica da doença no indivíduo infectado. Assim sendo, sugerem-se genes candidatos baseados em critérios como função, posição ou ambos (PREVEDELLO; MIRA, 2007).

Sabe-se que a forma clínica virchowiana ou disseminada da doença é deficiente na diferenciação de linfócitos Th1 e, em parte, isso é explicado pela síntese deficiente de IL-12. Além disso, nessa forma clínica, constata-se um aparente “defeito” na produção de IFN- $\gamma$ , fundamental para ativação de macrófagos (BOCHUD et al, 2003).

Os receptores *Toll-like* apresentam um importante papel na resposta imune contra o *Mycobacterium leprae*. Quando as micobactérias interagem com macrófagos via TLR-2, há síntese de IL-12 por macrófagos ativadas, e conseqüentemente à presença dessa citocina, diferenciação de Th1, que por sua vez, libera IFN- $\gamma$ , que age potencializando a ativação dos macrófagos como também de células T. Dessa forma, a IL-12 age promovendo a imunidade mediada por células contra patógenos intracelulares, como o *M. leprae*, aumentando assim a resposta Th1, através de mecanismos mediados por TLR-2 (KANG et al., 2004).

Acredita-se que a deficiência da resposta imune celular contra *M. leprae* pode estar associada com polimorfismo na posição C2029T do gene TLR-2, pois o mesmo estaria interferindo na cascata de reação dessa resposta, impedindo a ligação do domínio intracelular do Toll like com a proteína Myd88 e a falta dessa associação resultaria na ausência de resposta imune celular contra o *M. leprae*(TEXEREAU et al., 2005).

Nem todo polimorfismo resulta em alteração da atividade funcional, levando a um aumento da susceptibilidade à infecções, como tuberculose e hanseníase (TEXEREAU et al., 2005). Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP) podem não ter efeito sobre a função celular porque não representa alteração no aminoácido, ou então que a mudança de aminoácido não está afetando a estrutura nem as características da proteína (PREVEDELLO; MIRA, 2007).

O TLR-2 humano está localizado no cromossomo 4q32 e é composto por 3 exons, sendo os dois primeiros não codificantes e o terceiro, codificante (TEXEREAU et al., 2005). Um dos polimorfismos ocorre na posição 2029 da sequência nucleotídica de uma sequência amplificada do éxon 3, onde há substituição (CT), com conseqüente troca de aminoácido de arginina para triptofano na posição 677. O que se verifica é que nos pacientes esse polimorfismo apresentam níveis mais baixos de IL-12 (TEXEREAU et al., 2005).

Outros autores comprovam a presença de polimorfismo no domínio intracelular Arg<sub>677</sub>Trp de receptor TLR-2 em pacientes coreanos com a forma virchowiana (KANG; CHAE, 2001). Os autores verificam ausência de tal polimorfismo em pacientes com a forma tuberculóide. A alteração da produção de citocinas é notória. As interleucinas 10 e 12 de

PBMC apresenta sua produção comprometida, quando o receptor sofre mutação. A IL-12 tem como sua forma ativa o heterodímero p70 composto das subunidades p40 e p35. As células mononucleares produzem IL-10 e IL-12 sob estímulo por *M. leprae* ou LPS. Quando não há mutação, os níveis de IL-12 são mais elevados do que IL-10, no entanto, quando há mutação, o contrário ocorre (KANG et al, 2004).

De acordo com estudo realizado na França outro polimorfismo funcional consiste na substituição (GA) na posição 2257 da sequência de nucleotídeos, havendo troca de glutamina para arginina na posição 753 da sequência de aminoácidos. Este polimorfismo foi verificado na região terminal C de TLR-2 e foi identificado em 3% de doadores de sangue normais. Indivíduos que apresentam este polimorfismo podem estar mais susceptíveis a infecções mais graves devido a uma resposta imunossuprimida a lipoproteínas (TEXEREAU et al., 2005).

Lorenz et al (2000) sugeriram que o TLR-2 pode estar envolvido na sinalização da resposta imunológica na infecção causada por *Staphylococcus*, traçando a hipótese de que polimorfismo no receptor poderia levar a uma resposta inadequada a lipoproteínas das bactérias Gram positivas. Os autores avaliaram 91 pacientes com choque séptico e identificaram um polimorfismo no TLR-2 em 3% da população estudada, resultante de uma substituição do aminoácido arginina pelo da glutamina na posição 753 (Arg<sub>753</sub>Gln).

Sabe-se que os receptores *Toll-like* são cruciais na resposta imune inata e adquirida, reconhecendo múltiplos patógenos (PAMPs) como as micobactérias, bactérias Gram positivas e fungos. São muitos já os polimorfismos no TLR2 relacionados com patologias como choque séptico por *Candida*, periodontite, úlceras provocadas por infecções por *Helicobacter pylori*, hanseníase, tuberculose e outras doenças (WOEHRIE, 2008; ZHU, 2008; MOURA, 2008). Sabe-se ainda que o TLR-2 pode formar heterodímeros com o TLR-1 e TLR-6 para o reconhecimento dos padrões moleculares de antígenos de bactérias Gram positivas, fungos e de micobactérias.

A análise desses polimorfismos relacionados ao receptor TLR-2 torna-se cada vez mais interessante e intrigante, quanto mais é observada uma correlação positiva entre genótipo e susceptibilidade a formas mais graves de doenças infecciosas.

Polimorfismos do Arg<sub>677</sub>Trp e do Arg<sub>753</sub>Gln do gene TLR-2, chamados polimorfismos em nucleotídeo único (SNP) podem afetar a resposta imune contra *Candida*,

podendo estar relacionado com alta morbi-mortalidade. WOEHRIE et al (2008), estudando 325 pacientes com choque séptico, observaram que 5,2% eram heterozigotos para Arg<sub>753</sub>Gln, enquanto o SNP Arg<sub>677</sub>Trp não foi encontrado em nenhum paciente. Os autores verificaram que em pacientes com choque séptico causado por bactérias Gram positivas, o perfil de heterozigose em TLR-2 não alterou o padrão de citocinas produzidas, no entanto, os pacientes com choque séptico causado por *Candida* apresentaram elevados níveis de TNF- $\alpha$  no plasma, mas baixos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-8.

Tahara et al (2008) no Japão estudaram os polimorfismos -196 a -174 do gene TLR2, relacionando-os com o risco de doença gastro-duodenal induzida por *Helicobacter pylori* em uma população japonesa com uma casuística de 309 pacientes e 146 controles saudáveis. Não foi encontrada nenhuma associação entre o polimorfismo do gene TLR2 com o risco de úlcera gástrica, úlcera duodenal e gastrite, quando comparado com os controles saudáveis. No entanto, esse polimorfismo foi associado com metaplasia intestinal em pessoas com mais de 60 anos de idade.

Malhotra et al (2005) realizaram um estudo de polimorfismo de TLR-2 em um grupo de 286 pacientes da Índia, sendo que 61 apresentavam a forma clínica MHV, 142 apresentava a forma clínica MHT e o restante as formas intermediárias da doença. Eles mostraram que havia perfil de heterozigose nas posições nucleotídicas 2006, 2029 e 2088 em todos os pacientes estudados, tendo resultado em troca de aminoácidos Pro<sub>669</sub>His, Arg<sub>677</sub>Trp e Ser<sub>696</sub>Gly, respectivamente, usando o mesmo par de *primers* anteriormente utilizados por Kang e Chae (2001), no entanto, contestaram a existência desse polimorfismo, afirmando que esse equívoco seria atribuído à existência de uma região homóloga ao éxon 3 do gene TLR-2, também amplificada pelos *primers* utilizados pelos autores, e que estariam apresentando polimorfismo nas posições 2006, 2029 e 2088.

No presente estudo, foi analisado o polimorfismo C2029T de TLR-2 em pacientes com as formas clínicas MHV, MHT, MHDT e MHDV e procurou-se verificar se o mesmo tipo de polimorfismo observado por outros autores (KANG; CHAE, 2001), estaria ocorrendo nos pacientes hansênicos estudados com a forma virchowiana e se estaria ausente nas outras formas clínicas da doença com o objetivo de verificar uma possível predisposição genética à doença. Utilizou-se a mesma metodologia proposta pelos autores, ou seja, avaliou-se o polimorfismo de TLR-2 empregando a técnica de polimorfismo conformacional de fita única (SSCP).

### 7.3 Polimorfismo Conformacional de Fita Única (SSCP)

É importante a escolha da técnica mais adequada para a detecção de variações de uma única base em uma sequência de DNA. Polimorfismos e mutações em DNA de fita simples têm sido estudados pela técnica de SSCP desenvolvida por Orita et al (1989). SSCP é uma técnica usada em casos de detecção de alterações pequenas em uma sequência de nucleotídeos e pontos de mutação, uma vez que é considerada rápida, de fácil execução e sensível (KASUGA; CHENG; MITCHELSON, 1995) .

A técnica baseia-se na alteração da mobilidade eletroforética de uma fita única de DNA, quando há alguma alteração na sequência de nucleotídeos (HAYASHI, 2008). É possível ocasionalmente encontrar perfis eletroforéticos distintos decorrentes, não na diferença da sequência de nucleotídeos, a qual altera o estado conformacional da molécula. Isto pode ser decorrente das condições em que a eletroforese ocorre, ou seja, temperatura, entre outros. Em raros casos, são verificados rastros de bandas ou manchas decorrentes de estados conformacionais diferentes (ORITA et al., 1989).

Kang e Chae (2001) encontraram 22 % de polimorfismo na população de pacientes estudada. Se considerarmos os resultados apenas de SSCP, observamos em nossa casuística, uma porcentagem 4,6% de polimorfismo, muito diferente dos valores encontrados pelos autores. Isto pode revelar que a nossa população possui um perfil distinto de polimorfismo, ou então, que a casuística ainda é pequena para se traçar qualquer consideração. Tal explicação poderia também ser explicada em base de que o polimorfismo pode estar presente nas populações africanas e asiáticas, mas não na caucasiana (TEXEREAU et al., 2005). Um dado inédito em nosso trabalho foi que o polimorfismo parece ter ocorrido em uma posição diferente do reportado por outros autores.

Embora tenhamos utilizado a técnica de SSCP, conforme propõem Kang e Chae (2001), em nossa experiência, ela se revelou pouco sensível, uma vez que algumas amostras aparentaram apresentar um perfil eletroforético distinto das demais, no entanto, esta visualização deixava o pesquisador em dúvida a respeito das bandas aparentes, devido ao aspecto subjetivo de interpretação (figura 14). Tornou-se necessário o seqüenciamento da região supostamente polimórfica de várias amostras. No presente trabalho, foi possível o seqüenciamento de 4 amostras. As demais amostras serão posteriormente submetidas ao seqüenciamento.

Em estudo realizado na China com 40 pacientes com periodontite generalizada, 50 com periodontite crônica e 100 controles saudáveis, foi analisada a presença de polimorfismo no gene do TLR2, nos aminoácidos Arg<sub>677</sub>Trp e Arg<sub>753</sub>Gln, através da técnica de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Todas as amostras analisadas apresentaram heterozigose, inclusive os controles utilizados no aminoácido Arg<sub>677</sub>Trp. Nenhum alelo mutante ocorreu no aminoácido Arg<sub>753</sub>Gln; verificou-se ainda que 6% da população controle apresentou heterozigose nesta posição do aminoácido (ZHU et al., 2008).

#### **7.4 Análise da seqüência de nucleotídeos da região polimórfica**

Em nosso trabalho, avaliamos a presença de polimorfismo em TLR-2 e sua associação com as diferentes formas clínicas da hanseníase. Procuramos estabelecer uma correlação entre as várias formas clínicas da doença de acordo com a classificação de Ridley Jopling com o perfil eletroforético verificado na técnica de SSCP.

Avaliou-se a alteração de aminoácidos 671-692 de uma região altamente conservada dos aminoácidos do C-terminal no domínio intracelular do receptor *Toll-like 2* em quatro amostras de pacientes com a forma virchowiana (#22 e #35) ou com a forma tuberculóide (#56 e #82), comparando os resultados com aqueles obtidos por Kang e Chae (2001), cuja mudança da base nucleotídica citosina (C) por uma timina (T) na posição C2029T, correspondeu à mudança de aminoácido arginina pelo triptofano, quando houve polimorfismo. Os autores verificaram um perfil de homozigose na posição C2029T, seja apresentando citosina, seja apresentando timina. No presente trabalho, encontrou-se um perfil de heterozigose na posição C2029T em todas as amostras sequenciadas, apresentando nestas a presença simultânea das bases adenina e guanina; no seqüenciamento, observou-se que o primer reverse obteve um resultado mais satisfatório que o forward, sendo assim deve-se considerar para a base adenina seu nucleotídeo correspondente a timina e para a guanina, considera-se a citosina. Isto significa dizer que verificou-se um perfil de heterozigose tanto em pacientes com a forma tuberculóide como naqueles com a forma virchowiana. Será necessária uma futura investigação a respeito desse mesmo perfil de heterozigose em um número maior de pacientes com ambas formas clínicas. Será também necessário estender o estudo para controles saudáveis, contactantes e pacientes com as formas clínicas intermediárias.

Alguns problemas ocorreram durante o seqüenciamento das amostras. Algumas das análises não obtiveram sucesso, talvez pelo fato de ter sido avaliado um fragmento pequeno de 171 pares de base. Novos testes serão necessários, utilizando-se produtos de PCR de maior tamanho. Para tanto, será necessária a elaboração de novos *primers*, inclusive para confirmar resultado do seqüenciamento da amostra #82 que teve um polimorfismo na posição C2008T não encontrada nas demais amostras seqüenciadas.

Uma outra verificação pôde ser constatada em nesse estudo do seqüenciamento dos nucleotídeos das amostras. Além dos picos com as bases nucleotídicas encontrados na posição C2029T, observou-se dois outros picos, A e G, na posição C2006T, havendo a mudança do aminoácido Pro<sub>669</sub>His. Por outro lado, análise da amostra 82 revelou que na posição T2008G, houve a presença de dois picos, A e C, resultando em mudança do aminoácido glutamina para ácido aspártico. Esta alteração será confirmada através da realização de um novo seqüenciamento, desta vez, utilizando um produto maior de PCR, isto é, com uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos 300pb.

Sabe-se que a forma virchowiana da hanseníase caracteriza-se pela deficiência da resposta imune celular, com resposta humoral exarcebada, sem entretanto ser o suficiente para eliminar a micobactéria (TALHARI; NEVES, 1997). Os pacientes com a forma virchowiana da hanseníase, cujas amostras foram seqüenciadas (#22 e #35), apresentaram uma resposta imune humoral ativa, observada pelos valores de IgG anti-PGL1 bem acima dos títulos considerados normais, ou seja, acima de 2,5. Os dados foram diretamente correlacionados com os índices baciloscópicos.

Nas amostras seqüenciadas dos pacientes com a forma clínica tuberculóide (#56 e #82), a amostra #56 apresentou uma baciloscopia negativa e títulos baixos do anticorpo IgG anti-PGL, mostrando uma correlação entre a forma clínica e a resposta imune humoral. O mesmo não ocorreu com a amostra #82, proveniente de paciente classificado com a forma tuberculóide. Este apresentou baciloscopia negativa com positividade de IgG anti-PGL1. Em alguns casos podemos encontrar positividade dos marcadores sorológicos na forma tuberculóide (NAGAO-DIAS et al., 2007).

Como mencionado anteriormente, sempre existe o risco de haver problemas relacionados com a classificação da doença baseada apenas nos achados clínicos. Poderia se questionar se este paciente estaria com uma presença de perfil misto de Th1/Th2. No seqüenciamento dessa amostra, observou-se um polimorfismo na posição T2008G da

seqüência nucleotídica que não foi encontrada nas demais. Analisando a história clínica desse paciente, verificou-se que ele não era vacinado com BCG (sem a presença de cicatriz vacinal) e apresentou no momento do diagnóstico um espessamento do nervo radial e três lesões características da forma tuberculóide com bordas elevadas e centro hipocrômico; além disso, sua esposa também apresentava hanseníase, já o paciente #56 não apresentava o espessamento neural e havia sido vacinado com BCG (presença de cicatriz vacinal).

Comparou-se as seqüências obtidas em nesse trabalho com as seqüências depositadas no site NCBI – BLAST. Foram calculados dois parâmetros, ou seja, escore e valor, para avaliar a significância da comparabilidade entre as seqüências. Verificou-se que as seqüências polimórficas nas posições C2006T e C2029T já foram depositadas e representaram 99% de semelhança com as seqüências de nossas amostras. O perfil de heterozigose verificado na posição T2008G obtido com a amostra # 82, mostrou uma semelhança de 98% com alguma seqüência de amostra de DNA humano já depositado no site do NCBI - BLAST, entretanto, seqüência idêntica encontrada no presente estudo ainda não foi depositada no banco de dados do site, fazendo-se necessário que haja o depósito da mesma mediante o desenho de um novo *primer* com um tamanho maior que o utilizado para o trabalho (171pb) para a confirmação desse resultado.

## **7.5 Polimorfismo *versus* Mutação**

Houve em vários momentos no desenvolvimento da dissertação, a dúvida se essas variações observadas em TLR-2 se tratava de mutação ou de polimorfismo, uma vez que ambos são mencionados em artigos relacionados com TLR-2.

Os conceitos sobre polimorfismo são abrangentes. Quando se refere a um gene polimórfico, descreve-se um gene com muitos alelos diferentes na população. Polimorfismos em nucleotídeos únicos são comumente encontrados e são variações entre indivíduos em certas posições de nucleotídeos no genoma (ALBERTS et al., 2004). De acordo com Farah et al (2007), o termo polimorfismo é a ocorrência em uma população com dois ou mais genótipos alternativos, sendo a freqüência isolada de cada um deles maior que aquela encontrada nas mutações, podendo-se considerar na prática que a freqüência de um gene polimórfico é superior a 1%. Como, segundo Kang e Chae (2001), a freqüência de



polimorfismo encontrado foi muito superior do que 1%, pois encontraram uma frequência de polimorfismo de 22% na população de pacientes com a forma clínica virchowiana, considerou-se no estudo que tratava-se de polimorfismo e não de mutação.

Mutação, de acordo com Alberts et al (2004), é uma alteração herdável na sequência de nucleotídeos de um cromossomo. Existem vários tipos de mutação, ou seja, a mutação pontual corresponde a um único par de nucleotídeos ou uma pequena parte de um único gene alterado. A mutação por inversão, ou seja, por inversão de um segmento de um cromossomo. A mutação letal ocorre, quando há morte prematura de um organismo. A mutação por perda de função causa supressão ou diminuição na atividade do gene, geralmente recessivo, mas que mantém o funcionamento normal do organismo enquanto apresenta pelo menos uma cópia normal do gene afetado.

A mutação condicional ocorre somente em determinadas condições, por exemplo, uma mutação afetada pela temperatura. Na mutação nula, há completa perda de função, ou supressão da atividade do gene. Na deleção, um segmento é deletado do cromossomo e, na translocação, há uma quebra do segmento e este se liga com outro cromossomo. Na mutação ganho-de-função, o gene torna-se ativo em circunstâncias inapropriadas ou há um aumento da atividade do gene. Nas mutações supressoras, há uma supressão do efeito fenotípico de outra mutação. Existem dois tipos dessas mutações, ou seja, a intra-gênica que se estabelece em um gene afetado pela primeira mutação, e a extra-gênica que se estabelece em um segundo gene. Há ainda a mutação negativa dominante, onde há um bloqueio na atividade do gene, ocasionando um fenótipo de perda-de-função mesmo na presença de uma cópia normal do gene (ALBERTS et al., 2004).

O trabalho permite concluir que as alterações encontradas nas posições C2029T, C2006T e T2008G tratam-se de uma heterozigose, sugerindo que a mesma não predispõe para a doença hanseníase, como encontrado por outros autores como Kang e Chae (2001), cujo estudo sugeriu que há uma predisposição genética para a forma clínica virchowiana da hanseníase quando em casos homocigóticos com mudança de aminoácido na posição C2029T, o que pode significar que o perfil de suscetibilidade em nossa população é distinto daqueles encontrados na Índia e na Coreia, assim como o polimorfismo em na população de 87 pacientes analisados pode estar presente em outra região do gene TLR tipo 2 não demonstrada anteriormente.

## 8 CONCLUSÕES

- O trabalho foi realizado com 87 pacientes na faixa etária de 15 a 80 anos, sendo que 23 ou 26,4% não eram tratados e 64 ou 73,6% estavam em tratamento. A maioria dos pacientes (87,4%) havia contraído a hanseníase pela primeira vez, enquanto os demais (n=11) estavam sofrendo recidiva da doença. Quanto à vacinação com BCG, 67 pacientes (77,0 %) haviam sido vacinados em algum período da vida entre a infância e a adolescência, e 20 (23,0 %) nunca haviam sido vacinados.

- A resposta imune humoral avaliada pelos valores dos níveis séricos de IgG anti-PGL1 encontrados nos pacientes com hanseníase, mostrou-se compatível com suas formas clínicas, uma vez que os parâmetros encontravam-se significativamente mais elevados nos grupos com a forma clínica borderline virchowiana e virchowiana da doença quando comparados com as demais formas. Houve correlação significativa dos marcadores sorológicos com os índices baciloscópicos.

- As quatro amostras dos pacientes analisadas por SSCP apresentaram amostras de DNA com mobilidade eletroforética alterada em uma seqüência nucleotídica do domínio intra-celular dos receptores *Toll-like 2*, sugerindo hipótese de polimorfismo. Encontrou-se nas mesmas amostras um perfil de heterozigose na posição C2029T em uma seqüência nucleotídica do domínio intracelular do receptor *Toll-like* tipo 2, havendo mudança do aminoácido Arg<sub>677</sub>Trp. Um outro perfil de heterozigose também foi encontrado na posição C2006T, resultando em troca de aminoácido Pro<sub>669</sub>His. Houve heterozigose A-C na posição T2008G da amostra #82 que resultou em mudança de aminoácido glutamina para ácido aspártico. Torna-se necessário o seqüenciamento de mais amostras, pois as quatro realizadas não são suficientes para que se possa associar a suscetibilidade à hanseníase com as alterações genéticas encontradas. Entretanto as mesmas parecem sugerir que a heterozigose encontrada nessas posições não predispõem para a doença.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULAFIA, J.; VIGNALE, R.A. Leprosy: accessory immune system as effector of infectious, metabolic and immunologic reactions. **Int. J. Dermatol.** v. 40, p. 673-687, 2001.

AKDIS, C.A.; BLASER, K. Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. **Immunology.** v. 169, p.131, 2001.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature.** v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.

ARAÚJO, M.G. Hanseníase no Brasil. **Rev. Bras. Med. Trop.** v. 36, n.3, p. 373-382, 2003.

BARROS, R.P.C.; OLIVEIRA, M.L.W.R. Detecção de anticorpos específicos para o antígeno glicolípido fenólico-1 do *M. leprae* (anti PGL-1 IGM): aplicações e limitações. **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 75, p.745-753, 2000.

BEIGUELMAN, B. Genética e Hanseníase. **Ciência Saúde Coletiva.** v. 7, n. 1, p. 117-128, 2002.

BEURIA, M. K.; PARKASH, O.M.; JOSHI, B.; MOHANTY, K. K; KATOCH, K.; SENGUPTA, U. Levels of IgG Subclasses in Active and Inactive Cases in the Disease Spectrum of Leprosy. **Int. Arch. Allergy Immunol.** v. 115, n.1, p.61-6, 1998.

BOCHUD, P.Y.; HAWN, T. R.; ADEREM, A. A Toll-Like Receptor2 Polymorphism that is associate with Lepromatous Leprosy is unable to mediate mycobacterium signaling. **J. Immunol.** v. 170, p. 3451-3454, 2003.

BOCHUD, P.Y.; HAWN, T.R.; SIDDIQUI, M.R.; SAUNDERSON, P.; BRITTON, S.; ABRAHAM, I.; ARGAW, A.T.; JANER, M.; ZHAO, L.P.; KAPLAN, G.; ADEREM, A. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphism are associate with reversal reaction in leprosy. **Journal of Infect Diseases.** v. 197, n. 2, p. 253-261, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Cartas de Eliminação da Hanseníase.** Disponível : < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/carta\\_CE.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/carta_CE.pdf). Acessado em junho de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para o controle da Hanseníase.** Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. **Informe Epidemiológico. Hanseníase.** Agosto de 2008.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Saúde Brasil.** Brasília, DF, 2004).

BRITTON , D.; LOCKWOOD, W. Leprosy. **The Lancet.** v. 363, n. 9416 , p. 1209 – 1219,2004 .

BROSCH, R.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; COLE, S.T. Comparative genomics of the leprosy and tuberele bacilli. **Res. Microbiol.** v. 151, p. 135-142, 2000.

BUHRER, S.S.; SMITS, H.L.; GUSSENHOVEN, G.C.; VAN INGEN, C.W.; KLATSER, P.R. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Micobacterium leprae*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 58, p. 133-136, 1998.

CALADO, K.L.S.; VIEIRA, A.G.; DURÃES, S.; SÉKULA, S.B.; OLIVEIRA, M.L.W. Positividade sorológica antiPGL-1 em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. **An. Bras. Dermatol.** v.80, p.S301-306, 2005.

CAMPOS, S.S.L.; RAMOS, J.R.; KERR-PONTES L.R.S.; HEUKELBACH, J. Hansen Epidemiology of Leprosy in Sobral Municipality, State of Ceará-Brazil, from 1997 to 2003. **Int.** v. 30, n. 2, p. 167-173, 2005.

CHAN, J. et al. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reative nitrogen intermediates produced by activated murine macrofages. **J. Exp. Med.** v. 175, p. 1111-1122, 1992.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature.** v. 409, n. 6823, p. 1007 - 1011, 2001.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS. Disponível em: < <http://www.datasus.gov.br/idb> Acesso em 18 de novembro de 2005.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS. Disponível em: < <http://www.datasus.gov.br/idb> Acesso em 3 de outubro de 2007.

DOUGLAS, J.T.; CELLONA, R.V.; FAJARDO, T.T.; ABALOS, R.M., BALAGON, F.; KLATSER, P.R. Prospective Study of Serological Conversion as a Risk Factor for Development of Leprosy among Household Contacts. **Clin. Diagn. Labor. Immunol.** v. 11, p. 897-900, 2004.

DOYLE, S.; VAIDYA, S.; O'CONNELL, R. et al: IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. **Immunity.** v. 17, p. 251-263, 2002.

FINE, P. E.; STERNE, J. A.; PÖNNIGHAUS, J. M.; BLISS, L.; SAUI, J.; CHIHANA, A.; MUNTHALI, M. & WARNDORFF, D. K., Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **American Journal of Epidemiology**, 146: 91-102, 1997.

FOOTE, S. Mediating immunity to mycobacteria. **Nature Genetics** v.. 21, n. 4, p. 345-347, 1999.

FOSS, N. T. Aspectos Imunológicos da Hanseníase. **Medicina.** v. 30, p. 335-339, 1997.

FOSS, N.T.; OLIVEIRA, E.B.; SILVA, C.L. Correlation between TNF production, increase of plasma-C- reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to Concanavalin A during erythema nodosum leprosum. **Int. J. Lepr.** v. 61, p.218-226, 1993.

FUNASA. Guia de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: < [http: www.funasa.gov.br/pub/](http://www.funasa.gov.br/pub/). Acesso em 20 dez 2006.

GIMENEZ, M.F.; GIGLI, I.; TAUSK, F.A. Differential expression of langerhans cells in the epidermis of patients with leprosy. **B.J.D.** v. 121, n, 1, p. 19-26, 1989.

GOULART, I. M. B. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Rev. Bras. Med. Trop.** v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.

GRUENHEID, S.; GROS P. Genetic susceptibility to intracellular infections: NRAMPI, macrophage function and divalent cations transport. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 3, p. 43-48, 2000.

GRUENHEID, S.; GROS P. Genetic susceptibility to intracellular infections: NRAMPI, macrophage function and divalent cations transport. **Curr. Opin. Microbiol.** v.3, p. 43-48, 2000.

HASTINGS, R.C. **Leprosy**. Churchill Livingstone, Singapore, 1994.

HATTORI, N. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease: from mitochondrial dysfunctions to familial Parkinson's disease. **Rinsho Shinkeigaku.** v. 44, n. 4, p. 241-262, 2004.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the Genomic DNA. **Genome Research.** v.1,p.34-38, 1991.

JACOBSON, R.R.; KRAHENBUHL, J.L. Leprosy. **Lancet.** v. 353, p. 655-660, 1999.

KANG, S.M.; BEVERLY, B.; TRAN, A.C.; BRORSON, K.; SCHWARTZ, R.H.; LENARDO, M.J. Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. **Science.** v. 257, p. 1134-1138, 1992.

KANG, T. J.; YEUM, C. E.; KIM, B. C.; CHAE, G. T. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunol.** v. 112, p.674-680, 2004.

KANG, T.K.; CHAE, G.T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunology and Medical Microbiology.** v.31, p. 53-58, 2001.

KANG, T.K.; LEE, S.B.; CHAE, G.T. A polymorphism in the Toll-like receptor 2 is associated with IL-2 production from monocyte in lepromatous leprosy. **Elsevier science Ltda.** v. 20, n. 2, p. 56-62, 2002.

KASUGA, T.; CHENG, J.; MITCHELSON, K.R. Metastable Single-strand DNA Conformational Polymorphism Analysis Results in Enhanced Polymorphism Detection. **Genome Research.** v.4, p. 227-233, 1995.

KONEMAN, E.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Diagnóstico microbiológico. 5ª. Edição, São Paulo, 2001.

KRAHENBUHL, J.L.; ADAMS, L.B. Exploitation of gene knockout mice models to study the pathogenesis of leprosy. **Lepr. Rev.**, v. 71, p. S170-S175, 2000.

LEFFORD M.J., HUNEGNAW M. E SIWIK E. The value of IgM antibodies to PGL-1 in the diagnosis of leprosy. **Int. J. Lepr.**, v. 59, p. 432-440, 1991.

LOMBARDI, C.; SUÁREZ, R.E.G. Epidemiologia da hanseníase. In: TALHARI, S.;

LORENZ, E.; MIRA, J.P.; CORNISH, K.L.; ARBOUR, N.C.; SCHWARTZ, D.A. A novel Polymorphism in the Toll-like Receptor 2 Gene and Its potential Association with Staphylococcus Infection. **Infection and Immunity**. v. 68, n. 11, p. 6398-6401, 2000.

MAEDA, Y.; MUKAI, T.; SPENCER, J.; MAKINO, M. Identification of an Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. **Infection and Immunity**. v. 73, n. 5 p. 2744-2750, 2005.

MALHOTRA, D.; RELHAM, V.; REDDY, B.S.N.; BAMEZAI, RAMESH. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. **Hum. Gen.** v. 116, p. 413-415, 2005.

MOURA, S.B.; ALMEIDA, L.R.; GUERRA, J.B. et al. Toll-like receptor (TLR2, TLR4 and TLR5) gene polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in children with and without duodenal ulcer. **Microbes and Infection**. 2008, In Press.

MURRAY, H.W.; SPITALNY, G.L.; NATHAN, C.F. Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon gamma. **J. Immunol.**, v. 134, p. 1619-1622, 1985.

NAGAO AT ; TAKANO, O. ; VIEIRA, V. ; MARTINEZ, C. ; COSTA-CARVALHO, B. ; CARNEIRO-SAMPAIO, M. . Placental Transfer Of IgG And IgG Subclasses Against Escherichia Coli Purified Lps O6, O16 And O111. **Scandinavian Journal of Immunology, Norway**, v. 47, p. 609-614, 1998.

NAGAO AT ; OLIVEIRA, MARIA DE FÁTIMA ; PRATA, THERESA LÚCIA ; SANTOS, RIVANDA DA COSTA . Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 211-214, 2007.

NG, V.; ZANAZZI, G.; TIMPL, R.; TALTS J.; SALZER, J.L.; BRENNAM, P.J.; RAMBUKKANA, A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *M. leprae*. **Cell**. v. 103, p. 511-529.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global leprosy situation**. v.81, n. 32, p. 309-316, 2006.

ORITA, M.; SUZUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. **Genomics**. v.5, p. 874-879, 1989.

PAULO, R.L.M.; CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. Mecanismo de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol**. v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

PREVEDELLO, F.C.; MIRA, M.T. Leprosy: a genetic disease? **An. Bras. Dermatol**. v. 82, n. 5, p. 451-459, 2007.

RAMBUKKANA, A. *Micobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. **Curr. Opin. Immunol**. v. 16, p. 511-518, 2004.

RAMBUKKANA, A.; SALZER, J.L.; YURCHENCO, P.D.; TUOMANEN, E.I. Neural targeting of *Micobacterium leprae* mediated by the G domain of laminin alpha 2 chain. **Cell**. v. 88, p. 811-821, 1997.

RAMU, G.; SENGUPTA, U. Preliminary Trial of intervention levamisole therapy in persistently bacteriologically positive lepromatous leprosy. **Lepr. India**, 55, 64-67, 1998.

REICHENBACH, J.; ROSENZWEIG, S.; DOFFIGER, R.; DUPUIS, S.; HOLLAND, S.M.; CASANOVA, J.L. Mycobacterial diseases in primary immunodeficiencies. **Curr. Opin. Allergy Clin Immunol**. v.1, p. 503-511, 2001.

REZWAN, M.; LANÉELLE, M. A.; SANDER, P.; DAFFÉ, M. Breaking down the wall: Fractionation of mycobacteria. **Journal of Microbiological Methods**. 2006; Article in Press.

RODRIGUES, L.C.; PEREIRA, S.M.; CUNHA, S.S.; GENSER, B., ICHIARA, M.Y. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC clustered-randomised trial. **Lancet**. v. 366, p. 1290-1295, 2005.



SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2aEd., 1992.

SANTOS, A. R.; BALASSIANO, V.; OLIVEIRA, M. L.; PEREIRA, M. A.; SANTOS P. B.; SUFFYS, P. N.. Detection of Mycobacterium leprae DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. **96**,p. 1129–1133, 2001.

SCHURR, E.; ALCAIS, A.; SINGH, M.; MEHRA, N.; ABEL, L. Mycobacterial infections: PARK2 and PACRG associations in leprosy. **Tissue Antigens.** v.1, p. 231–233, 2007.

SCOLLARD, D.M.; ADAMS, L.B.; GILLIS, T.P.; KRAHENBUHL, J.L.; TRUMAN R.T.; WILLIAMS, D.L. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19, p. 339-381, 2006.

SCOLLARD, D.M.; JOYCE, M.P. Leprosy (Hansen's disease). **Elsevier science.** p. 101-106, 2003.

SKINSNES, O.K., 1973 apud TRAUTMAN, J.R.; JONH, R. A Brief History of Hansen's Disease. **Bulletin of the New York Academy of Medicine.** v. 60, n. 7, p.689-695, 1984.

SUZUKI, N.; SUZUKI, S.; DUNCAN, G.S. et al: Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signaling in mice lacking IRAK-4. **Nature.** v. 416, p. 750-756, 2002.

TADESE, A.A. et al. A geospatial risk assessment model for leprosy in Ethiopia based on environmental thermal-hydrological regime analysis **Geospat. Health.** v. 1, n. 1, p.105-13, 2006.

TAHARA, T.; ARISAWA, T.; WANG, F.; SHIBATA, T.; NAKAMURA, M.; SAKATA, M.; NAKANO, H. Toll-like receptor 2 (TLR) -196 to -174 del polymorphism in gastro-duodenal diseases in Japanese population. **Dig. Dis. Sci.** v. 53, n. 4, p. 919-924, 2008.

TAKEUCHI, O. et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. **Int. Immunol.** V.13, p. 933-940, 2001.

TALLARI, S.; NEVES, R.G. Dermatologia Tropical: Hanseníase. 3aEd. c. 2, p.5-40, 1997.

TAN, S.Y.; GRAHAM, C. Armauer Hansen (1841-1912) discover of the cause of leprosy. **Singapore Med. J.** v. 49, n. 7, p.520, 2008.

TRAUTMAN, J.R.; JONH, R. A Brief History of Hansen's Disease. Bulletin of the New York Academy of Medicine. v. 60, n. 7, p.689-695, 1984.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Toll-like receptors: key mediator of microbe detection. **Curr. Opin. Immunol.** v. 14, p. 103, 2002.

VISSA, V.D.; BRENNAN, P.J. The genome of *Micobacterium leprae* : a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biol.**, v. 2, p.1023, 2001.

WALKER, T. S. Microbiology. Philadelphia: W.B. Saunders Company, v. 9, p.190-194, 1998.

WOEHRIE, T.; DU, W.; GOETZ, A.; HSU, H.Y.; JOOS, T.O.; WEISS, M.; BAUER, U.; BRUECKNER, U.B.; SCHNEIDER M.E. **Cytokine.**, v. 41, n. 3, p. 322-329, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assembly Elimination of leprosy: resolution of the 44th World Health Assembly. Geneva,1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committe on Leprosy, Recommendations of the 7<sup>th</sup>. WHO Expert Committee on Leprosy, Tech Rep Ser 874, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Leprosy. Seventh report. World Health Organization, Geneva, 1998.

ZHU, G.; LI, C.; CAO, Z.; CORBET, E.F.; JIN, L. Toll-like receptor 2 e 4 gene polymorphism in a Chinese population with periodontitis. **Quintessense international.** v.39, n.3, p.217-226, 2008.

ZOPDEY, S.P. apud SHEPARD, C.C. Vaccination against experimental infection with *M. leprae* . **Am. J. Epidemiol.** v. 81, p. 150-163, 1965.

ZOPDEY, S.P.; BANSOD, B.S.; SHRIKHANDE, S.N.; MALDHURE, B.R.; KULKARNI, S.W. Protective effect of Bacillus Calmett-Guérin (BCG) against leprosy: A population based case-control study in Nagpur, India. **Lepr. Rev.** v. 70, p. 287-294, 1999.

## **10 ANEXOS**

# Anexo I

Comitê de Ética em Pesquisa  
Cód. CEP: 043.06.07



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE  
FONE: (85) 3366-8589 / 4011-8213 - FAX: (85) 281-4961 - E-MAIL: [cephuwc@huwc.ufc.br](mailto:cephuwc@huwc.ufc.br)

Protocolo nº: 043.06.07

Pesquisadora Responsável: Aracélia Gurgel Rodrigues

Departamento / Serviço:

Título do Projeto: “Estudo da mutação nos receptores *toll-like* tipo 2 em pacientes com hanseníase e em seus comunicantes intra-domiciliares”

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou na sessão do dia 02/07/07 o projeto de pesquisa: “**Estudo da mutação nos receptores *toll-like* tipo 2 em pacientes com hanseníase e em seus comunicantes intra-domiciliares**”, tendo como pesquisadora responsável Aracélia Gurgel Rodrigues.

Baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), o Comitê de Ética resolve classificar o referido projeto como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 02/07/08).

Fortaleza, 03 de julho de 2007.

Coordenadora do CEP-HUWC

Prof.ª Dr.ª Maria M. de Chagas Medeiros  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEPHUWC

## Anexo II



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) participar da pesquisa , **ESTUDO DO POLIMORFISMO NOS RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 2 EM PACIENTES COM HANSENÍASE E EM SEUS COMUNICANTES INTRA-DOMICILIARES**. que tem como principal objetivo estudar se há alguma diferença genética que explique o fato de algumas pessoas serem mais sensíveis do que outras ao desenvolvimento da hanseníase. Dessa forma, necessitamos coletar 10 ml de sangue em um tubo contendo anti-coagulante (para as hemácias não coagularem) que será utilizado para separar o DNA (material genético) do sr. (a). Não há benefício direto para o participante, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Nós, pesquisadores, garantimos que:

1. Os resultados serão divulgados em publicações científicas e o grupo de pesquisa não divulgará a identidade dos pacientes.
2. O paciente poderá contactar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC para apresentar recursos ou reclamações relativas ao estudo (CEP, tel 3366 8589) ou para a Responsável do Projeto (farmacêutica Aracélia Gurgel Rodrigues, 99241458).
3. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.
4. É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento à Instituição.
5. É garantido o direito de se manter atualizado sobre resultados parciais da pesquisa, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam de conhecimento dos pesquisadores.
6. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames laboratoriais. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Fortaleza, de \_\_\_\_\_ de 2008.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o estudo acima. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.



Assinatura do paciente \_\_\_\_\_  
/representante legal

Assinatura de quem aplicou o termo \_\_\_\_\_  
/responsável pelo estudo

Testemunha \_\_\_\_\_

## Anexo III

### ESTUDO DO POLIMORFISMO EM RECEPTORES *TOLL-LIKE* TIPO 2 EM PACIENTES COM HANSENÍASE E EM SEUS COMUNICANTES INTRA-DOMICILIARES

#### QUESTIONÁRIO (PACIENTES)

Local do acompanhamento terapêutico:

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Tel.: \_\_\_\_\_

Forma clínica \_\_\_\_\_ IB: \_\_\_\_\_

Quando foi diagnosticada? \_\_\_\_\_

Está em tratamento? \_\_\_\_\_

Quando iniciou? \_\_\_\_\_

Tempo de duração do tratamento \_\_\_\_\_

Já teve Hanseníase antes?

( ) Sim ( ) Não

Forma clínica \_\_\_\_\_

Achados clínicos (lesões, etc) e laboratoriais:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

1. Como foi que o sr (a) contraiu a doença? Quais sintomas o sr (a) tinha? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. Tem algum familiar que também contraiu a doença? Como foi? Que forma clínica?

Fizeram profilaxia (vacina BCG)? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3. Já foi vacinado com BCG? \_\_\_\_\_

Tem marca da vacina (caso não lembre se tomou a vacina)?

4. Já teve outras doenças, como tuberculose, hepatite, doenças autoimune ou outra?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

5. Fez teste de Mitsuda?

( ) Sim ( ) Não

## Anexo IV



Paciente com a forma tuberculóide da hanseníase (#4)



Paciente com a forma clínica boderline-tuberculóide (#38)



Paciente com a forma clínica borderline-virchowiana #16



**Anexo V**  
**DADOS DOS PACIENTES**

<b>Pacientes</b>	<b>Baciloscopia</b>	<b>Índice Baciloscópico</b>	<b>Em tratamento</b>	<b>Origem</b>	<b>Forma Clínica</b>	<b>a- PGL</b>
ABL 1P	Positiva	3,6	Sim	HUWC	MHV	1,7
MSB 2P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHT	1,1
FEP 3P	Positiva	3,6	Sim	HUWC	MHV	1,5
MFCS 4P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHT	1,0
ELO 5P	Positiva	2,2	Sim	HUWC	MHBV	2,4
RSM 6P	Positiva	2,0	Sim	HUWC	MHV	4,5
MFSM 7P	Positiva	1,0	Sim	HUWC	MHBV	0,35
JNGN 8P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHBV	1,9
MLBP 9P	Positiva	3,25	Sim	HUWC	MHBV	1,2
MJV 10P	Positiva	2,2	Sim	HUWC	MHBV	4,5
MCN 11P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	-
FML 12P	Positiva	2,0	Sim	HUWC	MHV	0,86
JAS 13P	Positiva	2,0	Sim	HUWC	MHBV	4,8
JESP 14P	Positiva	4,0	Sim	HUWC	MHV	6,9
JMS 15P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	7,0
JMV 16P	Positiva	2,5	Sim	HUWC	MHBV	3,2
EPB 17P	Positiva	2,0	Sim	HUWC	MHBT	0,84
JIMM 18P	Positiva	3,6	Sim	HUWC	MHV	5,1
AAS 19P	Positiva	0,6	Sim	HUWC	MHBV	2,1
JFS 20P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	0,69
FWNS 21P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHT	0,88
MKSO22p	Positiva	2,5	Sim	HUWC	MHV	3,2

FAN 23P	Positiva	3,25	Sim	HUWC	MHBV	3,1
LM 24P	Positiva	2,25	Sim	HUWC	MHBV	4,4
LAV 25P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHBT	0,64
BMS 26P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	0,39
FACS 27P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHT	1,0
MVB 28P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	0,37
ABS 29P	Positiva	3,6	Sim	HUWC	MHV	4,4
FAL 30P	Positiva	2,4	Sim	HUWC	MHBV	2,3
JEGA 31P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	0,46
ODM 32P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBV	4,8
JIS 33P	Positiva	3,0	Sim	HUWC	MHV	5,7
MLFG 34P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	2,7
PSP 35P	Positiva	1,8	Sim	HUWC	MHV	2,5
FDBS 36P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHV	2,8
MTB 37P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	0,67
ESMF 38P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHT	-
JAE 39P	Positiva	0,4	Não	HUWC	MHBV	4,5
NMC 40P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHBT	0,51
JRM 41P	Positiva	3,6	Sim	HUWC	MHV	4,2
HGO 42P	Positiva	2,5	Sim	HUWC	MHV	1,4
AGS 43P	Negativa	0,0	Sim	Maracanaú	MHBT	1,4
MLL 44P	Negativa	0,0	Não	Maracanaú	MHT	-
JFR 45P	Negativa	0,0	Sim	Maracanaú	MHT	0,45

MGBS 46P	Positiva	0,5	Não	Maracanaú	MHV	0,80
PAV 47P	Negativa	0,0	Sim	Maracanaú	MHT	0,66
JAS 48P	Negativa	0,0	Sim	Maracanaú	MHT	0,38
AAP 49P	Positiva	NC	Sim	Maracanaú	MHV	4,2
MRR 50P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHT	0,41
FJB 51P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHT	2,9
AET 52P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHT	0,38
FACF 53P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHT	0,14
PAC 54P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHT	2,7
JOF 55P	Positiva	3,6	Sim	HUWC	MHV	5,7
AF 56P	Negativa	0,0	Sim	Maracanaú	MHT	1,1
NOT 57P	Positiva	NC	Sim	Maracanaú	MHV	0,38
LFO 58P	Negativa	0,0	Sim	Maracanaú	MHBT	0,63
ACMP 59P	Positiva	4,4	Sim	Maracanaú	MHV	0,77
GHTP 60P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHBT	0,47
MLCA 61P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	0,22
RAS 62P	Positiva	2,0	Sim	HUWC	MHBV	0,48
FHOS 63P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBV	1,9
MLSF 64P	Positiva	1,0	Sim	HUWC	MHBV	1,1
LSS 65P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHT	0,84
LMLS 66P	Positiva	0,0	Sim	Maracanaú	MHBT	1,1
CMV67P	Positiva	NC	Sim	Maracanaú	MHBV	-
VVS 68P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHT	0,70
JSB 69P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHBT	0,77
ACNA	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHBT	0,28

70P						
FSA 71P	Positiva	2,5	Não	HUWC	MHV	3,9
FTMS 72P	Positiva	1,0	Sim	HUWC	MHV	0,40
NMNF 73P	Positiva	3,0	Sim	HUWC	MHV	0,33
MEBA 74P	Positiva	2,0	Não	HUWC	MHBV	0,56
MMO 75P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHT	0,21
ACAR 76P	Positiva	3,6	Não	HUWC	MHV	2,1
ACAS 77P	Positiva	1,0	Não	HUWC	MHV	6,0
MAS 78P	Positiva	3,0	Sim	HUWC	MHV	0,27
AGM 79P	Positiva	0,75	Sim	HUWC	MHV	0,31
TJSF 80P	Negativa	0,0	Não	HUWC	MHT	0,45
FIBC 81P	Positiva	1,0	Não	HUWC	MHV	0,63
FAFS 82P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHT	1,9
FCM 83P	Positiva	4,6	Não	HUWC	MHV	4,0
JRM 84P	Positiva	3,6	Sim	HUWC	MHV	4,3
JAC 85P	Positiva	3,6	Não	HUWC	MHV	6,5
JMC 86P	Positiva	6,0	Não	HUWC	MHV	4,6
MJLP87P	Negativa	0,0	Sim	HUWC	MHT	0,57

## **11 PUBLICAÇÃO**



Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Farmácia  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Fortaleza, 10<sup>th</sup> July de 2009.  
To editor of the  
Lancet Infectious Diseases  
John McConnell

Dear sir,

Please find enclosed the manuscript entitled **Leprosy patient and familial contacts follow-up: Importance of serology versus molecular genotyping** (Rodrigues, AG et al.) submitted for your appreciation.

Sincerely,

**Aracélia Gurgel Rodrigues**  
**Paula Brito e Cabral**  
**Kaila Barroso Andrade Medeiros**  
**Thalles Barbosa Grangeiro**  
**Marina Duarte Pinto Lobo**  
**Sílvia Helena Barem Rabenhorst**  
**Thereza Lúcia Prata de Almeida**  
**Aparecida Tiemi Nagao-Dias**

## CASE REPORT

### **Leprosy patient and family contact follow-up: Importance of serology versus molecular genotyping.**

Rodrigues, A.G.<sup>1</sup>, Paula Brito e Cabral<sup>2</sup>, Kaila Barroso Andrade Medeiros<sup>3</sup>, Thalles Barbosa Grangeiro<sup>4</sup>, Marina Duarte Pinto Lobo<sup>5</sup>, Sílvia Helena Barem Rabenhorst<sup>6</sup>, Thereza Lúcia Prata de Almeida<sup>7</sup>, Aparecida Tiemi Nagao-Dias<sup>8</sup>.

<sup>1</sup> Pharmaceuticals, M.Sc. in Medical Microbiology, University Federal Ceará (UFC); <sup>2</sup> Pharmaceuticals, Laboratory of Immunology, Department of Clinical and Toxicological Analysis, UFC; <sup>3</sup> Academic Medicine, UFC, <sup>4</sup> Associate Professor of Molecular Genetics, UFC, <sup>5</sup> Academic Biology, UFC, <sup>6</sup> Associate Professor of Genetics, Department of Pathology and Legal Medicine, UFC, <sup>7</sup> Dermatologist of the University Hospital Walter Cantídio, UFC, <sup>8</sup> Associate Professor of Immunology, Department of Clinical and Toxicological Analysis, UFC.

<sup>1</sup> Rodrigues, A.G. Universidade Federal do Ceará-Brasil. Departamento de Patologia e Medicina Legal. Mestre em Microbiologia Médica. Rua Capitão Francisco Pedro, 1210. CEP 60430-370. Fortaleza, Ceará, Brazil. Fax:055-85-33668591 Tel: 055-85-33668591 email: [aragurgel@gmail.com](mailto:aragurgel@gmail.com)

## **ABSTRACT**

*M. leprae* is the aetiological agent of leprosy, which preferentially infects the skin and nerves. The number of cases reported annually in the world varies from 500 to 700 thousand. Brazil has the second highest number of cases, after only India. In Brazil, the state of Ceara had the ninth most cases and the fourth most in the Northeastern region in 2007. The multibacillar form of leprosy is associated high levels of anti-PGL1, reflecting the humoral immune response. On the other hand, low or absent levels of these antibodies are found in the paucibacillar form of the disease. In the present study we measured salivary and serum anti-PGL 1 antibodies and searched for polymorphism of the Toll-like 2 receptor in the family of a patient who had been diagnosed with the borderline tuberculoid form of leprosy and had presented no response to BCG vaccine. The father's patient had high levels of serum anti-PGL1 IgG and one brother had high levels of salivary anti-PGL antibodies (when measured in 2007 and 2008). The TLR2 polymorphism analysis showed the presence of the polymorphisms in heterozygosis at the position 2006 (CT) and at the positions 2029 (CT),

both in the highly conserved region of the amino acids 692 and 677 respectively. All the family members studied also showed the C>T alteration. These factors together should be used for epidemiological surveillance of groups at risk of developing leprosy

**Key words: Leprosy, anti-PGL1, polymorphism, Toll like receptor 2**



## Introduction

Leprosy is an infectious disease which is endemic in various developing countries, including Brazil. The number of cases reported annually in the world varies from 500 to 700 thousand. Brazil has the second most cases in the world, following India <sup>1</sup>. In 2007, the state of Ceará had the ninth most cases Brazil and the fourth most in the Northeastern region. According to the epidemiological report of the secretary of health of Ceara State, there were 2,513 new cases diagnosed that year, a detection rate of 30 per 100,000 inhabitants <sup>2</sup>. The control strategies consist of early diagnosis and multidrug therapy. However, it seems these efforts are not reducing the transmission rate.

The main source of leprosy transmission is the prolonged contact with untreated multibacillary leprosy patients <sup>3</sup> or among subclinically infected people living in an endemic region <sup>4</sup>. In these individuals, high titers of antibodies against *M.leprae*-specific phenolic glycolipid-I (PGL-I) can be detected, which reflects the activation of humoral immune response and high bacterial load. The diagnostic sensitivity of the test is considered to be 80 to 90% for the multibacillar (MB) form and 30 to 60% for the paucibacillar (PB) form, and its diagnostic specificity is 98% <sup>5</sup>. Studies of seroprevalence among people in contact with leprosy patients have shown varied results. Some studies have found increased seroprevalence among contacts and others have not <sup>3</sup>.

The receptor Toll-like 2 (TLR-2) seems to have an important function in the immune response against micobacterial products, including *M. leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* <sup>6</sup>. While the immune response to *M. leprae* depends basically upon the TLR-2, the immune response to *M. tuberculosis* can occur through the interaction with TLR-2 or TLR-4. The TLR-2, one of the 11 members of TLR <sup>7</sup>, is composed of transmembranic proteins with an extracellular domain rich in leucines and an intracellular domain (TIR) homologous to the IL-1 receptor <sup>6</sup>. This receptor is present in various cells, such as phagocytes, and they are important for the interaction between *M. leprae* and the host cells, since it drives the immune response by inducing pro-inflammatory cytokine production <sup>7</sup>.

A person's immune response depends on various environmental factors, such as bacterial load, housing conditions, nutritional state and intrinsic factors of the host, such as genetic predisposition favoring to a certain type of immune response <sup>8</sup>. One of the genetic factors in focus in recent years is TLR-2 polymorphism. Same studies had been demonstrated that an intracellular TLR-2 domain polymorphism at the C2029T position, with an amino acid change (Arg677Trp) is associated with susceptibility to the lepromatous leprosy <sup>9</sup>.

In the present work, the levels of anti-PGL1 serum IgG and salivary IgA and IgM and the occurrence of TLR2 polymorphism were evaluated in blood samples from a patient who presented the borderline tuberculoid form of leprosy and no response to BCG vaccine, as well as from her family contacts.

## **Material and methods**

### **Clinical evaluation of the patient**

The patient was a female, 27 years old (#ESMF, P1), diagnosed with the borderline tuberculoid form of leprosy. At the time of diagnosis, she had a hypochromic anesthetic lesion in one of the lower limbs and paresthesy of the contralateral pododactillus. The lymph bacilloscopy and biopsy were negative, and the Mitsuda test diameter was 3 mm. The family members living in the same house were two brothers (C1.1 and C1.4), one sister (C1.2), her mother (C1.6) and father (C1.7) (Fig.1). They presented BCG scars except for P1, C1.1 and C1.7. The study was approved by the Ethics Committee of Ceará Federal University (Protocol 283/05) on November 18, 2005, and by the Ethical Committee of the university's Walter Cantídio Hospital (Protocol 043.06.07) on July 2, 2007.

### **Samples**

Peripheral blood samples were collected with anti-coagulant for DNA extraction, and without coagulant to obtain serum. Saliva samples were collected without stimulation and maintained at -20° C until analysis. The saliva and blood to obtain serum were collected from the family members during two home visits, one in 2007 and the other in 2008.

### **Salivary and serum anti PGL-1titers**

The procedure for anti-PGL1 titration was done according to the protocol described earlier <sup>10</sup>. Polystyrene plates (Costar, USA) were adsorbed with 10 mg/L de PGL-1 in absolute ethanol (kindly donated by Dr. John Spencer, Colorado State University, USA). After incubation for 18 h, the plates were blocked with 3% serum albumin bovine-phosphate buffered saline (PBS) for 2 h at room temperature. For serum testing, the plates were incubated with the samples diluted to 1:50 in 3% BSA-PBS during 18 h at 4 °C. After the plates were washed, the conjugate peroxidase-anti IgG (Sigma, USA), diluted to 1:1000, was added to the wells and left at room temperature for 1h 30min. The plates were then incubated for 30 min with 100 µL of substrate solution (0.4 mg ortophenyldiamine/ml citrate-

phosphate buffer 0.01M, pH 5.0 containing 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> final concentration). The reaction was stopped by adding 25 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N. The absorbance readings were performed at 492 nm. The results were expressed by the formula: test sample absorbance divided by a pool of normal human serum. Results for serum anti-PGL1 IgG were considered negative below 1.0; positive when the values were greater than or equal to 1.3 and indeterminate between 1.1-1.2. For the salivary anti-PGL1 antibody measurement, after blocking, the PGL-1-adsorbed plates were incubated with saliva samples diluted to 1:50 in 3% BSA-Tris buffered saline (BSA-TBS) during 18 h at 4 °C. After washing, the conjugate alkaline phosphatase-anti IgA or anti-IgM (Sigma, USA), diluted to 1:1000, was added to the wells and left at room temperature for 1h 30min. After another washing, the plates were incubated for 100 min with 100 µL of substrate solution (1mg/ml nitrophenylphosphate in 10% dietanolamine containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH9.8). The results were expressed in absorbance values. Salivary anti-PGL1 antibodies levels were considered negative below 0.45; positive when the absorbance values were greater than or equal to 0.5, and indeterminate between 0.46 and 0.49.

### **DNA extraction and PCR from the peripheral blood mononuclear cells**

High molecular weight DNA was extracted from peripheral blood, soon after collection, using the salting out method <sup>11</sup>. Agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining was performed to ensure the quality of the DNA samples .

### **Nucleotide sequence amplification of a TLR-2 conserved region**

Oligonucleotide primers for the in vitro amplification of a conserved segment within the coding region of the intracellular domain of TLR-2 (GenBank accession number U88878) were manufactured according to the sequences (Table 1) suggested by Kang & Chae (2001) <sup>9</sup>.

Primer	Sequence	Position	Length (pb)
TLR2-1F	5'-ACCTTATGGTCCAGGAGCTG-3'	1969-1988	171
TLR2-1R	5'-TGCACCACTCACTCTTCACA-3'	2120-2139	

Table1: Oligonucleotide primer sequences used in the amplification of a conserved region of TLR-2

PCR was performed in 20 $\mu$ L final volume, containing 8 $\mu$ L of sterilized water with 10% serum bovine albumin, 10 $\mu$ L of Master Mix (Promega, USA) (containing MgCl<sub>2</sub>, KCl, dNTP, Taq polimerase), 12.5 pmol of each primer. The DNA amplification comprised an initial denaturation step at 94 °C for 5min, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C (denaturation), 45 s at 65 °C (annealing) and 1 min at 72 °C (extension). After the last cycle the samples were further incubated at 72 °C for 10 min. An aliquot of the final amplicons was evaluated by 1.5% agarose gel electrophoresis and the DNA bands were stained with ethidium bromide.

### **Polymorphism evaluation of TLR-2**

The TLR-2 polymorphism was evaluated by the single-strand conformational polymorphism (SSCP) technique, as suggested by Kang & Chae (2001)<sup>9</sup>. Briefly, 3 $\mu$ L of formamide was added to 7  $\mu$ L of PCR products, and from this mixture, 5  $\mu$ L was applied to a 12% SSCP polyacrylamide gel (Amersham Biosciences, Sweden) and submitted to electrophoresis in the SSCP apparatus (Pharmacia, Biotech - GenePhor), according to the protocol supplied by the manufacturer. The electrophoresis was done at 40 V, for approximately 13 h. The DNA bands were then stained with silver nitrate (Amersham Biosciences, Sweden).

### **DNA sequencing and analysis**

To determine the sequences of the amplified fragments, the PCR products were first purified with the GFX PCR DNA and the Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The concentration of the purified PCR products was determined by measuring the absorbance at 260 nm ( $A_{260}$ ) in the tenfold diluted sample. The DNA sequencing was performed with the DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare), following the protocol supplied by the manufacturer. The reactions were carried out in 10  $\mu$ L total volume containing 20 ng of purified PCR products and both strands were sequenced using the same primers described before. The sequencing reactions were then analyzed in a MegaBACE 1000 DNA Sequencing System (GE Healthcare). The samples were injected at 3 kV for 50 s and the runs were performed at 6 kV for 180 min. Automated base-

calling was performed using Cimarron 3.12 software and the electropherograms were visualized with Sequence Analyzer v3.0 (Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA, USA). Base sequences were then deduced by inspection of each processed data trace.

## Results and Discussion

It is known that the presence of anti-PGL1 in peripheral blood corresponds to the humoral immune response, and that the highest titers are found among patients with the multibacillar form of the disease<sup>12</sup>. The isotype IgG, was determined in the present work, by the fact that serum IgM can result in false positive results, as found for other infectious diseases, such as Chagas disease, toxoplasmosis and dengue<sup>13</sup>. The patient's father (C1.7) was the only family member who tested positive for anti- serum PGL1 IgG in 2007. The same occurred in 2008 (Fig.2). Our previous results showed that serum anti-PGL1 IgG was only present in leprosy patients, mainly those with the borderline to lepromatous forms of the disease<sup>10</sup>. According to Douglas et al. (2004)<sup>14</sup>, an individual with positive serum anti-PGL1 has 7.5 times more risk of developing the disease than an individual with negative serology. Her father agreed to be examined, but he did not show any lesions at the time he was examined.

In respect to the salivary anti-PGL1 titers, the patient (#ESMF) showed negative IgA and IgM antibodies in 2007. These antibodies were positive, but at low values, in 2008 (Fig.3). Two brothers presented high levels of IgM and IgA in 2007, and in one of them (C1.4), the levels of IgM became negative in 2008. Her father's salivary IgA antibodies were negative in both, 2007 and 2008, and IgM was positive in 2007 and became negative in 2008.

Except for the patient herself, one brother (C1.1.) and her father (C1.7), the other family members presented BCG scars. The patient herself manifested the disease, her father (C1.7) presented high levels of serum anti-PGL1 IgG and her brother (C1.1) had with high levels of salivary anti-PGL antibodies. According to our previous data<sup>13</sup>, positive IgA antibodies may be correlated to past or present infection and positive IgM antibodies to recent infection.

Additionally, we investigated TLR-2 polymorphism. The PCR-SSCP analysis to search for TLR2 C2029T polymorphism did not show any alteration in the migration patterns (Fig. 4). The samples showed similar patterns. Afterward, we sequenced two of them (P1 and C1.7).

Figure 5 shows the sequencing of the conserved region of TLR-2 sample from P1. All the family members showed a C>T alteration, corresponding to the Arg677Trp of the amino acid region.

The electropherogram of the patient's DNA showed heterozygous (CT). At position C2029T, co-existence was identified between basis C and T (two peaks). Another heterozygosity was found at position C2006T, in which there was substitution of the amino acid Pro<sub>669</sub>His, both found in sample P1 and C1.7. This alteration was different from that reported by Kang and Chae (2001)<sup>9</sup>, who found a change in nitrogenated bases at position C2029T only in lepromatous leprosy patients (without heterozygosity). On the other hand, Malhorta et al. (2005) found heterozygosity in both positions, which could probably be a pseudogene<sup>15</sup>.

We have demonstrated that the patient with the diagnosis of borderline tuberculoid leprosy and her family contacts presented polymorphism of the Toll like 2 receptor. We believe this event could have any association with the fact that some members of the family, including the patient herself, did not show any BCG scars. These facts together should certainly be used for epidemiological surveillance of groups at risk of developing leprosy. Future work should be done to evaluate any association with this kind of alteration and susceptibility to the develop leprosy.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

This study was partially funded by the Brazilian National Research Council (CNPq), process 472471/2007-4 and Cearense Foundation for Support to Scientific and Technological development (FUNCAP)..

#### **References**

1. BRITTON, D.; LOCKWOOD, W. 2004. Leprosy. *The Lancet*. 363: 1209-1219.
2. INFORME EPIDEMIOLÓGICO. 2008. Hanseníase. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.
3. BAKKER, M.I. ET AL. 2004., *International Journal of Epidemiology*. 1329-1336.
4. KLATSER, P.R. 1993. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 2947-2951.

5. BARROS, R.P.C.; OLIVEIRA, M.L.W. 2000. Detecção de anticorpos específicos para antígeno glicolípide-1 do *M.leprae* (anti PGL-1IgM): aplicações e limitações. *An Bras Dermatol.* 75:745-753.
6. BOCHUD, P.Y.; HAWN, T. R.; ADEREM, A. 2003. A Toll-Like Receptor2 Polymorphism that is associated with Lepromatous Leprosy is unable to mediate mycobacterium signaling. *J. Immunol.* 170: 3451-3454.
7. PAULO, R.L.M.; CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. 2004. Mecanismo de resposta imune às infecções. *An. Bras. Dermatol.* 79: 647-664.
8. KANG, T. J.; YEUM, C. E.; KIM, B. C.; CHAE, G. T. 2004. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunol.* 112:674-680.
9. KANG, T.K.; CHAE, G.T. 2001. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 31: 53-58.
10. NAGAO-DIAS, A.T.; ALMEIDA T.L.P.; OLIVEIRA, M.F., SANTOS, R.C., LIMA, A.L.P. 2007. Brasil M. Salivary anti-PGL IgM and IgA titers and serum antibody IgG titers and avidities in leprosy patients and their correlation with time of infection and antigen exposure. *Braz J Infect Dis.* 11:215-219.
11. MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. 1988. Nucleic Acid Res. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cell. 16: 1215.
12. LEFFORD M.J., HUNEGNAW M. E SIWIK E. 1991. The value of IgM antibodies to PGL-1 in the diagnosis of leprosy. *Int. J. Lepr.* 59: 432-440.
13. CABRAL, P. B. ; ALENCAR, C. P. ; ALVES, A. R. ; BRANCO NETA, E. S. C. ; MEDEIROS, K. B. A. ; Nagao-Dias AT. 2009. Emprego de marcadores séricos e salivares como parâmetros de exposição ocupacional ao *Mycobacterium leprae*. *Revista Panamericana de Infectología*, 11: 21-26.

14. DOUGLAS, J.T.; CELLONA, R.V.; FAJARDO, T.T.; ABALOS, R.M., BALAGON, F.; KLATSER, P.R. 2004. Prospective Study of Serological Conversion as a Risk Factor for Development of Leprosy among Household Contacts. Clin. Diagn. Labor. Immunol. 11: 897-900.

15. MALHOTRA, D.; RELHAM, V.; REDDY, B.S.N.; BAMEZAI, RAMESH. 2005. TLR2 Arg677Trp polymorphism in leprosy: revisited. Hum. Gen. 116: 413-415.

### **Figures:**

Figure 1: Heredogram of the leprosy patient's (#ESMF) family.

Figure 2: A follow-up titration of serum anti-PGL1 IgG (2007 and 2008). Titers of serum anti-PGL1 IgG in all family contacts of the patient (#ESMF, P1) who had been diagnosed with the borderline tuberculoid form of leprosy. The results are expressed by the formula: absorbance of test sample divided by the absorbance of a normal human serum pool. The results are considered to be positive when the values are above 1.3, with a cut-off of 1.0.

Figure 3: A follow-up titration of salivary anti-PGL1 IgA and IgM (2007 and 2008). Titers of salivary anti-PGL1 IgA and IgM in family contacts of the patient (#ESMF, P1) who had been diagnosed with the borderline tuberculoid form of leprosy. The results are expressed in

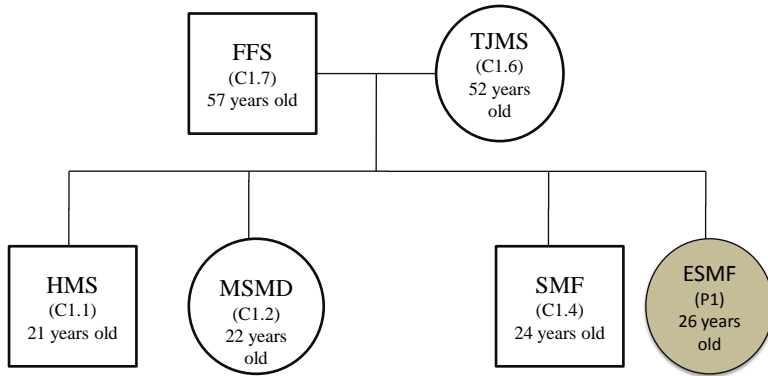


absorbance values. Salivary anti-PGL1 antibody levels are considered negative below 0.45; positive when the absorbance values are greater than or equal to 0.5, and indeterminate between 0.46 and 0.49.

Figure 4: SSCP analysis. The PCR products from a conserved segment within the coding region of the intracellular domain of TLR-2 were tested by the SSCP technique. The band shows the result from SSCP for a 171-bp PCR fragment from the family contacts of the patient (#ESMF, P1) (lanes 2 to 7). Lane 1: 100pb (molecular weight standard); Lane 2:P1; Lane 3:C1.1; Lane 4: C1.2; Lane 5:C1.4; Lane 6:C1.6; Lane 7:C1.7.

Figure 5: Gene sequencing of the TLR2 (171-bp PCR fragment of the conserved segment within the coding region of the intracellular domain of the receptor). Sequencing reactions were performed on a MegaBACE 1000 DNA Sequencing System (GE Healthcare) device, using reverse primer. Heterozygosis at position C2006T (A) and Heterozygosis at position C2029T (B).

**Figure 1:**



**Figure 2**

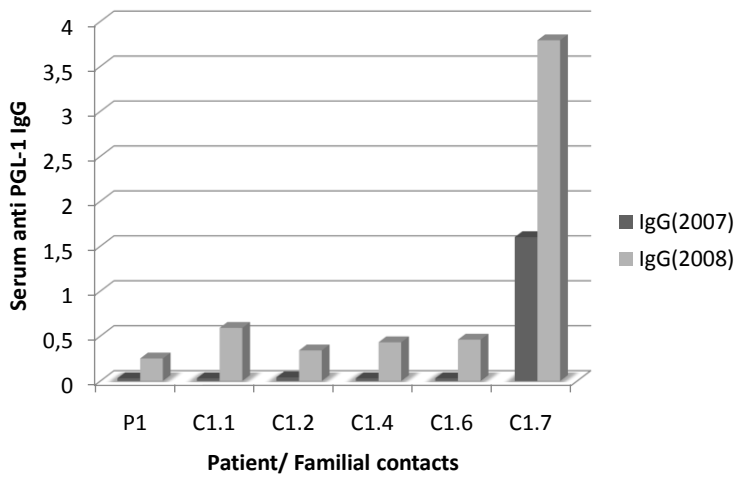


Figure 3:

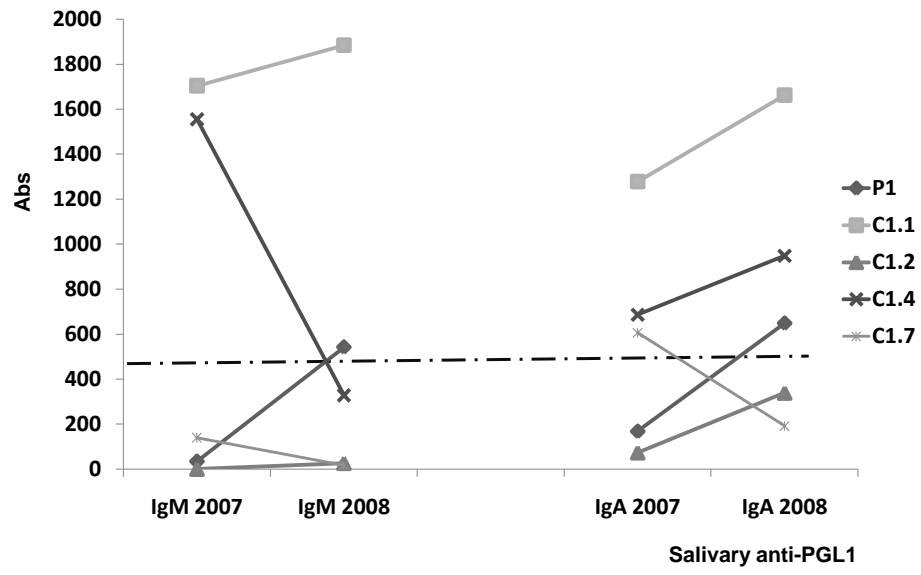


Figure 4

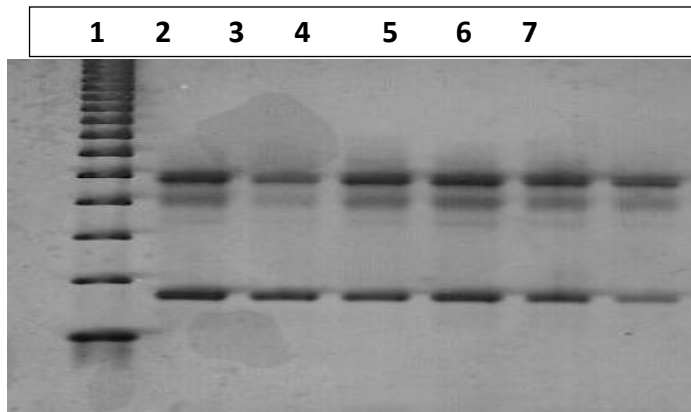
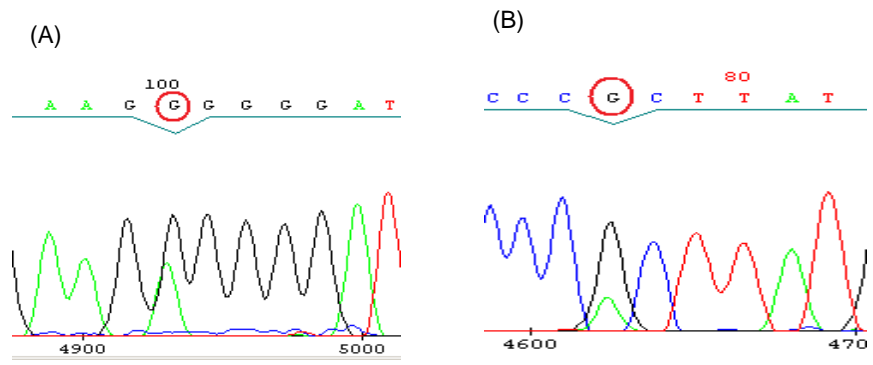


Figure 5



# 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](#)