

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

**ANÁLISE DO POLIFORMISMO A(1188)C DO GENE DA IL-12 β EM
PACIENTES COM HANSENÍASE E EM UMA AMOSTRA DE UM
GRUPO CONTROLE DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARÁ.**

RENATO MALHEIROS PEREIRA

Belém - Pará

2006

RENATO MALHEIROS PEREIRA

ANÁLISE DO POLIFORMISMO A(1188)C DO GENE DA IL-12 β EM
PACIENTES COM HANSENÍASE E EM UMA AMOSTRA DE UM
GRUPO CONTROLE DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARÁ.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção do grau em
Medicina pela Universidade Federal do
Pará.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel
Batista dos Santos

Belém-Pará

2006

RENATO MALHEIROS PEREIRA

**ANÁLISE DO POLIFORMISMO A(1188)C DO GENE DA IL-12 β EM
PACIENTES COM HANSENÍASE E EM UMA AMOSTRA DE UM
GRUPO CONTROLE DA POPULAÇÃO DO ESTADO DO PARÁ.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista
dos Santos

BANCA EXAMINADORA.

Julgado em: ____/____/____

Conceito: _____

“Aos meus pais, meus irmãos Carol e André e a
minha namoradinha Andressa pelo amor e
dedicação”.

Renato Malheiros Pereira

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus...

À minha família que sempre acreditou em minha capacidade, me incentivando e ajudando a realizar este sonho.

À minha namoradinha, por todo seu amor, compreensão e horas de carinho.

Ao Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos, meu orientador, por ter me adotado como aluno e proporcionar a oportunidade de hoje desenvolver este trabalho.

Ao grande amigo Mateus Fuchshuber Moraes, que com sua paciência e conhecimento, ajudou-me em grandes momentos desta jornada.

Aos amigos irmãos Igor, Tarcísio, Dani, Ney, Bruno e Cleber, parceiros inseparáveis e que seguraram a barra em momentos difíceis.

Aos amigos do LGHM que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Deus abençoe a todos!

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora a fazer um novo fim”.

Chico Xavier

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*. Esta bactéria é um bacilo álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório, que infecta, preferencialmente, o interior de macrófagos e células de Schwann.

A hanseníase é endêmica principalmente em países tropicais, coincidindo com o subdesenvolvimento, onde a pobreza se configura como um importante fator de risco. Porém deve ser levado em consideração que apenas 10% das pessoas infectadas vão desenvolver a doença, devido a uma possível susceptibilidade genética ainda não esclarecida.

Neste trabalho, foi investigada a associação do polimorfismo A(1188)C no gene da IL-12 β com as diferentes formas clínicas, multibacilar (MB) e paucibacilar (PB), e com uma amostra controle, com o objetivo de verificar se existem diferenças genéticas estatisticamente significantes no que diz respeito às frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo A(1188)C.

As amostras investigadas foram compostas de 116 indivíduos portadores de hanseníase (96 indivíduos portadores da forma MB e 20 indivíduos portadores da forma PB) e 117 indivíduos sadios escolhidos aleatoriamente na população de Belém do Pará que foram considerados como grupo controle para comparação com a amostra de pacientes.

Com relação as formas genotípicas e alélicas, não foram encontradas diferenças significantes entre as formas de hanseníase MB e PB, mas quando relacionamos o grupo de pacientes com o grupo controle, os dados demonstram diferenças significativas.

Na análise de regressão logística foi encontrada associação do alelo 1188*C com a susceptibilidade a hanseníase.

Palavras-chaves: Hanseníase, gene da IL-12 β , polimorfismo A(1188)C.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an acid-fast, rod-shaped bacillus. This bacterium infects, mainly, the interior of macrophages and Schwann cells.

Leprosy is an endemic disease, observed specially in tropical countries and underdevelopment, where the poverty is configured as an important factor of risk. However it must be considered that only 10% of the infected people will develop the illness, which can be related to a possible susceptibility genetics still not clarified.

In this work, was investigated the association of polymorphism A(1188)C in the IL-12 β gene in different clinical forms, multibacillary (MB) and paucibacillary (PB), and in a control sample. The purpose was to verify if there were genetic differences statistically significant.

It was included, in this work, 116 individuals with leprosy (96 with MB form and 20 with PB form) and 117 healthy individuals, these last were chosen in a random way in the population of Belém – Pará and was considered as the control group.

It was not found significant differences between the two forms of leprosy, MB and PB. However, when it was related the group of patients with the control group, it was demonstrated significant differences.

According to logistic regression, it was found association between allele 1188*C and leprosy susceptibility.

Keys-words: Leprosy, IL-12 β gene, polymorphism A(1188)C.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	01
1.1	Objetivos	02
1.2	Objetivos Específicos	02
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	02
2.1	Histórico da Hanseníase	02
2.2	Agente Etiológico	04
2.3	Epidemiologia	05
2.4	Transmissão	06
2.5	Classificação Clínica	08
2.5.1	Hanseníase Indeterminada	09
2.5.2	Hanseníase Tuberculóide	11
2.5.3	Hanseníase Virchoviana	13
2.5.4	Hanseníase Bordeline	15
2.6	Aspectos Imunológicos da Hanseníase	17
2.6.1	Quadros Reacionais	17
2.6.2	Diagnóstico Clínico	19
2.6.3	Diagnóstico Diferencial	20
2.7	Diagnóstico Laboratorial	21
2.7.1	Reação de Mitsuda	21
2.8	Imunobiologia da Hanseníase	22
2.9	Polimorfismos Genéticos	24
2.9.1	Interleucina 12 β	25
3.	METODOLOGIA	27
3.1	A População Investigada	27
3.2	Coleta das Amostras	27
3.3	Extração de DNA	28
3.4	Condições de PCR	28
3.5	Análise de Polimorfismos por Fragmentos de Restrição (RFLP)	29

3.6	Eletroforese e Coloração pela Prata	29
3.7	Análise de Dados	30
4.	RESULTADOS	31
5.	DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 – A prevalência da hanseníase no mundo em 1998

http://www.geocities.com/hanseniasse/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos_/casos_clinicos_.html

p. 01

Ilustração 2 - Representação esquemática das classificações clínicas de Madri de Ripley e Jopling.

p.09

Ilustração 3 – Lesão Indeterminada <http://www.drauziovarella.com.br/entrevistas/hanseniasse4.asp>

p.10

Ilustração 4 - Hanseníase Indeterminada – Mácula hipocrômica com distúrbio de sensibilidade no flanco. Lesão extensa, única. A baciloscopia (linfa cutânea) nestes casos será sempre negativa.

p.10

Ilustração 5 - Hanseníase Tuberculóide com ulceração de lesões – Paciente com inúmeras placas avermelhadas (reacionais), por todo o corpo. Algumas vieram a se exulcerar devido ao intenso quadro reacional. São casos de boa evolução; entretanto deverão ficar cicatrizes atróficas nas lesões que se ulceraram.

p.12

Ilustração 6 - Hanseníase Tuberculóide Tórpido – Placa de limites precisos, com bordos micropapulosos e centro ligeiramente atrófico, toda ela com distúrbio de sensibilidade. Esta forma não é contagiosa e é de evolução benigna. Nota-se lesão satélite próxima.

p.12

Ilustração 7 - Hanseníase Tuberculóide – Placa única hipocrômica na região lombar, com distúrbio de sensibilidade. O interessante neste caso está na concomitância da Píriase Versicolor (pano branco) – lesões hipocrômicas menores de permeio.p.13

Ilustração 8 - Hanseníase Virchoviana – Infiltração maciça da face. Lóbulos auriculares bem infiltrados. Baciloscopia nestes casos sempre positiva e alta.

p.14

Ilustração 9 - Hanseníase Virchoviana.

http://www.geocities.com/hansenias/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos_/casos_clinicos_.html

p.14

Ilustração 10 – Face leonina.

http://www.geocities.com/hansenias/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos_/casos_clinicos_.html

p.15

Ilustração 11 - Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide Reacional com ulceração de lesões – Inúmeras placas reacionais, a maioria com exúlcero-ulceração, por todo o tegumento. Observa-se lesão maior (Escapular D.), onde o paciente já referia área com distúrbio de sensibilidade há anos antes do aparecimento deste surto reacional (“placa mãe”).

p.16

Ilustração 12 – Hanseníase dimorfa.

http://www.geocities.com/hansenias/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos_/casos_clinicos_.html

p.16

Ilustração 13 – Reação Reversa.

http://www.geocities.com/hansenias/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos_/casos_clinicos_.html

p.18

Ilustração 14 – Visualização do padrão de bandas por RFLP do polimorfismo A1188C do gene da Interleucina 12 α , em gel de poliacrilamida a 7%.p.29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Epidemiologia da lepra em relação ao controle. Relato de um grupo de estudo da OMS (1982). Technical Report Series 675. Genebra: OMS.

p.06

Tabela 2 – Reação de Mitsuda.

p.22

Tabela 3 - Seqüência dos iniciadores utilizados na análise laboratorial.

p.28

Tabela 4 - Distribuição das frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo A(1188)C.

p.31

LISTA DE ABREVIATURAS

LAM - lipoarabinomanana

W.H.O. – World Health Organization

PB - Paucibacilar

MB - Multibacilares

MHT - tuberculóides

MHV - virchoviana

MHD - dimorfa

MHI - indeterminada

MHDT - dimorfa tuberculóide

MHDD - dimorfa dimorfa

MHDV - dimorfa virchowiana

PQT - poliquimioterapia

IL-1 - Interleucina-1

IL-2 - Interleucina-2

IFN- γ - Interferon- γ

TNF - fator de necrose tumoral

IL-4 - Interleucina-4,

IL-5 – Interleucina-5

IL-10 - Interleucina-10.

ROI - Reativos Intermediários do Oxigênio

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

MBL - Lectina Ligadora de Manose

DA - dermatite atópica

PsV - psoríase vulgaris

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

OR - risco relativo

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença que ainda se configura como um problema grave de saúde pública no Brasil, que possui a segunda maior casuística no mundo. Em particular, o Estado do Pará é um dos que possui um alto número de casos registrados.

O mecanismo de defesa do hospedeiro consiste em resposta imune celular, porém os mecanismos na sua totalidade não estão bem esclarecidos, tampouco aqueles que determinam uma possível susceptibilidade ou resistência à infecção. A ativação eficaz da resposta imune celular parece ser um fator determinante no curso da infecção pelo *M. leprae*, e devido a isso se faz necessário avaliar fatores que possam levar a uma possível susceptibilidade à doença.

As populações da Amazônia são altamente miscigenadas do ponto de vista genético, principalmente entre três principais grupos étnicos: europeus, africanos e ameríndios. Este fato confere singularidades a estas comunidades quanto a presença de diferentes polimorfismos genéticos associados a diferentes grupos geográficos populacionais. Portanto, é importante o desenvolvimento de estudos em outras populações mundiais para que se possa, de uma maneira mais efetiva, relacionar polimorfismos genéticos com doenças, assim como a proposta do presente trabalho que pretende avaliar o polimorfismo A(1188)C como um possível fator de susceptibilidade ou resistência à hanseníase.

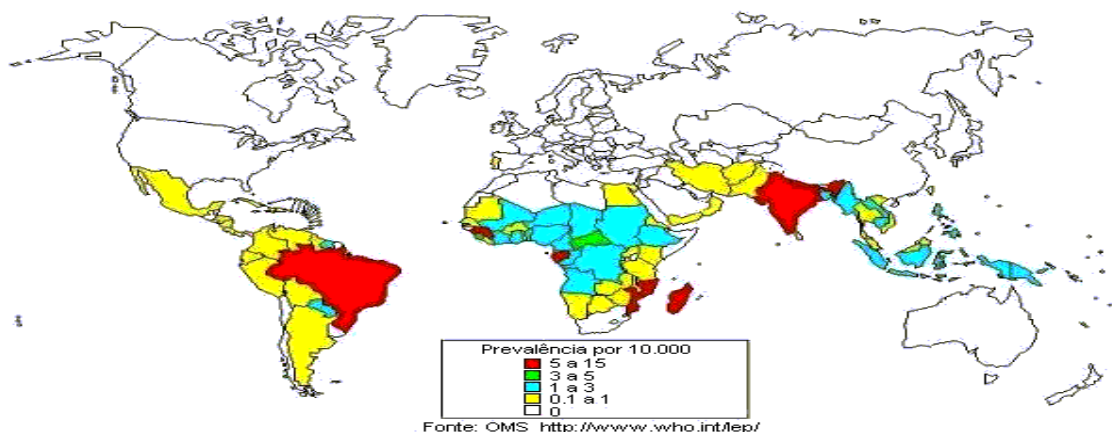


Ilustração 14 – A prevalência da Hanseníase no mundo em 1998

http://www.geocities.com/hanseniaze/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos/casos_clinicos.html

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a associação de polimorfismos genéticos no gene da Interleucina 12 β (A1188C) com diferentes formas clínicas de hanseníase e sua progressão à severidade da doença. Esta investigação desenvolverá um estudo de casos e controles com uma amostragem de 116 indivíduos portadores do bacilo do *Mycobacterium leprae* e uma amostra de 117 indivíduos representativos da população de Belém-PA (grupo controle).

1.1.2 Objetivos específicos

- Investigar a prevalência do polimorfismo A(1188)C em uma amostra de indivíduos saudáveis representativos da população do Pará.
- Investigar a prevalência do polimorfismo A(1188)C em uma amostra de indivíduos portadores de hanseníase caracterizados para as diferentes formas clínicas (paucibacilar e multibacilar) todos estes residentes no estado do Pará.
- Investigar possíveis associações do polimorfismo A(1188)C no gene da Interleucina 12 β com hanseníase.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Histórico da Hanseníase

A Hanseníase, conhecida popularmente como “lepra”, constitui-se um dos maiores males da humanidade. A doença possui teor estigmatizante que provém de referências bíblicas, em que os doentes eram considerados impuros ou sofriam castigo Divino. Os registros mais antigos de uma doença semelhante à lepra vêm da China e da Índia do século VI a.c. Na China, um discípulo de Confúcio sofria de uma doença parecida com doença lepromatosa. A Índia era considerada como lugar de origem da hanseníase, de onde datam as referências escritas mais antigas, tratados compilados a 600 a.c.. Por outro lado, nos

trabalhos de Hipócrates, “o pai da medicina”, que datam 467 a.c., não havia qualquer citação à hanseníase, sugerindo que esta doença não seria até então conhecida na Europa.

Historiadores admitem a hipótese de que as tropas de Alexandre, O Grande, após retornarem das batalhas, tenham trazido soldados contaminados das campanhas realizadas na Índia, por volta do ano 300 a.c. e que as conquistas do império romano se encarregam de disseminar a doença para as demais regiões da Europa.

Nas Américas, a hanseníase deve ter chegado com os colonizadores entre os séculos XVI e XVII. Hoje, todos os países sul-americanos apresentam hanseníase, com exceção do Chile. No Brasil, os primeiros documentos que atestam à existência de hanseníase em nosso território datam do fim do século XVII, os primeiros casos datam do ano de 1600 na cidade do Rio de Janeiro. Já nas décadas de 30 e 40 do séc. XX, com a colaboração de um plano mais abrangente e a criação do Serviço Nacional de Lepra, o controle da doença no Brasil tornou-se mais efetivo, porém não capaz de deter sua alta prevalência na região Norte, condição ainda observada nos dias atuais (TALHARI *et al.*, 1994).

O termo lepra (do grego *lepros* – descamativo) foi utilizado por muito tempo para fazer referência a doenças que apresentavam descamação na pele, incluindo doenças como psoríase, filariose, eczemas e outras dermatoses. Com o passar do tempo, várias destas doenças tiveram suas causas elucidadas e adquiriram nomenclaturas mais apropriadas. Desta forma, o termo lepra passou a ser de uso exclusivo para caracterizar a doença hoje designada hanseníase.

Palavras relacionadas à hanseníase, como lepra e leproso, adquiriram forte conotação pejorativa. Atualmente, mesmo com a introdução de tratamentos que amenizam a clínica do paciente, como a quimioterapia, ainda não foi possível eliminar o tratamento social discriminatório que um paciente com mal de Hansen recebe. Por isso, durante o VIII Congresso Internacional de Hanseníase, realizado no Rio de Janeiro em 1963, foi dado o primeiro passo para se acabar com o estigma da doença. Foram apresentados vários trabalhos que enfatizavam a reabilitação física e psicológica como pontos do tratamento da

hanseníase. O termo hanseníase foi adotado oficialmente no Brasil em 1976 e sua obrigatoriedade foi estabelecida pelo decreto da Lei Federal Nº 9.010 de 30 de março de 1995.

No Brasil a Lei Nº 610 de 13 de janeiro de 1949, decretou o isolamento dos pacientes com hanseníase. Treze anos depois, o então Primeiro Ministro Tancredo Neves instituiu o Decreto Federal Nº 968 de 07 de maio de 1962, que apesar de não revogar a Lei Nº 610, possibilitava ao paciente a sua reintrodução na sociedade.

2.2 Agente Etiológico

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae*, ou bacilo de Hansen, sendo descrita pela primeira vez em 1873, pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen. (Hansen, 1873 *apud* Opromolla *et al.*, 2000). Classificada na ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae* (RASTOGI *et al.*, 2001), a bactéria *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório, com afinidade por células cutâneas e por células dos nervos periféricos, que se instala no organismo da pessoa infectada, podendo se multiplicar, resultando em deformidades incapacitantes.

A bactéria apresenta-se sob a forma de bacilos retos ou levemente curvados, medindo de 1 a 8 micrômetros de comprimento e 0,2 a 0,4 micrômetros de largura. Quanto à forma de vida, a bactéria é intracelular obrigatória cujo crescimento (divisão celular binária) é lento (entre 12 e 14 dias) e ocorre, preferencialmente, em regiões de tecido cutâneo e nervos periféricos. (JACOBSON; KRAHENBUHL, 1999).

No meio ambiente, o *M. leprae* permanece viável por 36 horas ou por até nove dias, em condições de temperatura de 32 a 34°C e umidade relativa média de 77%. O homem é conhecido como única fonte de infecção, embora tenham sido identificados animais naturalmente infectados, como os tatus, chimpanzés e macacos mangabey. Por esta razão, tem sido considerada também como zoonose. Em 1992, Shepard conseguiu a inoculação e

o crescimento do bacilo em coxim de pata de camundongo, devido à sua temperatura mais fria, observando lesão hansênica localizada (SHEPARD, 1962 *apud* FOSS, 1999).

A visualização do *M. leprae* em microscopia de luz é realizada pela técnica de coloração Ziehl-Nielsen, onde a bactéria é corada pela fucsina ácida e não descora em presença de álcool-ácido. Devido a esta afinidade pelo corante, o bacilo é tido com álcool-ácido resistente (BAAR), podendo ser visualizado em aglomerados chamados globias. Esta característica da espécie, o agrupamento, deve-se a existência de uma substância gelatinosa chamada glêia, que se dispõe entre os bacilos, unindo-os.

Estruturalmente, o *M. leprae* apresenta uma parede celular composta de peptidoglicanos entrelaçados a cadeias polissacarídeas, que servem de suporte para os ácidos micólicos, que conferem à bactéria propriedades hidrofóbicas. Outro componente importante da parede celular é lipoarabinomanana (LAM), um glicolípido que é diferente daqueles encontrados em outras micobactérias (DRAPER *et al.*, 1983). Além da parede celular, o *M. leprae* possui uma camada mais externa denominada cápsula, que possui grande quantidade de componentes lipídicos, dentre eles o PDIM (Fitoceryl Dimycocerosato), quimicamente distinta da cápsula de outras bactérias e o PGL-1 (Glicolípido Fenólico – 1). Este último componente lipídico, aparentemente único para a referida bactéria, representa um fator determinante para a especificidade da resposta humoral durante o processo de infecção (HUNTER *et al.*, 1983). O PGL-1 também pode reagir com radicais livres, protegendo o bacilo da ação de enzimas lisossomais e metabólitos oxidativos, gerados por macrófagos durante a infecção (NEILL; KLEBANOFF, 1988).

2.3 Epidemiologia

A hanseníase é mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais, mas também ocorre como uma doença endêmica, embora menos comum em regiões temperadas. A estimativa oficial mais recente totaliza 11,5 milhões de casos no mundo, com pelo menos 5.300.000 casos registrados. (Tabela 01).

No Brasil, em 1993, a Região Norte apresentou o maior coeficiente regional de prevalência em torno de 28,05/10.000 habitantes, seguido do Centro-Oeste com 27,75/10.000 habitantes. (TALHARI *et al.*, 1994).

Tabela 3 - Epidemiologia da lepra em relação ao controle. Relato de um grupo de estudo da OMS (1982). Technical Report Series 675. Genebra: OMS.

Região da OMS (mil)	Ano	Nº de casos
África	1985	3500
América	1975	400
Sudeste Asiático	1981	5350
Europa	1975	25
Mediterrâneo Oriental	1981	250
Pacífico Ocidental	1975	2000
Total		11525

A Organização Mundial de Saúde determinou que a hanseníase devesse ser eliminada como problema de saúde pública até o ano 2000. Isto significaria que a prevalência da doença em todos os países deveria ser menor que um caso a cada dez mil habitantes. Embora alguns países tenham cumprido esta meta, os dados mostram que a hanseníase ainda é um grave problema nos países subdesenvolvidos, principalmente aqueles de clima tropical. Até recentemente, ainda achava-se que a hanseníase poderia ser totalmente eliminada como problema de saúde pública até o ano de 2005 (W.H.O., 2004).

No Estado do Pará, a taxa de prevalência da hanseníase está numa faixa de 14,10 casos por cada 10.000 habitantes, enquanto que a taxa de detecção de novos casos está em torno de 9,13 casos por cada 10.000 habitantes. Estes dados indicam que no período de 1992 a 2004, houve um aumento de 155% no coeficiente de detecção de novos casos e uma redução de 48% no coeficiente de prevalência da hanseníase no Estado do Pará. (Secretaria Executiva de Saúde Pública – Pará, 2004).

2.4 Transmissão

A transmissão ocorre do contato homem a homem, na maioria das vezes por contato íntimo, mas admite-se a possibilidade de transmissão por contato não-íntimo prolongado. Os bacilos são eliminados do corpo humano, principalmente, pelas vias aéreas superiores e pelas secreções oronasais. Menciona-se a eliminação através de feridas ulceradas na pele, leite materno, urina e fezes; entretanto a quantidade de bacilos não seria capaz de provocar infecção. A transmissão através de vetores animados (moscas) ou objetos contaminados é pouco provável. (TALHARI *et al.*, p.491).

O aparecimento da doença, na pessoa infectada pelo bacilo e suas diferentes manifestações clínicas, depende de fatores como a relação entre parasita e o hospedeiro, podendo ocorrer após um longo período de incubação de 2 a 7 anos. Outros fatores relacionados ao nível de endemia são às condições socioeconômicas desfavoráveis, assim como condições precárias de vida e de saúde e o elevado número de pessoas convivendo em um mesmo ambiente, influenciam no risco de adoecer. A distribuição da hanseníase entre famílias e comunidades com antecedentes genéticos comuns, sugere que estes podem estar relacionados à suscetibilidade a doença. (VAN BEERS *et al.*, 1996; VISSCHEDIJK *et al.* 2000; BEIGUELMAN, 2002).

É importante considerar a interação de fatores genéticos e ambientais para que se possa ter um panorama bem mais próximo da realidade no que diz respeito à epidemiologia da hanseníase. Os dados estatísticos mostram que, em média, 90% da população mundial é resistente à infecção pelo *M. leprae*, mas muito pouco é conhecido à respeito das causas que induzem a esta resistência. (FOSS, 1999).

O grupo de pessoas que apresenta resistência ao bacilo constitui a forma clínica Paucibacilar (PB). O número de bacilos em paucibacilares é insuficiente para infectar

outras pessoas, por isso não são importantes fontes de transmissão da doença, em alguns casos os pacientes podem se curar espontaneamente.

Os indivíduos que não apresentam resistência ao bacilo, que se multiplica no organismo passando a ser eliminado para o meio exterior, são classificados como Multibacilares (MB), os quais são fonte de infecção e manutenção da doença.

Depois de infectado, a forma clínica que se desenvolverá será determinada pelo modo que as células de defesa responderão à doença. Os bacilos da hanseníase têm predileção pelo tecido neural e, qualquer que seja a rota de entrada para os nervos, o órgão alvo é a célula de Schwann. Uma vez que os bacilos foram englobados pela célula de Schwann, seu destino subsequente e o tipo de clínica que se seguirá dependerão da resistência do indivíduo infectado. (JOPLING E MCDOUGALL,1991).

Os nervos invadidos pelos bacilos da hanseníase podem ser dérmicos (cutâneos) ou troncos nervosos, sendo que as regiões mais vulneráveis são aquelas em que os nervos são mais frios e onde estão mais sujeitos a traumatismos. Muitas vezes estes dois fatores coincidem. (JOPLING E MCDOUGALL,1991).

2.5 Classificação Clínica

Em 1953, no Congresso Internacional de Leprologia de Madri, foi proposta uma classificação para a hanseníase, onde as formas tuberculóides (MHT), a clínica mais branda da doença, e virchoviana (MHV), com a clínica mais severa, foram classificadas como estáveis e as formas dimorfa (MHD) e indeterminada (MHI), níveis de variações clínicas entre as formas estáveis, foram definidas clinicamente como instáveis. (TALHARI;NEVES, 1997).

Em 1996, Ridley & Jopling propuseram uma outra classificação baseada no padrão imunológico, denominada de: i) espectral, onde os pólos estáveis permaneciam, porém a

forma clínica MHD era subdividida de acordo com a tendência clínica de um dos pólos, em dimorfa tuberculóide (MHDT), dimorfa dimorfa (MHDD) e dimorfa virchoviana (MHDV).

Em 1982, a OMS simplificou a classificação da hanseníase com a introdução da poliquimioterapia (PQT). A partir desse momento, os casos de MHD e MHV passaram a ser classificados como multibacilares e os casos de MHI e MHT como paucibacilares. Atualmente o principal critério de classificação é o número de lesões, onde o paciente que apresenta o maior número de lesões é classificado como multibacilar e o paciente com cinco lesões ou menos, é classificado como paucibacilar. (WHO, 2000).

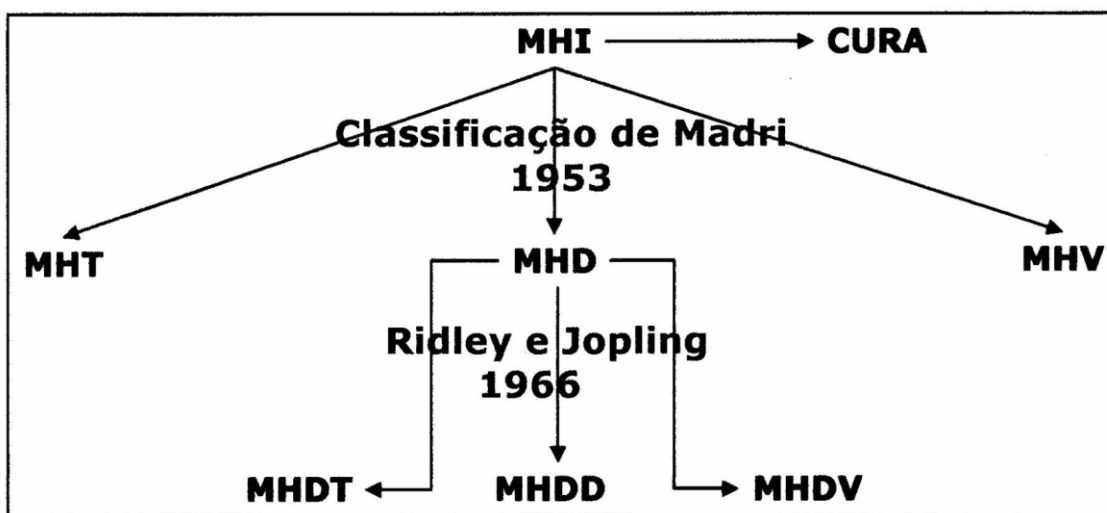


Ilustração 15 representação esquemática das classificações clínicas de Madri de Ripley e Jopling.

2.5.1 Hanseníase Indeterminada (MHI)

Considerada como a forma inicial e transitória da doença, caracteriza-se, principalmente, pela presença de manchas hipocrômicas, com limites imprecisos. Alguns pacientes podem apresentar somente áreas com distúrbios de sensibilidade, sem alteração da cor da pele. É usualmente detectada em crianças. Só será considerado portador de hanseníase, aqueles pacientes que apresentarem infiltração celular em algum nervo cutâneo ou a presença ou mais bacilos de Hansen dentro de um nervo dérmico, na zona subepidérmica ou nos músculos eretores do pêlo. (JOPLING E MCDOUGALL,1991).

Alguns pacientes podem apresentar somente áreas com distúrbios de sensibilidade, sem alteração da cor da pele. A sensibilidade térmica é, na maioria dos casos, a única a apresentar-se alterada, estando a sensibilidade dolorosa e tátil normais. As manchas localizam-se em qualquer região do tegumento. Não ocorrem lesões neurológicas ou espessamentos nervosos. (TALHARI *et al.*, p. 494). A quantidade de lesões é importante, porque quanto menor, melhor será o prognóstico.

Essa forma de hanseníase poderá evoluir para os tipos tuberculóide ou virchoviana e vai depender do grau de imunidade do organismo do paciente, caso este não seja submetido a algum tipo de tratamento. É, portanto uma forma instável de resistência variável.



Ilustração 16 – Lesão Ideterminada

<http://www.drauziovarella.com.br/entrevistas/hanseniaze4.asp>



Ilustração 17 - Hanseníase Indeterminada – Mácula hipocrômica com distúrbio de sensibilidade no flanco. Lesão extensa e única. A baciloscopia (linfa cutânea) nestes casos será sempre negativa.

2.5.2 Hanseníase Tuberculóide (MHT)

Inicia-se com lesões cutâneas localizadas, planas e avermelhadas, mas que aumentam e desenvolvem formas irregulares com margem endurecida e elevada, similar a dermatofitose, hiperpigmentadas e centros pálidos deprimidos. Os bacilos que penetram nas células de Schwann multiplicam-se dentro delas e lentamente as destroem. Depois se disseminam para as células vizinhas causando uma infecção intraneural.

Na lesão, verifica-se a queda dos pêlos (alopecia), alteração da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil. O número de lesões é geralmente pequeno e são assimétricos quanto à distribuição. Nas áreas comprometidas ocorre a diminuição ou ausência de sudorese (hipohidrose ou anidrose). O comprometimento neurológico (neurites) provoca alterações de motricidade e troficidade. As neurites apresentam-se como espessamentos dolorosos ou não, a nível troncular ou não, a nível troncular ou terminal do segmento do nervo. Podem ser encontradas tumorações ao longo do trajeto de nervos que sofrem amolecimento (necrose caseosa) chamado de “abscesso do nervo”. (TALHARI *et al.*,

p.494). Os nervos mais comumente envolvidos são o cubital, o poplíteo externo, o tibial posterior, o auricular, o mediano, o radial e o facial. Nos nervos faciais envolvidos pode ocorrer o aparecimento do logoftalmo (incapacidade de fechar os olhos), a paralisia palpebral, com ceratite e ulceração de córnea.

A degeneração dos nervos causa anestesia e atrofia cutânea muscular, tornando o paciente suscetível a traumas nas regiões afetadas. Podem ocorrer contraturas, paralisias e auto-amputação dos dedos das mãos ou dos pés. Com o nervo cubital comprometido, ocorre a anestesia da borda cubital da mão, atrofia dos músculos interósseos e da região hipotênar, hiper-extensão das articulações metacarpofalangeanas e flexão da falange média e distal do 4º e 5º quirodátilo, originando a garra cubital. Com o comprometimento do nervo ciático poplíteo externo há amiotrofia da musculatura anterior da perna, causando o pé caído ou *peid tombant*. O mal perfurante plantar é uma das mais importantes alterações tróficas, consiste em uma lesão ulcerada que atinge planos profundos, indo até o osso.

A hanseníase tuberculóide infantil caracteriza-se pela presença de lesões papulosas, arredondadas, geralmente únicas e localizadas, de preferência em áreas expostas dos membros superiores e face, de coloração vermelho violáceo. Pode ser confundido com uma picada de inseto. Neste caso a biópsia é fundamental para se estabelecer um diagnóstico.



Ilustração 18 - Hanseníase Tuberculóide com ulceração de lesões – Paciente com inúmeras placas avermelhadas (reacionais), por todo o corpo. Algumas vieram a se exulcerar devido ao intenso quadro reacional. São casos de boa evolução; entretanto deverão ficar cicatrizes atróficas nas lesões que se ulceraram.

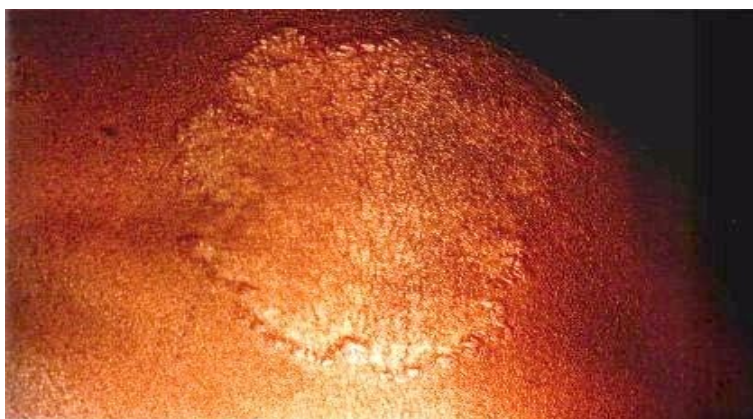


Ilustração 19 - Hanseníase Tuberculóide Tórpido – Placa de limites precisos, com bordos micropapulosos e centro ligeiramente atrófico, toda ela com distúrbio de sensibilidade. Esta forma não é contagiosa e é de evolução benigna. Nota-se lesão satélite próxima.



Ilustração 20 - Hanseníase Tuberculóide – Placa única hipocrômica na região lombar, com distúrbio de sensibilidade. O interessante neste caso está na concomitância da Pitiríase Versicolor (pano branco) – lesões hipocrômicas menores de permeio.

2.5.3 Hanseníase Virchoviana (MHV)

Na maioria dos casos, observam-se lesões eritematosas ou eritêmato-hipocrômicas e infiltrações (semelhante a inchaço decorrente da proliferação de células), numerosas, isoladas ou coalescentes, por todo o tegumento.

É comum haver infiltrações das orelhas e face. Um detalhe importante é a má delimitação das lesões – não se consegue delimitar as bordas. As lesões tendem a se unir umas as outras. Progressivamente e sem tratamento surgem pápulas (pequenos caroços com menos de 1 cm) e nódulos (lesões duras, localizadas profundamente, mas palpáveis e visíveis). Com a evolução, a face pode ficar completamente alterada, infiltrada, com perda dos sulcos normais da pele – face leonina. É comum o edema nas mãos, pernas e pés, a pele das pernas apresenta aspecto ictiósico (escamosas, secas) e as regiões palmares perdem a coloração avermelhada normal, ficando cianosadas.

As deformidades mencionadas na MHT também podem ocorrer nestes pacientes. Em geral são tardias e observadas, principalmente, em casos que ficam muitos anos sem tratamento.

Neta fórmula observa-se resposta imune celular pequena ou ausente, com exacerbação da imunidade moral. Em consequência da anergia imunológica, a reação de Mitsuda é negativa. (TALHARI *et al.*, p.495).



Ilustração 21 - Hanseníase Virchowiana – Infiltração maciça da face. Lóbulos auriculares bem infiltrados. Baciloscopia nestes casos sempre positiva e alta.



Ilustração 22 - Hanseníase Virchoviana

http://www.geocities.com/hansenias/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos/casos_clinicos.html



Ilustração 23 – Face leonina

http://www.geocities.com/hansenias/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos/casos_clinicos.html

2.5.4 Hanseníase Bordeline (MHD)

O nome Bordeline substituiu o inicial dimorfa. A palavra inglesa *bordeline* significa limítrofe. Possui três tipos: Hanseníase Dimorfa Tuberculóide (MHDT), Hanseníase Dimorfa Dimorfa (MHDD) e Hanseníase Dimorfa Virchoviana (MHDV).

Na MHDT o paciente apresenta múltiplas lesões do tipo tuberculóide. Evidências clínicas de dano neural sejam sensitivas, motoras ou ambas, costumam anteceder as lesões cutâneas em meses ou anos.

A MHDD é caracterizada por lesões com centro aparentemente poupado e infiltração difusa das bordas externas – aspecto denominado de “queijo suíço”. Associados a estas lesões estão infiltrações, placas, pápulas, tubérculos e outros aspectos clínicos encontrados na hanseníase virchoviana.

A MHDV apresenta lesões que dão a impressão de Hanseníase Virchoviana, porém a existência de algumas lesões em “queijo suíço” e placas parecidas com Hanseníase Tuberculóide, possibilitam seu diagnóstico clínico.



Ilustração 24 - Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide Reacional com ulceração de lesões – Inúmeras placas reacionais, a maioria com exúlcero-ulceração, por todo o tegumento. Observa-se lesão maior (Escapular D.), onde o paciente já referia área com distúrbio de sensibilidade há anos antes do aparecimento deste surto reacional (“placa mãe”).



Ilustração 25 – Hanseníase dimorfa

http://www.geocities.com/hansenias/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos /casos_clinicos .html

2.6 Aspectos Imunológicos da Hanseníase

2.6.1 Quadros Reacionais

O fator mais marcante da hanseníase é a variação com que a moléstia pode acometer diferentes pessoas. Em determinados momentos do período de infecção pelo *M. leprae*, podem ocorrer surtos reacionais, que se deve a exacerbação da resposta imune do hospedeiro, onde pode ocorrer dois tipos de reação, classificadas como reação reversa ou reação tipo I e eritema nodoso hansênico ou reação tipo II. (JOPLING; MAC DOUGALL, 1991).

A reação reversa é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade tipo VI, sendo causada por uma alteração drástica na resposta imune celular direcionada ao bacilo. Geralmente, o estado reacional causa danos aos tecidos e nervos periféricos, porém pode apresentar melhora quando há eliminação dos bacilos. Essa reação ocorre principalmente em pacientes acometidos por MHT, MHDT e MHDD, podendo ocorrer raramente em pacientes com MHDV.

A reação reversa é semelhante à resposta imune celular mediada por linfócitos TH1, tendo aumento de linfócitos T CD8 citotóxicos, Interleucina-1(IL-1), Interleucina-2(IL-2), Interferon- γ , fator de necrose tumoral(TNF), e diminuição de Interleucina-4, Interleucina-5 e Interleucina-10. (GOULART *et al.*, 2002).

Caracterizam por infiltração nas lesões (aumento da espessura e consistência da pele, com menor evidência de sulcos e limites imprecisos), com aspecto eritematoso, quentes e muito sensíveis, são relatadas dores a pequenos toques nas referidas áreas. Em alguns casos, as lesões podem ulcerar.

As reações nos casos tuberculóides são perigosas quando as lesões estiverem sobre troncos nervosos como os cotovelos, maléolos internos e sobrancelhas, pois estes quase sempre se tornam espessados e podem levar à paralisia.

As reações em todos os casos dimorfos são extremamente graves, existindo a possibilidade de múltiplos espessamentos nervosos, que se não tratadas podem ocorrer paralisias em um curto espaço de tempo.

A reação eritema nodoso hansênica é uma reação de hipersensibilidade mediada por anticorpos (ou seja, do tipo III), que ocorre em pacientes multibacilares. Nesta reação ocorre o aumento da população de linfócitos CD8 supressores e síntese elevada de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10. Esse mecanismo pode ser desencadeado por quimioterapia, por infecções adjacentes, estresse, vacinação ou gravidez. Nesta reação aparecem focos de inflamação aguda nos granulomas, podendo atingir os vasos da derme e tecido celular subcutâneo. (OPROMOLLA *et al.*, 2000). Possuem lesões localizadas nos membros superiores, inferiores e face. Esta reação, normalmente, cursa com febre, mal-estar e dores articulares. Em alguns casos pode ocorrer edema da bolsa escrotal, irite (olho vermelho), ulceração (vasculite), mão edemaciada e neurites graves. (TALHARI).



Ilustração 26 – Reação Reversa

http://www.geocities.com/hanseníase/Casos_Clinicos/Casos_Clinicos /casos_clinicos .html

Os portadores de hanseníase virchowiana podem formar anticorpos contra diversos elementos estruturais do organismo, tornando detectáveis a nível sérico, em baixos títulos, fatores antinucleares, fatores reumatóides, fenômeno de LE. É nesta ocasião que a hanseníase assume o caráter de doença auto-imune, podendo ser considerada como um modelo de collagenose. (TALHARI).

Os surtos reacionais ocorrem, geralmente, ao longo do tratamento, porém não são características obrigatórias da doença. Em alguns casos o paciente só desenvolve sintomas de neurite ou ainda neurites associadas às reações tipo I e II, o que está levando a se classificar as neurites como quadro reacional em hanseníase. É importante ressaltar que as neurites ocorrem tanto em pacientes de pólo tuberculóide, quanto em pacientes de pólo virchowiano e ainda em pacientes interpolares.

2.6.2 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico é realizado através do exame físico onde se procede a uma avaliação dermatoneurológica, buscando-se identificar sinais clínicos da doença. O roteiro clínico constitui-se das seguintes atividades: anamnese, em que será colhida a história clínica e epidemiológica; avaliação dermatológica, em que é identificado o tipo de lesão de pele com alteração de sensibilidade; avaliação neurológica, para a indicação de neurites, incapacidades e deformidades; diagnóstico dos estados reacionais; diagnóstico diferencial e classificação do grau de incapacidade física.

Durante a anamnese é fundamental que sejam identificadas questões como alterações na pele – manchas, placa, infiltrações, nódulos, tubérculos, e há quanto tempo eles apareceram, possíveis alterações de sensibilidade em alguma área do corpo, presença de dores nos nervos, ou fraqueza nas mãos e nos pés, se usou algum medicamento para tais problemas, e se tomou, quais foram os resultados obtidos. Na avaliação dermatológica, serão identificadas lesões e alterações de sensibilidade na pele próprias da hanseníase. Deverá ser feita a inspeção de toda a superfície corporal, no sentido crânio-caudal, seguimento por seguimento. Deverão ser realizadas pesquisas de sensibilidade nas lesões de pele encontradas; dérmica, dolorosa e tátil.

A pesquisa de sensibilidade térmica nas lesões e áreas suspeitas deverá ser realizada com dois tubos de vidro, um contendo água fria e no outro, água aquecida. Deve ser tocada a pele sã e a área suspeita com as extremidades dos tubos frio e quente, alternadamente, solicitando que o paciente identifique as sensações de frio e quente. A pesquisa de sensibilidade tátil é realizada com uma mecha fina de algodão seco. A pesquisa de sensibilidade protetora é realizada nos membros superiores e inferiores, utilizando-se a ponta de uma caneta esferográfica, com isso detecta-se a diminuição ou ausência de sensibilidade protetora do paciente.

A identificação de lesões neurológica é constituída pela inspeção dos olhos, nariz, membros superiores e inferiores. A inspeção dos olhos objetiva a verificação de ardor,

coceira, vista embarçada, ressecamento dos olhos, pálpebras pesadas, lacrimejamento e outros sintomas. Deve-se verificar a presença de nódulos, infiltração, secreção, vermelhidão, ausência de sobrancelhas, eversão, cílios invertidos, desabamento da pálpebra inferior, ou opacidade da pálpebra, alterações no contorno, tamanho, reação das pupilas e se as mesmas apresentam-se pretas ou esbranquiçadas.

2.6.3 Diagnóstico Diferencial

A hanseníase pode ser confundida com outras doenças de pele e neurológicas, que apresentam sintomas e sinais semelhantes, porém os exames laboratoriais são essenciais para diagnóstico definitivo.

As principais doenças que podem ter seus sintomas confundidos com a hanseníase são:

- Pitiríase Versicolor (pano branco);
- Eczemátide;
- Tinha do Corpo;
- Vitiligo;
- Psoríase;
- Lúpus Eritematoso Discóide;
- Lesão Sifilítica Secundária;
- Tuberculose Cutânea;
- Doença de Jorge Lobo;
- Leishmaniose Anérgica.

As lesões neurológicas com sintomas passíveis de serem confundidos com hanseníase são:

- Síndrome do Túnel do Carpo;
- Neuralgia Parestésica;
- Neuropatia Alcólica;

- Neuropatia Diabética;
- Lesões por Esforço Repetitivo (LER).

2.7 Diagnóstico Laboratorial

2.7.1 Reação de Mitsuda

Em 1919, o cientista japonês K.Mitsuda, buscando medidas que pudessem auxiliar no diagnóstico da hanseníase, realizou experimentos onde a suspensão de bacilos obtidos por hansenomas macerados, mortos pelo calor, era aplicada por via intradérmica em pacientes acometidos com hanseníase. Algum tempo após a inoculação, Mitsuda notou que os pacientes acometidos com MHT apresentavam uma reação de hipersensibilidade no local, e que os pacientes acometidos com MHV não apresentavam qualquer resposta à inoculação. Em 1933, Hayashi descreveu detalhadamente o processo de preparação da suspensão para o teste, assim como os critérios para avaliação clínica. (FOSS, 1999; OPROMOLLA *et al.*, 2000).

Outros estudos foram publicados a partir do estudo de Mitsuda e Hayashi. Em 1953, o teste de Mitsuda foi incorporado aos métodos padrão de classificação da hanseníase: pacientes com MHT, Mitsuda positivo; pacientes com MHV e a maioria dos MHD, Mitsuda negativo. Em pacientes com MHI, o teste de Mitsuda positivo poderia ser indicativo de evolução para MHT ou para cura espontânea.

Mesmo sendo a baciloscopia um dos parâmetros utilizados para a definição de caso, o diagnóstico da hanseníase é preferencialmente clínico. Não se espera os resultados da baciloscopia para iniciar o tratamento do paciente, ele deve ser iniciado imediatamente após o diagnóstico e classificação do paciente em multibacilar e paucibacilar de acordo com o número de lesões que ele apresentar na pele. Mas a biópsia e os exames laboratoriais são essenciais para determinar um diagnóstico definitivo da doença.

Tabela 4 – Reação de Mitsuda

Exames	Paucibacilar	Multibacilar
Clínico (Madri)	MHT e MHI Mitsuda positivo.	MHD,MHV e MHI Mitsuda negativo.
Imunológico	POSITIVO $\geq 5\text{mm}$ ou com ulceração.	NEGATIVO $< 5\text{mm}$ e sem ulceração.
Baciloscópio	NEGATIVO (IB = 0 em todos os esfregaços)	POSITIVO (Qualquer IB $\pm$ 0) MHI (Mitsuda negativo).
Histopatológico	COMPATÍVEL	COMPATÍVEL

2.8 Imunobiologia da Hanseníase

Do ponto de vista imunológico, o ponto de partida para diferenciar a resposta imune de pacientes resistentes e susceptíveis, foi a reação de Mitsuda, que consiste numa suspensão de bacilos, extraídos de lesões hansênicas, mortos pelo calor que era aplicada por via intradérmica. Após algum tempo, notava-se que os pacientes classificados como resistentes eram responsivos ao teste, já que no local da aplicação havia formação de uma lesão macular. Em contrapartida, o teste realizado, em pacientes mais graves, mostrava que estes eram anérgicos ao teste, sugerindo assim que os pacientes tuberculóides desenvolvem uma resposta mais eficaz à infecção pelo *M. leprae*. Atualmente sabe-se que a resposta desenvolvida pelo sistema imune contra o bacilo é a resposta imune celular.

A resposta imune é iniciada a partir do momento em que o *M. leprae* entra em contato com os macrófagos existentes nos tecidos. Estas células irão realizar a fagocitose das bactérias, na tentativa de eliminá-las por meio de mecanismos internos de oxidação,

mediados principalmente pelo TNF- α , INF- γ e Reativos Intermediários do Oxigênio (ROI) e do Nitrogênio (RNI), além da ativação de linfócitos T auxiliares CD4-. (FOSS, 1999).

Os LT CD4 ativados podem ser diferenciados de LTH1 ou LTH2, depender das citocinas envolvidas no processo de ativação. Caso as citocinas envolvidas sejam a interleucina-12 e o INF- γ , a tendência é a diferenciação em LTH1. Porém, se predominarem IL-4 e IL-10, a tendência é a diferenciação em LTH2. (MARQUET SCHURR, 2001; CASANOVA; ABEL, 2002).

Os LTH1 secretam IL-2 e INF- γ , que são citocinas inflamatórias responsáveis pela proliferação de LT CD4 auxiliares e ativação de macrófagos, respectivamente. Os LTH2 produzem, entre outras citocinas, IL-4, IL-6 e IL-10, onde a primeira e a última são supressoras de atividade macrofágica. (GOULART *et al.*, 2002). A IL-6 favorece a diferenciação de linfócitos TH2, induzindo a produção de IL-4 e inibindo a diferenciação de linfócitos TH1, interferindo na produção de INF- γ . (DIEHL; RINCÓN, 2002).

Na hanseníase paucibacilar, a modalidade de resposta predominante é medida por células LT CD4. Esta resposta é caracterizada, principalmente pela indução de linfócitos LT CD8 citotóxicos e produção de citocina LTH1, tais como IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α . (GOULART *et al.*, 2002). Este mecanismo de resposta é eficaz na eliminação do *M. leprae*, porém pode ser lesivo ao organismo, causando lesões neurais e cutâneas na ausência de fatores regulatórios. (ARAÚJO, 2003).

Nas formas multibacilares da hanseníase, a resposta imune contra o *M. leprae* é humoral. Apesar de produzir anticorpos contra os antígenos do *M. leprae*, a resposta é ineficaz para eliminação dos bacilos. Na modalidade de resposta, predominam os LT CD8 supressores e citocinas TH2, como a IL-4, IL-6 e IL-10. (GOULART *et al.*, 2002). Além disso, a produção dos antígenos PGL-1 e LAM pelo *M. leprae* no interior do macrófago favorece o escape, uma vez que estes antígenos têm a capacidade de inibir os mecanismos internos de destruição, como pro exemplo, o stress oxidativo (NEIL; KLEBANOFF, 1988) e induzir a produção de IL-10. (SIELING *et al.*, 1994).

A resistência ou suscetibilidade à hanseníase pode também estar relacionada com mecanismos imunológicos que envolvem a apresentação de antígenos pela molécula do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), o qual é geneticamente herdado. Os pacientes com MHT apresentam, em sua maioria os fenótipos HLA-DR2 e HLA-DR3, relacionados à resistência do *M. leprae*, já que os pacientes acometidos com MHV apresentam predominantemente o fenótipo HLA-DQ1, relacionados à suscetibilidade ao *M. leprae*. (DE VRIES, 1991). Visetanier *et al.* (1997) relacionaram o alelo HLA-DR2 com a forma tuberculóide da hanseníase em uma população da Região Sudeste do Brasil.

É destacável também a atuação da imunidade inata, representada principalmente pelo sistema complemento, que desempenha um papel importante, principalmente na opsonização de microorganismos patogênicos (NETH *et al.*, 2000), além de agir como ponto de interseção entre a resposta inata e específica. (FRASER, 1988).

Existem três vias principais de ativação do sistema complemento: a via clássica, a via alternativa e a via da Lectina Ligadora de Manose (MBL – Manose Binding Lectin) (FEARON, 1998).

2.9 Polimorfismos Genéticos

Os polimorfismos genéticos consistem em variações nucleotídeas na sequência de DNA (devem apresentar frequência maior ou igual a 1% dentro da população). Os polimorfismos podem acontecer tanto nas regiões codificadoras, assim como nas regiões não codificadoras de um genoma (MITCHISON, 2000).

Os polimorfismos presentes nos éxons dos genes podem levar a alterações na estrutura da proteína codificada, visto que, apesar do código genético ser degenerado, um polimorfismo pode mudar a sequência do códon e, por consequência codificar um aminoácido diferente no polipeptídeo ou produzir um códon de parada. Já os polimorfismos presentes em regiões não codificadoras, principalmente aqueles localizados nos promotores podem estar relacionados a alterações nas taxas de transcrição do gene. (MITCHISON,

2000). É importante afirmar que os polimorfismos podem promover tanto alterações de perda, quanto de ganhos de funções dos genes.

O estudo de polimorfismos em genes ligados ao sistema imune vem ganhando força devido ao fato de vários trabalhos estarem mostrando associações positivas com a suscetibilidade e/ou resistências a doenças infecciosas e auto-imunes.

Diversas moléculas estão diretamente relacionadas com a resposta imune do *M. leprae*, dentre elas a citocinas e seus receptores, que exercem funções importantes para a ativação da resposta inflamatória e específica. Em meio a esta variedade de moléculas, destaca-se a IL-12, por se apresentar como uma das moléculas chave na ativação e diferenciação da resposta imune contra o *M. leprae*.

2.9.1 Interleucina 12 β

A interleucina 12 ou p70 é uma citocina pró-inflamatória, cuja molécula é composta por duas subunidades protéicas, a IL-12 α (p35) e a IL-12 β (p40), que são modificadas por genes diferentes, em que a expressão do gene da IL-12 α depende diretamente da expressão do gene da IL-12 β (HUANG *et al.*, 2000).

Células “*Natural Killer*” e macrófagos são as principais células secretoras da Interleucina 12 que está relacionada com a ativação da resposta imune celular, pois promove a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ em LTH1 e também aumenta a expressão de interferon- γ , uma citocina pró-inflamatória que é um potente ativador de macrófagos. É importante que o paciente com hanseníase tenha uma ativação de macrófagos eficaz, pois o bacilo causador da hanseníase cresce principalmente dentro de macrófagos não ativados.

O gene da IL-12 β está localizado no braço longo do cromossomo 5, entre as posições 31 e 33 (5q31-q33) (WARRINGTON *et al.*, 1994), onde um polimorfismo de única base A(1188)C identificado na 3'-UTR (região não traduzida) (HALL *et al.*, 2000) parece estar relacionado com alterações nos níveis transcricionais deste gene. O alelo

IL121188*C parece estar relacionado a uma menor taxa de transcrição do gene em relação aos indivíduos portadores do alelo IL121188*A (MORAHAN *et al.*, 2001).

Alguns estudos têm associado o polimorfismo A(1188)C do gene IL-12 β com o desenvolvimento e progressão de doenças infecciosas como malária cerebral (MORAHAN *et al.*, 2002) e hepatite C (YIN *et al.*, 2004), além de doenças auto-imunes como dermatite atópica, psoríase (TSUNEMI *et al.*, 2002) e asma (MORAHAN *et al.*, 2002).

Tsunemi *et al* (2002) investigaram em uma população japonesa a relação entre o polimorfismo A(1188)C e o desenvolvimento de dermatite atópica (DA) e psoríase vulgaris (PsV), já que estas doenças possuem respostas imunológicas distintas, sendo a DA mediada por LTh2 e a PsV por LTh1. As distribuições genóticas dos grupos DA, PsV e controle foram comparadas entre si e foi observado que na comparação entre DA e PsV, o genótipo AA foi mais freqüente no grupo PsV (40,6%) que no grupo DA (15,2%) e os genótipos AC e CC foram mais freqüentes no grupo DA (51,2% e 33,5%) que no grupo PsV (39,2% e 20,3%), sendo estas diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,000003$). Entre os grupos DA e controle foi observado diferenças estatisticamente significantes entre as freqüências genóticas ($p = 0,041$), sendo as freqüências de AC e CC maiores no grupo DA (51,2% e 33,5%) que em controles (45% e 27%). Entre o grupo PsV e controle não foram detectadas diferenças estatísticas significantes ($p = 0,12$), porém a freqüência do genótipo AA é maior e de CC é menor em PsV que no grupo controle. Os resultados sugerem que o polimorfismo A(1188)C pode estar de fato relacionado com a susceptibilidade a DA e PsV na população japonesa.

3. METODOLOGIA

A metodologia utilizada para desenvolver o plano proposto utilizou as técnicas básicas de biologia molecular necessárias para identificação e descrição da variabilidade genética em populações humanas. Essas técnicas compreendem:

- Coleta de material biológico (sangue periférico).
- Extração de DNA de sangue total e de amostras de soro
- Quantificação e preparo do DNA para análise
- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
- Eletroforese em suporte sólido (poliacrilamida)
- Técnicas de RFLP e de detecção de tamanho de fragmentos de DNA.

3.1 A População Investigada

Este estudo foi realizado com duas amostras, sendo uma composta de 116 indivíduos não aparentados, com hanseníase, residentes na cidade de Belém do Estado do Pará, atendidos no ambulatório de dermatologia sanitária Dr. Marcello Cândia. Também foram analisados 117 indivíduos não aparentados, sadios e residentes na cidade de Belém do Estado do Pará (população controle).

Os pacientes com hanseníase foram caracterizados clinicamente de acordo com o número de lesões, sendo o paciente com mais de cinco lesões classificado com multibacilar (MB) e o paciente cinco ou menos lesões classificado como paucibacilar (PB) (WHO, 2000).

3.2 Coleta das Amostras

As amostras de sangue dos indivíduos hansenianos e população controle foram obtidas por punção venosa, em que retirou-se 5mL de sangue, através do sistema de coleta a vácuo, usando o anticoagulante EDTA. Posteriormente as amostras foram transportadas e armazenadas no Laboratório de Genética Humana e Medica da Universidade Federal do Pará.

3.3 Extração de DNA.

A extração do DNA foi realizada a partir de 300 µL de sangue total utilizando-se o método descrito por Miller *et al.* (1988), cujo protocolo é baseado em cinco etapas, a lise se hemácia por solução hipotônica, a lise de leucócitos por solução detergente (SDS), a precipitação de proteínas por uma solução de acetato de amônia a 7M, desidratação com isopropanol e etanol a 70% e rehidratação com água bidestilada livre de qualquer contaminação.

A solução final de DNA foi quantificada em espectrofotômetro e ajustada para concentração de 100 ng/µL.

3.4 Condições de PCR

A reação de PCR foi feita com um volume total de 25,0 µL (microlitros), contendo 15,75 µL de água; 2,0 µL de DNA na concentração de 100 ng/µL; 2,5 µL de tampão Buffer; 0,75 µL de MgCl₂ ; 2,0 µL de solução com dNTP (dATP: 125 µL; dCTP: 125 µL; dGTP: 125 µL; dTTP: 125 µL); 1 µL de cada iniciador (Tabela 1) e 2 Unidade de *Taq* DNA polimerase.

Cada processo de amplificação foi composto por 30 ciclos compostos de três fases: i) desnaturação do DNA (94°C) ii) hibridização dos iniciadores na cadeia do DNA (59 °C); iii) extensão da cadeia desejada (72 °C).

O fragmento amplificado apresenta 200 pares de bases.

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores utilizados na análise laboratorial

P1	5' - GGCATTCTCTTTCCAGGTTCTG – 3'
P2	5' - AGCATGAAGGCCCATGGCAAC – 3'

3.5 Análise de Polimorfismos por Fragmentos de Restrição (RFLP)

Este procedimento foi realizado utilizando-se a enzima de restrição *Taq* I (New England Biolabs), onde foi utilizado 5U da enzima por cada 10 microlitros de solução de PCR. A reação foi incubada a 65° C por 16 horas, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante da enzima.

O segmento amplificado de 200 pb quando clivado, dividi-se em dois fragmentos de 120 pb e 80 pb, caso o indivíduo apresente a mutação investigada.

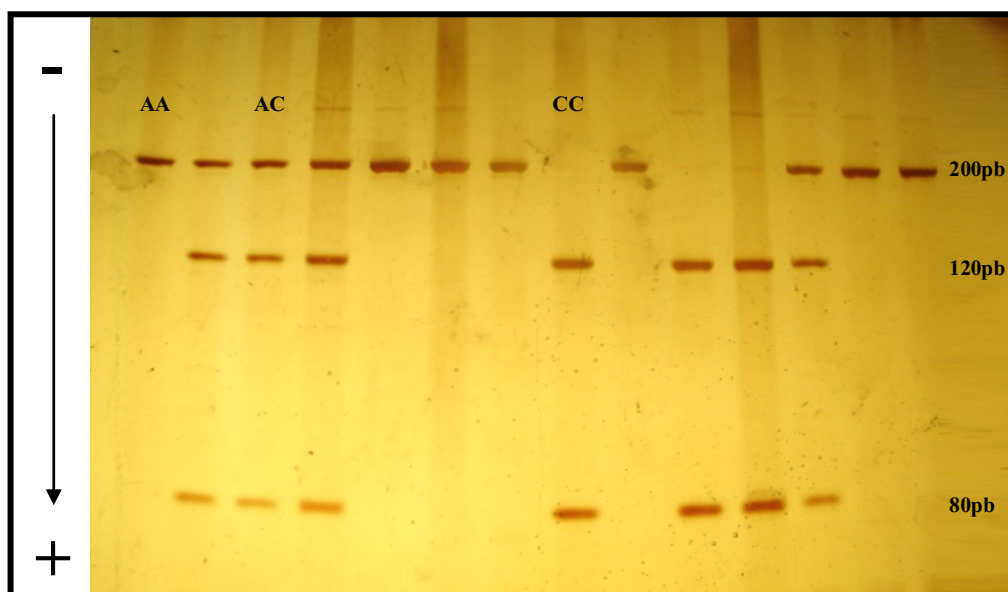


Ilustração 14 – Visualização do padrão de bandas por RFLP do polimorfismo A1188C do gene da Interleucina 12 □, em gel de poliacrilamida a 7%

3.6 Eletroforese e Coloração pela Prata

Após a realização da técnica de RFLP, as amostras amplificadas do sistema IL-12B foram misturadas à proporção de 10 µL de PCR para 5 µL de corante (0,25 % de Azul de Bromofenol, 15 % de Ficol e 74,5 % de água deionizada) e submetidas à eletroforese vertical em suporte de poliacrilamida à concentração 7 % (29 mL de água deionizada; 4 mL de TEB 10 vezes concentrado; 7 mL de acrilamida a 40 % (38 g de acrilamida, 2 g de bis-acrilamida em 100 mL de água deionizada). Para a polimerização da poliacrilamida utilizou-se 200 µ L de persulfato de amônia 10 % e 50 µ L de TEMED. As condições de migração foram de 100 Volts por 10 horas. O tampão da cuba usado foi o TEB (200 mL de TEB 10 vezes concentrado para 1800 mL de água deionizada). A aplicação das amostras amplificadas foi feita com corante diluído de azul de bromofenol em proporções de 1:1 (3 µ L : 3 µ L).

Feita a separação eletroforética, o gel foi colocado por 20 minutos em solução de fixação (100 mL de etanol, 5mL de ácido acético e 895mL de água deionizada). Após este tempo, o fixador foi retirado e adicionado nitrato de prata (0,17 g para 100 mL de água deionizada) deixando a solução por 20 minutos em um agitador orbital. A seguir, foi retirada a solução de nitrato de prata e água por um tempo de 30 segundos. Após a lavagem, foi retirada a água e colocou-se a solução de revelação (4,5 g de NaOH ; 200 µL de formaldeído e 150 mL de água deionizada). Esta solução foi imediatamente retirada com o aparecimento das primeiras bandas e logo após, foi acrescentada a solução de fixação, a qual interrompeu a revelação.

3.7 Análise de Dados

Determinou-se as frequências genótípicas e alélicas por simples contagem e averiguou-se se as populações estavam em equilíbrio de Hardy – Weinberg, utilizando o programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

Para a comparação das frequências observadas, foi utilizado o programa CLUMP1.1 (Sham e Curtis, 1995), que utiliza o método de Monte Carlo para estimar o χ^2 .

Foi realizada a regressão logística com o programa “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS versão 8.0), para obter o risco relativo (OR) do polimorfismo A(1188)C em relação a hanseníase e suas diferentes formas clínicas e a uma população controle.

4. RESULTADOS

A tabela 4 apresenta as frequências alélicas e genotípicas relativas ao polimorfismo A(1188)C, entre os dois grupos de pacientes com hanseníase e o grupo controle.

Tabela 4: Distribuição das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo A(1188)C

Genótipo / Alelo	MB (N=96)		PB (N= 20)		Controle (N=117)	
	N	Frequência	N	Frequência	N	Frequência
AA	28	0,29	10	0,50	57	0,49
AC	56	0,58	6	0,30	45	0,38
CC	12	0,13	4	0,20	15	0,13
IL- 12 β 1188*A		0,58		0,65		0,68
IL- 12 β 1188*C		0,42		0,35		0,32

As amostras investigadas foram posteriormente testadas com relação ao equilíbrio de Hardy – Weinberg, sendo que não encontramos diferenças significativas entre as duas amostras investigadas (paciente e controle) (p-valor > 0,05).

Não encontramos diferenças estatísticas significantes em relação às frequências genotípicas quando comparamos o grupo de pacientes paucibacilar com o multibacilar (χ^2 : 5,34; p-valor: 0,068).

Encontramos diferenças estatísticas significantes em relação às frequências genotípicas quando comparamos a população controle com todos os pacientes (PB e MB) agrupados (χ^2 : 6,52; p-valor: 0,039). Detectamos também diferenças estatísticas significantes em relação às frequências genotípicas quando comparamos a população controle com o grupo multibacilar (χ^2 : 9,44; p-valor: 0,008). Porém quando comparamos o grupo controle com a população paucibacilar não houve diferenças estatísticas significantes (χ^2 : 0,310; p-valor: 0,894).

Os dados da análise de regressão logística demonstram, com relação ao polimorfismo A(1188)C, uma associação positiva para as formas clínicas paucibacilar e multibacilar agrupadas. O alelo de risco (1188)*C apresenta um risco relativo de 1.9 (95%IC 1.14-3.31;P=0.013;OR=1.9).

A análise de regressão logística encontrou valores significantes quando a amostra de pacientes era composta somente da forma clínica mais severa (MB). O alelo mutante (1188)*C obteve valores de risco de 2.3 (95%IC 1.30-4.07; P=0.004; OR=2.3).

5. DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa que se caracteriza por acometer principalmente a pele e os nervos periféricos e apresentar um amplo espectro clínico. É uma doença que ocorre principalmente em países tropicais em desenvolvimento, onde as diferenças sócio-econômica despontam como um fator de risco (LOMBARDI *et al.*, 1990).

Os resultados mostram que a frequência do homozigoto AA é mais elevada em pacientes PB (50%) que em pacientes MB (29%). A frequência do genótipo homozigoto CC também é mais elevada em pacientes PB (20%) que nos pacientes MB (13%). De forma inversa, a frequência de heterozigotos AC é mais elevada em pacientes MB (58%) que em pacientes PB (30%). As comparações estabelecidas entre as frequências genotípicas dos dois grupos, não revelaram diferenças estatisticamente significantes entre elas (χ^2 : 3,26; p: 0,068).

Os dados mostram ainda que a frequência do alelo IL-12 β 1188*C é maior entre pacientes MB (42%) em relação aos pacientes PB (35%), contudo, não existem diferenças significantes (X² : 0,01; p: 0,91).

Na medida em que a resposta imunológica ao bacilo depende de múltiplos fatores genéticos (vários genes estão envolvidos) e ambientais, procuramos centrar nossas análises estatísticas na detecção de diferenças genéticas entre os dois grupos de pacientes e a população controle.

As análises dos resultados das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo A(1188)C demonstro que o alelo mutante (1188)*C é mais freqüente na população de pacientes do que na população controle.

As diferenças de frequências alélicas e genotípicas, encontradas entre o grupo de pacientes e controle se tornam mais evidentes quando aplicamos o teste de χ^2 que obteve valores de χ^2 : 6,52; para $p = 0,039$, demonstrando diferenças significantes entre as amostras.

Quando comparamos MB com o grupo controle, encontramos resultados significantes que apontam para diferenças entre esses grupos ($\chi^2 = 9,44$; $p = 0,008$). Controversamente, quando comparamos paucibacilares com o grupo controle, não encontramos diferenças estatísticas significantes ($\chi^2 = 0,31$; $p = 0,894$).

A associação entre o alelo de risco (1188)*C com relação as diferentes formas de hanseníase agrupadas (paucibacilar e multibacilar) e o grupo controle demonstrou um significante valor de risco relativo da ordem de 1.9(95%IC 1.14-3.31; $P = 0.013$;OR=1.9).

Porém, quando separamos a população de pacientes nas duas formas clínicas, encontramos valores significantes apenas entre o grupo controle e os pacientes portadores da forma multibacilar (MB), obtendo um risco relativo de 2.3 (95%IC 1.30-4.07; $P = 0.004$; OR=2.3), fato que caracteriza uma associação positiva do alelo (1188)*C com a susceptibilidade genética a forma multibacilar da hanseníase.

6. CONCLUSÕES

A susceptibilidade genética as diferentes forma de hanseníase poderia ser explicada em parte pelo gene IL-12 e suas diferentes formas polimórficas que apresentam baixos níveis de produção de IL-12 (Morahan, 2001), o que seria um fator de predisposição as formas multibacilar e paucibacilar da hanseníase.

O presente trabalho não evidencia diferenças significantes entre as formas de hanseníase MB e PB (χ^2 : 3,26; p: 0,068) com relação as formas genotípicas e alélicas do polimorfismo A(1188)C.

Entretanto, quando relacionamos o grupo de pacientes com o grupo controle, os dados demonstram diferenças significativas com relação ao polimorfismo A(1188)C entre pacientes no geral (MB e PB) e o grupo controle (χ^2 : 6,52; p= 0,039). Essas diferenças são devidas principalmente aos pacientes portadores da forma multibacilar (χ^2 =9,44; p=0,008), visto que quando comparamos isoladamente a forma PB com grupo controle não encontramos diferenças significativas (χ^2 =0,31; p=0,894).

As diferenças estatísticas encontradas pelo valor χ^2 ficam mais evidentes com a análise de regressão logística, uma vez que encontramos que indivíduos portadores do alelo de risco (1188)*C (tanto na forma homozigota quanto heterozigota) apresentam um risco elevado, aproximadamente 2 vezes maior que indivíduos que apresentam o alelo normal

(1188)*A, quando analisamos pacientes totais(MB e PB). Quando dividimos o grupo de pacientes entre as diferentes formas clínicas isoladamente, encontramos associação somente entre as forma multibacilar e controle, obtendo um risco elevado de 2,3 para presença do alelo de risco. Não foi possível encontrar associação entre pacientes PB e controle.

Os dados referentes ao grupo de pacientes PB podem estar subestimados tanto com relação a análise de χ^2 , quanto a regressão logística, devido ao número amostral pouco representativo.

Após vasta pesquisa em literatura especializada, não foi possível identificar trabalhos que demonstrem associação entre as diferentes formas de hanseníase, em um estudo caso controle, para o polimorfismo A(1188)C no gene da interleucina 12 β . Apesar do fato relevante aqui relatado, sugerimos que as amostras de pacientes, principalmente os pacientes paucibacilares, sejam ampliadas de forma a confirmar, ou refutar, nossas conclusões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOO, M; McELROY, P.D.; KOCZAC, M.S.; TERLOW, D.J.; KUILE, F.O.; NAHLEN, B.; LAL, A.A.; UDHAYAKUMAR, V. **Tumor necrosis factor-alpha promoter variant (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality and malaria morbidity in west**

AMAUER HANSEN 1873 in BECHELLI, L.M. & ROTBERG, A. **Compêndio de Leprologia**. São Paulo, Ministério da Educação e Saúde, Departamento Nacional de Saúde, Serviço Nacional de Lepra, 1951.

ARAÚJO, M.G. **Hanseníase no Brasil**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003; 36: 373-382.

DIEHL S. RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular Immunology**. 2002; 39: 531-536.

FEARON. D. The complement system and adaptative immunity. **Seminars in Immunology**. 1998; 10: 355-361.

FOSS, N.T. **Hanseníase: Aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos**. Anais Brasileiros de Dermatologia. 1999; 74: 113-119.

FRASER P. KOZIEL, H., EZERJOWITZ, A.B. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptative immunity. **Seminars in Immunology**. 1998; 10: 363-372

GOULART, I.M.B., PENA, G., CUNHA, G. **Imunopatologia da hanseníase: complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae***. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2002; 35: 365-375.

GUIA PARA O CONTROLE DA HANSENÍASE/Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. – 1ª Edição – Brasília: Ministério da saúde , 2002.

HALL, M.A., MCGLINN, E., COAKLEY, G., FISHER, S.A., BOKY, K., MIDDLETON, D., KAKLAMANI, E., MOUTSOPOULOS, H., LOUGHRAN Jr, T.P., OLLIER, W.E.R., PANAYI, G.S., LANCHBURY, J.S. **Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease**. *Genes Immun* 2000; 1:219-24.

HUANG, D., CANSILLA, M.R., MORAHAN, G. **Complete primary structure, chromosomal localization, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit**. *Genes Immun* 2000; 1:515-20.

HUNTER S.W. BRENNAN, P.J. Further specific extracellular phenolic glycolipid antigens and a related diacylphthiocerol from *Mycobacterium leprae*. **Journal of Biology Chemical**. 1983; 258: 7556-7562.

JACOBSON, R.R., KRAHENBUHL, J.L. **Leprosy**. Lancenet 1999; 353 (20): 655-660.

JOPLING & MCDUGALL. **Manual de Hanseníase**. 4º Edição, 1991. Editora Atheneu.

LOMBARDI, C. FERREIRA, J, História natural da hanseníase. Lombardi, C, Ferreira, J, Motta, CP, Oliveira, MLW. Hansesiase, epidemiologia e controle. São Paulo. **Imprensa Oficial do Estado: Arquivo do Estado**, 1990; cap I: 13-20

MARQUET, S, SCHURR, E. Gentec's susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. **Drug Metabolism and Disposition**. 2001;29: 479-486.

MILLER, S.A., DIKES, D.D., POLESKY, H.F. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells**. *Nucleic Acid Res* 1988; 16:1215

MITCHINSON. N A Polymorphism in regulatory gene sequences. **Genome Biology**. 2000;2-1-6

MORAHAN. G . BOUTLIS. C.S., HUANG, D., PAIN, A., SAUNDERS, J.R., HOBBS, M R . GRANGER, DL., WETNBERG, J.B., PESHU, N., MWAIKAMBO, E.D., MARSH, K., ROBERTS, D.J., ANSTEY, N.M. **A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL-12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced reduced nitric oxide production**. *Genes and Immunity*. 2002 a; 3: 414-418.

MORAHAN, G., HUANG, D., WU, M., HOLT, B.J., WHITTE, G.P., KENDALL, GE., SLY, P.D., HOLT, P.G. **Association of IL-12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children**. *Lancet*. 2002b; 10: 455-459.

MORAHAN, G., HUANG, D., YMER, S.I., CANSILLA, M.E., STEPHEN, K., DABADGHAO, P., WERTHER, G., TAIT, B.D., HARRISON, L.C., COLMAN, P.G. **Linkage disequilibrium of a type I diabetes susceptibility locus with a regulatory IL-12B allele**. *Nat Genet* 2001; 27:218-21.

NEIL, M.A., KEBANOFF, S.J. **The effect of phenolic glycoprotein-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages**. *Journal of Experimental Medicine*. 1988; 167: 30-42.

NETH, O., JACK, DL., DODDS, A.W., HOLZEL. H., KLEIN, N.J., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. **Infection and Immunity**. 2000; 68: 688-693.

OPROMOLLA, D.V.A. **Noções de hansenologia**. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. 2000

OPROMOLLA, D.V.A, URA, S. **Atlas de hanseníase**. 2002. Bauru, Instituto Lauro de Souza Lima.

RIDLEY, D.S. & JOPLING, W.H. **Classification of leprosy according to immunity. A five-group system**. *International Journal of Leprosy*, 1966; 34:255-273.

SCHNEIDER, S., KUEFFER, J.M., ROESSLI, D., EXCOFFIER, L. ARLEQUIN ver. 2.000: A software for population genetic data analysis. **Genetics and Biometry Laboratory**. University of Geneva, Switzerland. 2000

SHAM, P.C., CURTIS, D. Monte Cano tests for associations between disease d alleles at highly polymorphic loci. **Annals of Human Genetics**. 1995; 59: 97-105. *SIELTNG, P.A., MODLTN, R.L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection*. **Immunobiology**. 1994; 191: 378-387

SIELING, P.A., MODLTN, R.L. Cytokine patterns at *the site of mycobacterial* infection. **Immunobiology**. 1994; 191: 378-387

TALHARI, S. NEVES, R.G. **Hanseníase**. 1997, Manus.

TRINCHIERI, G. **Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity**. *Nature Immunology*. 2002; 3: 133-146.

TSUNEMI, Y., SAEKI, H., NAKAMURA, K., SEKIYA, T., HIRAI, K., FUJITA, H., ASANO, N., KISHIMOTO, M., TANIDA, Y., KAKINUMA, T., MITSUI, H., TADA, Y., WAKUGAWA, M., TORII, H., KOMINE, M., ASAHINA, A., TAMAKI, K. **Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-Untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris.** *Journal of Dermat Science* 2002; 30: 161-66

VAN BEERS S.M., DE WIT, M.Y.L., KLAFTER, P.R. **MiniReview: The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: Recent insight.** *FEM Microbiology Letters*. 1996; 136: 221-230.

VISENTAINER, J.E.L., TSUNETO, L.T., SERRA, M.F., PEIXOTO, P.R.F., PETZLERLER, M.L. Association of leprosy with HLA-DR2 in a southern Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 1997; 30: 5 1-59.

WARRINGTON, J.A., BENGTSSON, U. **High-resolution physical mapping of human 5q31-q33 using three methods: radiation hybrid mapping, interphase fluorescence in situ hybridization, and pulsed-field gel electrophoresis.** *Genomics* 1994; 24:395-8.

W.H.O. Guide to eliminate leprosy as a public health problem. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**, Geneva. 2000.

YIN, L;M., ZHU, W.F., WEI, L., XU, X.Y., SUN, D.G., WANG, Y.B., FAN, W.M., YU, M., TIAN, XL., WANG, Q.X., GAO, Y., ZHUANG, H. Association of interleukin-12 p40 gene 3' — untranslated region polymorphism and outcome of HCV infection. **World Journal of Gastroenterology**. 2004; 10: 2330-2333.

