



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NUCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO AMADOR SILVESTRE

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE HUMANO NRAMP1 NA
SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA PARA HANSENÍASE EM ÁREAS
ENDÊMICAS DO ESTADO DO PARÁ**

BELÉM

2011



MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO AMADOR SILVESTRE

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE HUMANO NRAMP1 NA
SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA PARA HANSENÍASE EM ÁREAS
ENDÊMICAS DO ESTADO DO PARÁ**

Tese apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.
Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma

Belém

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NUCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO AMADOR SILVESTRE

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE HUMANO NRAMP1 NA
SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA PARA HANSENÍASE EM ÁREAS
ENDÊMICAS DO ESTADO DO PARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de
Medicina Tropical/UFPA

Aprovada em:

Conceito:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma, NMT - UFPA
(Orientador)

Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii, NMT - UFPA

Profa. Dra. Denise da Silva Pinto, ICS - UFPA

Profa. Dra. Fabiola Elizabeth Villanova, NMT - UFPA

Profa. Dra. Esther Iris Christina Freifran von Ldebur, ICB - UFPA

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. O <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> , A HANSENÍASE.....	15
2.1.EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE.....	17
2.2 PATOGÊNESE, PATOLOGIA , ASPECTOS CLÍNICOS E DIAGNÓSTICOS DA HANSENÍASE	23
2.3 IMUNOLOGIA DA HANSENÍASE - MECANISMOS DE INTERAÇÃO ENTRE O <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> E AS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE.....	26
2.4 RESISTÊNCIA NATURAL E O GENE <i>NRAMP1</i>	32
3. OBJETIVOS.....	38
3.1.GERAL.....	38
3.2. ESPECÍFICOS.....	38
4. MATERIAL E MÉTODO.....	39
5. RESULTADOS.....	47
6. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8. ANEXOS.....	71
9. APÊNDICES.....	78

À Deus, autor da minha vida, meu Senhor e Salvador, meu Redentor, Lâmpada dos meus olhos, Sandálias dos meus pés, minha inteligência e Sabedoria, Meu TUDO!

“A Excelência da Sabedoria”

Filho meu, se aceitares as minhas palavras e esconderes contigo os meus mandamentos, para fazeres atento à sabedoria o teu ouvido e para inclinares o coração ao entendimento, e , se clamares por inteligência, e por entendimento alçares a voz, se buscares a sabedoria como a prata e como a tesouros escondidos a procurares, então entenderás o temor do Senhor e acharás o conhecimento de Deus. Porque o Senhor dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos; Provérbios 2, v. 1 a 7

AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto Evandro Chagas representado pela Direção, sob o comando da Dra. Elizabeth de Oliveira Santos, pela oportunidade de crescimento científico, intelectual e profundo aprendizado ao longo de 23 anos de atuação na seção de Bacteriologia e Micologia.
- Ao meu orientador, Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma pelo apoio e pertinentes observações na correção deste trabalho.
- Ao meu marido Silvestre, e filhos, Amanda e Alexandre pelo apoio e carinho.
- Aos pacientes que, com boa vontade, aceitaram participar deste estudo cedendo material biológico para este fim.
- À minha estagiária do Programa de Iniciação Científica (PIBIC) 2008, Sarah Raphaella Rocha de Azevedo Scalercio , pelo apoio, determinação e competência na otimização da técnica de PCR para o gene NRAMP1, essencial para a concretização deste trabalho.
- À Dra. Helen Fuzzi pela preciosa ajuda na análise dos dados para concretização deste trabalho
- À Dra. Maria da Conceição Pinheiro, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA pelo apoio e incentivo para concluir este relevante trabalho de Saúde Pública
- Ao amigo Dr. André Brandão de Araújo, biomédico, Pesquisador/Colaborador do Laboratório de hanseníase do IEC/SVS/MS por seu desprendimento em ajudar sempre.

Lista de Siglas e Abreviaturas

CCOS – Contato Cosangüíneo

CNCOS – Contato Não Cosangüíneo

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

IgM – Imunoglobulina do isótipo M

INF γ – Interferon Gama

ML FLOW - *Mycobacterium Leprae* de Fluxo

MB – Multibacilar

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade humano

NRAMP1 – Proteína de resistência natural do Macrófago

OR – Razão de Chances

PB – Paucibacilar

PGL-I – Glicolípido Fenólico I

RR – Risco Relativo

TH1 – Linfócito T helper 1

TH2 – Linfócito T helper 2

TNF – Fator de necrose tumoral

IL10 – Interleucina 10

IL 12 – Interleucina 12

TRL – receptores Toll like

TT – Tuberculóide Tórpido

VV – Virchowiano - Virchowiano

Lista de Figuras e Tabelas

FIGURA I – Mapa da situação da hanseníase no mundo. Coeficiente de Prevalência no início e 2008 e Coeficiente de detecção ao final e 2007.....	17
FIGURA II – Mapa do Coeficiente de Detecção e casos novos de hanseníase na população geral e em menores de 15 anos por unidade federada, Brasil, 2006.....	19
FIGURA III – Gráfico mostrando a distribuição do Coeficiente de detecção de casos novos de hanseníase em cada 10.000 habitantes em sete estados da Amazônia Legal, 2008.....	20
FIGURA IV – Mapa mostrando a distribuição espacial da hanseníase na Amazônia – Brasil, 2009.....	21
FIGURA V – Representação esquemática do teste Imunocromatográfico de leitura rápida MI Flow.....	43
FIGURAVI – Resultado do teste MI Flow.....	43
FIGURA VII - Representação esquemática da reação em cadeia de polimerase (PCR) para o gene NRAMP1 e os produtos alélicos resultantes da PCR em gel de poliacrilamida 12%	44
FIGURA VIII – Visualização fotográfica dos produtos alélicos (haplótipos) do polimorfismo estudado do gene NRAMP1, alelo com a deleção de CAAA (159pb) e com a inserção de CAAA (163pb).....	44
FIGURA IX - Parte da região 3' não traduzida (3'UTR) do NRAMP1 Buu(1995) que contém a inserção de CAAA indicada pela cor azul. O primer NB3'F indicado em amarelo e o primer NB3'R2 em vermelho.....	45

TABELA 1- Frequência dos haplótipos do gene NRAMP1 tipados segundo a classificação clínica do estudo, Pará, 2012	47
TABELA 2 -. Distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 heterozigotos (159/163pb) somados à frequência do alelo com a deleção (159pb) comparada à distribuição do alelo com a inserção (163pb) na hanseníase “per se”, Pará, 2012.....	48
TABELA 3 - Distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 heterozigotos somados à frequência do alelo de deleção (159pb) comparados à frequência do alelo com a inserção (163pb) entre pacientes com hanseníase positivos para anti-PGL-1 e contatos negativos para o anti-PGL-1, Pará, 2012.....	48
TABELA 4 - Distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 portadores do alelo de deleção (159pb) comparados à frequência do alelo com a inserção (163pb) entre pacientes multibacilares positivos para anti-PGL-1 e contatos não cosangüíneos negativos para o anti-PGL-1, Pará, 2012.....	49
TABELA 5 - Distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 heterozigotos somados à frequência do alelo de deleção (159pb) comparados à frequência do alelo com a inserção (163pb) entre pacientes multibacilares positivos para anti-PGL-1 e contatos cosangüíneos negativos para o anti-PGL-1, Pará, 2012.....	49

RESUMO

Hanseníase é um problema de saúde pública no estado do Pará e um desafio para os Programas de Controle que almejam o estabelecimento de estratégias para minimização do agravo da doença. O entendimento do mecanismo genético e imunológico para explicar a manutenção da endemia pode ser uma das alternativas para melhoria da abordagem do problema na nossa região. O gene humano de resistência natural associada à proteína macrofágica – NRAMP1 é expresso em macrófagos e parece estar envolvido com a influência no padrão de resposta imune à infecção com *Mycobacterium leprae*. Nós avaliamos associação do polimorfismo deste gene, já descrito por BUU et al, 1995 com a hanseníase “per se” e com os tipos da doença, segundo os níveis de anticorpos anti-PGL-1 na população estudada. Um total de 122 pacientes com hanseníase e 110 não doentes procedentes de municípios endêmicos do estado do Pará, foram genotipados para o polimorfismo deste gene e analisados segundo os níveis de anticorpos anti-PGL-1 desta micobactéria. Observou-se associação com a hanseníase “per se” ($p=0.0087$), e o polimorfismo da região 3’ não traduzida do gene NRAMP1 com inserção/deleção de 4 pares de bases foi fortemente associado com a forma multibacilar ($p= 0.025$) comparado aos contatos não cosanguíneos. Heterozigotos e portadores do alelo com a deleção (159pb) foram mais freqüentes entre os casos multibacilares do que nos paucibacilares. Os haplótipos do gene NRAMP1 parecem exercer influência importante na apresentação clínica da hanseníase, revelada também pela positividade ao antígeno PGL-1 do *mycobacterium leprae*.

Palavras-chave: genética, hanseníase, *Polimorfismo genético*

ABSTRACT

Leprosy is a public health problem in the Pará state and a challenge for the Control Programs that aim strategies improvement to elimination of this disease between us. The agreement of the genetic and immunology mechanism to explain maintain endemic disease can be one of the alternatives for problem resolution. The human gene for natural resistance associated macrophage protein – NRAMP1 is expressed in macrophages and seems to be involved with influence cellular immune responses to *Mycobacterium leprae* infection. We evaluated the polymorphism association of this gene as reported by Buu et al (1995) with leprosy “per se” and clinical forms according to the anti-PGL-1 levels in the population studied. A total of 122 leprosy patients and 110 individual healthy coming from endemic municipalities in Para were genotyped for the polymorphism of NRAMP1. Association was found with leprosy “per se” ($p=0.0087$) and 3' untranslated region with insertion/deletion of four base pairs was significantly associated with multibacillary ($p=0.025$) compared to contacts not cosanguineos. Heterozygotes and haplotypes with four base pairs deletion were more frequent among multibacillary than paucibacillary. The NRAMP1 gene haplotypes seem to have important influence on leprosy clinical presentation also revealed by *Mycobacterium leprae* anti-PGL-1 positively.

Key-words: genetics, leprosy, genetics polymorphism

INTRODUÇÃO

Hanseníase é doença infecciosa crônica causada pelo bacilo de Hansen descoberto em 1873, no século XIX. O bacilo possui tropismo para pele, anexo cutâneo e, principalmente, para terminações nervosas da pele e troncos nervosos periféricos, o que pode acarretar aos portadores da doença, incapacidades físicas irreversíveis quando o diagnóstico é tardio.

Ainda que a prevalência global tenha diminuído drasticamente com a introdução do tratamento poliquimioterápico, a detecção de casos permanece estável, com aproximadamente 700.000 casos novos por ano (GELUK et al. 2005). Esta doença persiste como problema de saúde pública em seis países, a despeito da existência de terapêutica eficaz (WHO, 2000).

O Brasil apresenta-se como líder mundial em prevalência. A OMS, desde 1980, tem produzido esforços no sentido de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública. Esperava-se que esta meta fosse alcançada em 2000, mas infelizmente o número de casos novos continua aumentando a cada ano e considerando-se que não existe reservatório natural de importância biológica conhecido para o *Mycobacterium leprae*, a origem desses novos casos permanece desconhecida (PREVEDELO e MIRA, 2007).

Em algumas regiões do Brasil, a disponibilização de instrumentos diagnósticos nos municípios endêmicos ainda é precária, mesmo com o Programa de controle da hanseníase implantado o que acarreta atraso no diagnóstico e permanência de fontes de infecção na comunidade (AMADOR, M.P.S., 2002).

A implementação de Instrumentos diagnósticos capazes de detectar infecção com *Mycobacterium leprae* antes das manifestações clínicas é uma meta importante para os países endêmicos em hanseníase objetivando o diagnóstico precoce e prevenção das incapacidades físicas (GELUK et al. 2005).

O diagnóstico e classificação dos casos de hanseníase na rede básica do serviço de saúde são feitos, basicamente, por meio de dados clínicos, bacteriológicos (pesquisa de BAAR na linfa) e, às vezes, histopatológicos, quando estes métodos se encontram disponíveis. A realidade é que o diagnóstico da doença, na maioria das vezes, é somente baseado em dados clínicos. Não há, no campo ou nos serviços de saúde, um teste laboratorial sensível e específico que possa detectar infecção assintomática com *Mycobacterium leprae* ou, ainda, que possa prever e monitorar a evolução da infecção para doença em atividade clínica (BUHRER 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003; KLATSER 1996; GELUK et al. 2005).

Estudos com pesquisa de anticorpos IgM dirigidos para PGL-I (antígeno de parede espécie-específico do *Mycobacteriu leprae*, Glicolipídio fenólico –I), a partir da década de 70, possibilitaram o advento de ensaios, como o **Enzyme Linked immunosorbent assay** ou ensaio imunoenzimático (ELISA), o qual atualmente, pode prever risco de adoecimento por formas graves de hanseníase, classificar doentes hanseníacos em multibacilares e paucibacilares para fins de tratamento, acompanhar e monitorar contatos de pacientes e distinguir recidiva de reação hanseníaca, quando avaliado com outros parâmetros clínicos e laboratoriais. Contudo seu valor diagnóstico é limitado, pois o teste é capaz de detectar cerca de 90 a 100% dos doentes multibacilares e somente 40 a 60 % dos paucibacilares (KLATSER 1996; BUHRER 1998; ANANIAS 1998; AMADOR, 2004; BAKKER 2005; GELUK et al. 2005).

Métodos genéticos e a utilização de marcadores genéticos moleculares têm sido empregados para estudo do componente genético da hanseníase e, principalmente, a influência deste no padrão de resposta imunológica do hospedeiro à infecção, bem como o complexo mecanismo de efeitos pleiotrópicos determinados pela existência de genes candidatos polimórficos presentes na população de indivíduos infectados e com doença clínica instalada (LANG et al. 1997; ABEL et al. 1997; MEISNER et al. 2001; PREVEDELLO e MIRA 2007).

O gene NRAMP1 é um dos genes associados à susceptibilidade do hospedeiro à infecção com *M. leprae*. Ele codifica uma proteína integral de membrana de 60 kDa, com 12 domínios transmembrânicos, que se localiza em

fagolisossomas de macrófagos. A proteína possui vários sítios de fosforilação e alças extracelulares glicosiladas. Há evidências de que sua função seja de canal iônico, transportando íons divalentes através da membrana (BUENO, 2006).

Em camundongos, uma mutação recessiva no gene NRAMP1, causando a substituição de glicina por ácido aspártico na posição 169 do quarto domínio transmembrânico, resulta em susceptibilidade a alguns patógenos intracelulares, entre eles o *M. bovis*. O interesse no estudo do polimorfismo do gene NRAMP1 e associação com susceptibilidade para hanseníase é exatamente a influência que ele exerce na apresentação antigênica às células T CD4⁺, não somente por meio da expressão de moléculas de MHC classe II, mas também pela regulação do processo e apresentação de antígenos e conseqüentemente determinação do padrão de resposta imunológica do hospedeiro à infecção com *M. leprae* (BUENO, 2006).

A hanseníase por ser uma doença complexa e no estado do Pará ainda existir áreas com elevados índices de endemicidade nas quais se observa focos de transmissão ativa da enfermidade e por representar, na atualidade, um problema de saúde Pública, é relevante que a pesquisa científica possa investir esforços em compreender melhor os mecanismos que influenciam na manutenção da endemia no estado, bem como, estabelecer instrumentos que possam ser úteis ao diagnóstico precoce e a vigilância epidemiológica da doença. Baseados nestas premissas resolveu-se estudar a contribuição genética associada ao polimorfismo do gene humano NRAMP1 na determinação das formas clínicas da hanseníase em áreas endêmicas do estado do Pará.

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a associação do polimorfismo do gene humano NRAMP1 na região não traduzida (3' UTR) com susceptibilidade para hanseníase por meio da avaliação das freqüência dos alelos polimórficos com inserção e/ou deleção de 4 pares de bases (CAAA) resultando em seqüências de 159 e/ou 163 pb entre doentes hanseníacos, contatos destes doentes e indivíduos saudáveis (doadores de sangue), realizando-se a correlação entre o padrão genético e o *status* imunológico dos indivíduos estudados.

A despeito do advento de várias tecnologias avançadas para o diagnóstico da hanseníase, a existência de regiões com aglomeração de casos e indícios de transmissão ativa, como a região da Amazônia Legal que concentra 38,9% (15.532) dos casos novos detectados no país, em apenas 12,9% da população brasileira residente em extensas áreas geográficas, adiciona maior complexidade a intervenções efetivas. Por esta razão, é relevante que a pesquisa científica possa ser realizada com o intuito de buscar respostas epidemiológicas e propor estratégias de ação para contribuir com a minimização do problema da hanseníase no estado do Pará.

REVISÃO DA LITERATURA

O *Mycobacterium lepra* e a Hanseníase

O *Mycobacterium leprae* ou bacilo de Hansen foi demonstrado pela primeira vez por Gerhard Henrik Amauer Hansen, em 1873, por meio de preparações a fresco de nódulos de pacientes hansênicos virchowianos, sendo considerada a primeira bactéria relacionada com uma doença humana (HASTINGS e OPROMOLLA 1994; OPROMOLLA 2000; TALHARI e NEVES 1997).

O bacilo de Hansen pertence à ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae*. Morfologicamente, trata-se de um bacilo reto ou levemente encurvado, possui forma de bastão de 1 a 8 μ m de comprimento por 0,3 μ m de diâmetro. A divisão celular ocorre por meio de bipartição simples (fissão binária). O bacilo é imóvel, não esporulado e aerófilo, não é cultivável “*in vitro*” e é praticamente atóxico. É gram-positivo porque sua parede celular é rica em peptidoglicano e é álcool-ácido resistente em função da riqueza de lipídeos, especialmente os ácidos micólicos em sua parede celular. A coloração irregular indica perda da viabilidade do bacilo. Possui uma cápsula que é a parte mais externa rica em lipídeos (micosídeos) conferindo aspecto espumoso em macrófagos (HASTINGS e OPROMOLLA 1994; OPROMOLLA 2000; MADEIRA 2000).

A composição química da parede celular do *M. leprae* é complexa e possui importante papel na imunogenicidade e patogenicidade, sendo semelhante à de

outras espécies de micobactérias, com 20 η m de espessura e duas camadas: a cápsula e a parede celular. O Glicolípido fenólico I (PGL-I) é o principal componente imunogênico presente na cápsula do *M. leprae*, cuja porção trissacarídica (resíduo terminal 3-6-Di-O-Metil D-Glicopiranosil) é o epítipo imunodominante desta bactéria, cerca de 2% da massa total bacteriana. É possível encontrar-se grandes quantidades de PGL-I em tecidos humanos infectados e de tatus, já que esta substância estimula a resposta humoral em pacientes hansênicos virchowianos (HASTINGS e OPROMOLLA 1994; OPROMOLLA 2000; MADEIRA 2000).

O *Mycobacterium leprae* é um parasita intracelular obrigatório de macrófagos, célula de Schwann, células musculares, endoteliais dos vasos sanguíneos, melanócitos e condrócitos de cartilagem; permanece viável de 7 a 10 dias em tecido ou suspensão a 4°C, mais ou menos 9 dias em secreções nasais à 35°C e 77% de umidade. Contínuas passagens em animais experimentais não alteraram a patogenicidade. Possui capacidade de oxidar fenóis como o D-isômero de hidroxifenilalanina, característica biológica específica da espécie *M. leprae* (HASTINGS e OPROMOLLA 1994; OPROMOLLA 2000; MADEIRA 2000).

Apesar dos esforços contínuos por muitas décadas e por vários grupos de pesquisadores no mundo, o *Mycobacterium leprae* nunca foi cultivado em meio sintético, ainda que alguns estudos tenham mostrado indícios de atividade metabólica “*in vitro*”. A análise do genoma desta micobactéria indica que seu cultivo em meio artificial não é possível em virtude de que menos da metade do genoma contém genes funcionais e, além disso, os genes inativados ou pseudogenes são numerosos, ou seja, o genoma sofreu uma redução evolutiva, acompanhada de uma degradação genética e diminuição de tamanho. Estas alterações evolutivas originaram a eliminação de rotas metabólicas importantes relacionadas às funções acessórias do *M. leprae*, particularmente aquelas envolvidas com o catabolismo (LEVY E JI 2006).

Desta forma, a ausência de modelos experimentais que mimetizem a doença observada em humanos e a impossibilidade do crescimento *in vitro* do *M. leprae*, representam historicamente importantes limitações no desenvolvimento de instrumentos adequados para o controle da hanseníase.

O seqüenciamento do genoma do *M. leprae* em 1999 trouxe perspectivas importantes para investigação de antígenos promissores capazes de estimular a imunidade celular, o qual desencadeou, também, a identificação de vários antígenos e peptídeos que podem induzir resposta de células T *in vitro* (DOCKRELL et al. 2000; GELUK et al. 2002, 2004).

A publicação recente do seqüenciamento do genoma do *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. smegmatis* (<http://www.tigr.org>) e o seqüenciamento quase completo de várias outras espécies de micobactérias (*M. avium*, *M. marinum*, *M. paratuberculosis* e *M. ulcerans*) [<http://sanger.ac.uk/projects/>, <http://www.tigr.org>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>, e <http://genopole.pasteur.fr/mulc/Burulist.html>] possibilitou a oportunidade para identificar proteínas únicas e específicas do *M. leprae* (COLE et al. 1998; COLE et al. 2000; FLEISCHMANN et al. 2002; GARNIER et al., 2003; GELUK et al. 2005).

Epidemiologia da Hanseníase

No início de 2008, a prevalência global da hanseníase era da ordem de 212.802 casos e o número de casos novos detectados durante todo o ano de 2007 foi de 254.525, sendo que em 2005 havia 47% multibacilares, 12% crianças e 4% diagnosticados com incapacidades físicas severas (WHO/LEP/OMS, 2008) (Figura 1).

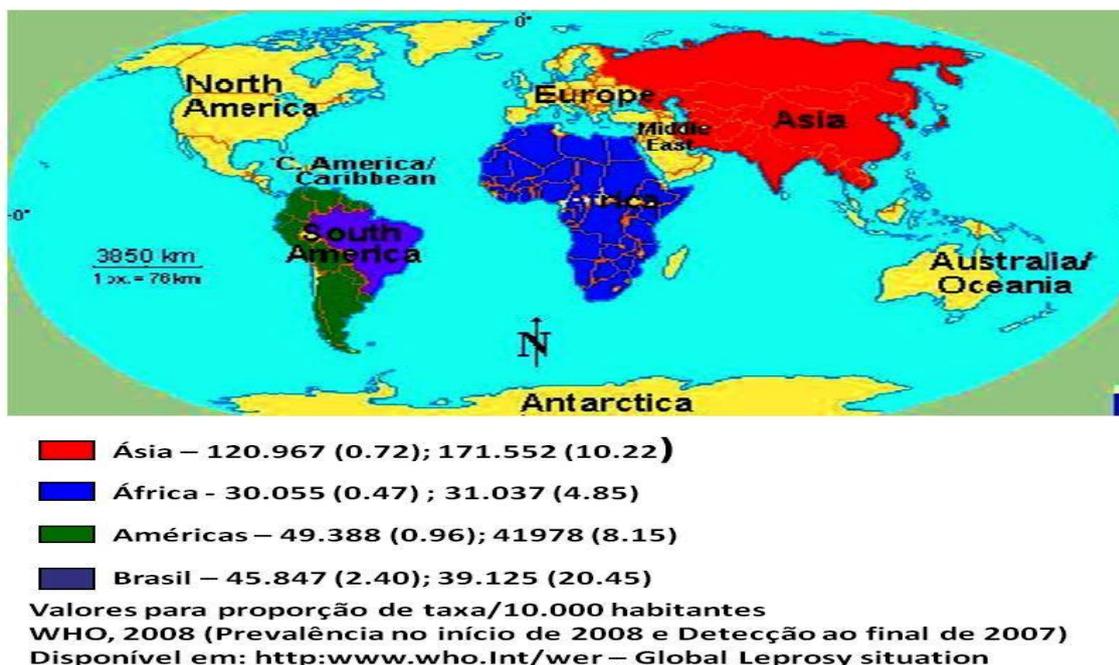


FIGURA 1 – Situação da Hanseníase no mundo: Taxa de prevalência no início de 2008 e taxa de detecção de casos novos ao final de 2007

Segundo o Ministério da Saúde (2008), a hanseníase apresenta tendência de estabilização dos coeficientes de detecção no Brasil, mas ainda em patamares muito altos nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste. A meta do PAC (Mais Saúde/MS 2008) é reduzir a doença em menores de 15 anos, mas se contrapõe à existência de regiões com aglomeração de casos e indícios de transmissão ativa. Essas concentram 53,5% dos casos detectados em apenas 17,5% da população brasileira, residentes em extensas áreas geográficas. Determinantes sociais e históricos, associados à ocupação da Amazônia Legal e à manutenção de iniquidades sociais na região Nordeste ajudam a explicar o acúmulo de pessoas infectadas, em se tratando de uma doença de longo período de incubação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

A meta de eliminação da hanseníase, com base no indicador de prevalência, foi substituída pelo indicador de detecção de casos novos. O foco é a atenção integral e uma ação integrada em regiões, estados e municípios envolvidos nos *clusters* identificados, para reduzir as fontes de transmissão. Em 2007, no Brasil, o coeficiente de detecção de casos novos alcançou o valor de 21.94/100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS, 2008).

A redução dos casos em menores de 15 anos de idade é prioridade do PNCH (Plano Nacional de Controle da Hanseníase), pois estes casos têm relação com doença e focos de transmissão ativos e o acompanhamento epidemiológico são importantes para o controle da doença. A meta estabelecida pelo PNCH para o PAC é a redução do Coeficiente de detecção de casos novos em menores de 15 anos de idade em 10.0%, no país, até 2011. É evidente o comprometimento da Amazônia Legal em relação à hanseníase, com o estado do Tocantins ocupando a primeira posição no país, com o coeficiente de 23,6/100.000 habitantes, Mato Grosso ocupando segunda posição, com o coeficiente de 19.74/100.000, o Pará a terceira, com 18.07/100.000, o Acre a sétima, com 12.10/100.000 e Roraima ocupando a oitava posição, com o coeficiente de 11.27/100.000 habitantes. Considerando o número de ocorrências nos nove estados da região, a Amazônia Legal concentrou 46.4% dos casos novos em menores de 15 anos registrados no país em 2007 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS/SINAN, 2008).

O Brasil é considerado o 2º do mundo em números absolutos de casos e o 1º das Américas. Os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul exibem as melhores estatísticas: menos de um caso em cada 10.000 habitantes. Por outro lado o estado do Mato Grosso tem uma taxa de detecção de 15.20 em cada 10.000 habitantes. Rondônia, Roraima, Acre, Tocantins, Maranhão e Espírito Santo apresentam detecção que varia de cinco a nove casos/10.000 hab. (ARAÚJO 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2004) (Figura II).

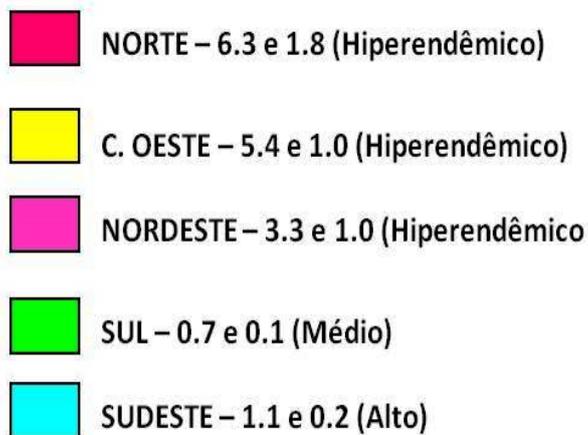


FIGURA II – Coeficiente de detecção da hanseníase, de caso novo geral e em menores de 15 anos por Unidade Federada, Brasil, 2006 (Ministério da Saúde, SVS, 2006)

O Estado do Pará é considerado o 1º do Brasil em números absolutos de casos, tendo apresentado em 2004 os seguintes dados: a) Casos em registro ativo: 7.781 casos; Coeficiente de Prevalência: 7.78/10.000 hab.; b) Casos novos: 6.184 casos; Coeficiente de detecção: 9.23/10.000 hab.; c) Prevalência de pacientes diagnosticados com incapacidade física grau II: 3.51/10.000 hab. (ARAÚJO 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ 2004) (Figura III) .

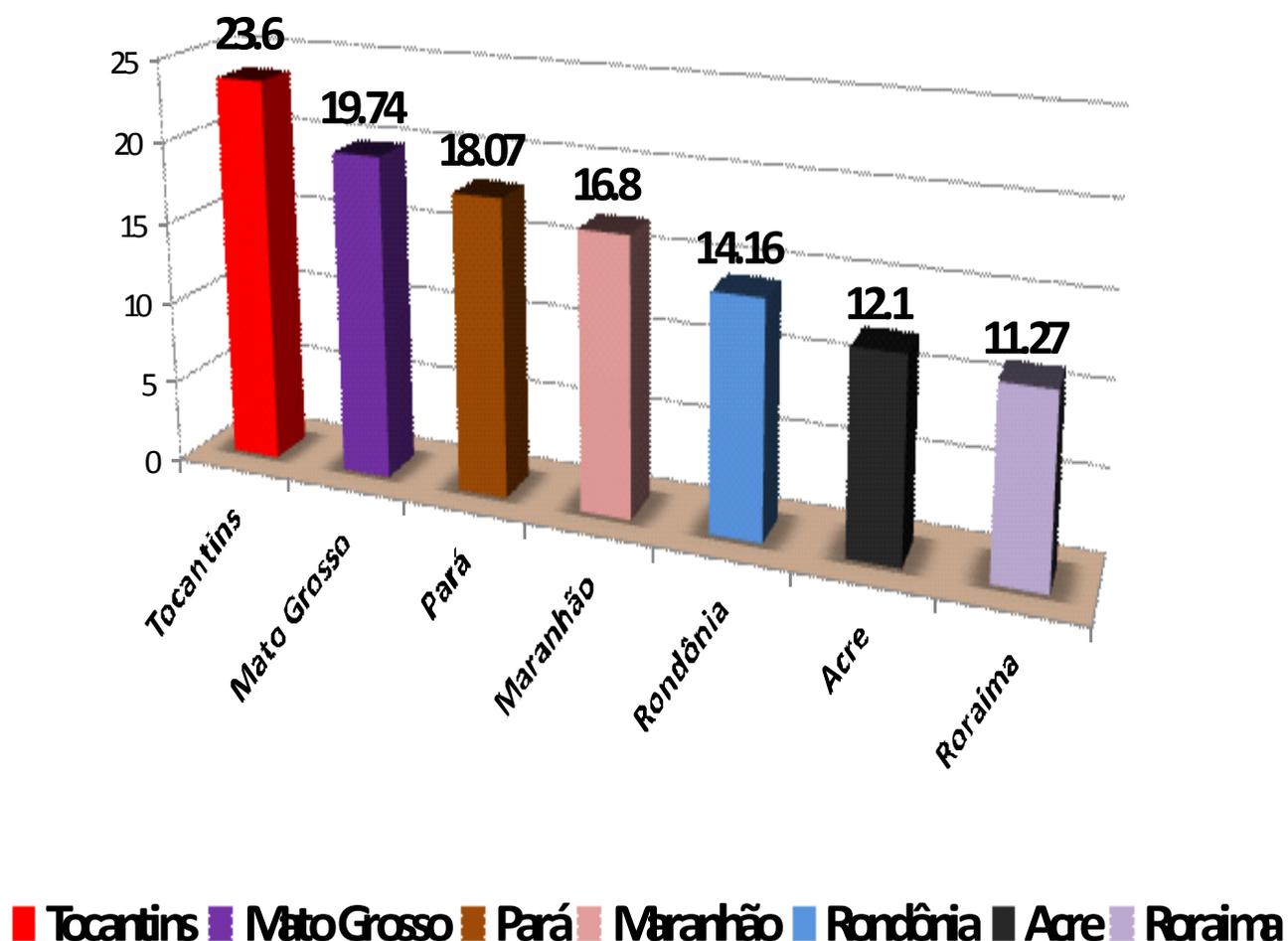
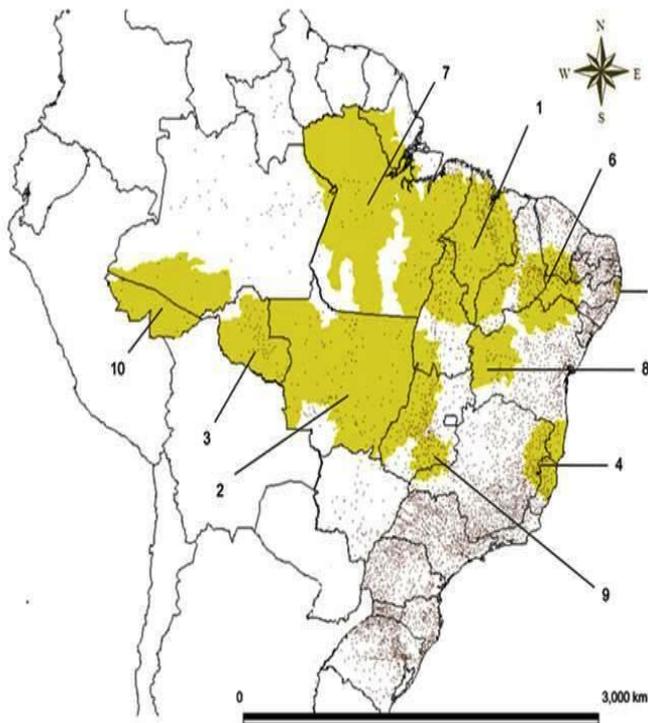


FIGURA III – Distribuição do Coeficiente de detecção de casos novos em cada 100.000 habitantes em sete estados da Amazônia Legal, 2008 (MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS, 2008)

De acordo com trabalho de PENNA et al. 2009, a distribuição espacial da hanseníase na Amazônia identificou, nesta região, 5 de 10 focos da doença, a despeito do elevado desenvolvimento econômico, crescimento populacional e infraestrutura de estradas, sendo definida como uma fonte de exportação de casos para outras partes do Brasil.



Hanseníase 10 primeiros clusters

Dos 10 maiores focos de transmissão ativa da hanseníase no Brasil, 5 estão na Amazônia Legal

Média de casos novos 2003-04 e 05
Raio de 500 km

1024 municípios
Taxa de detecção
média de 96,6
por 10.000 habitantes
60% dos casos em
menores de 15 anos
50.8% do total de casos
15.4% da população do país

FIGURA IV - Distribuição Espacial da Hanseníase na Amazônia – Brasil

Maria L.F. Penna, Maria L. Wand-del-Rey de Oliveira, and Gerson Penna Author affiliations: Federal Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil (M.L.F. Penna); Federal University of Rio de Janeiro Medical School, Rio de Janeiro (M.L.W.d.R.de Oliveira); and University of Brasília, Brasília, Brazil (G. Penna) Vol. 15, No. 4 • April 2009

GELUK et al. descreveram a seleção de vários antígenos candidatos não homólogos com o *Mycobacterium tuberculosis* ou outra micobactéria conhecida e realizaram uma análise da capacidade destes antígenos de estimularem células T demonstrada pela produção de gama interferon (INF γ) em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidas de pacientes hansênicos, contatos intradomiciliares de pacientes, doentes tuberculosos e indivíduos saudáveis. A identificação das proteínas e peptídeos únicos do *Mycobacterium leprae* pode implementar a próxima geração de instrumentos que venham distinguir infecção com *M. leprae* da infecção com *M. tuberculosis*, micobactéria ambiental ou vacinação com BCG.

Spencer et al. (2005) demonstraram por meio de estudo com proteínas e peptídeos específicos do *Mycobacterium leprae* não homólogos com outras micobactérias e com o *M. tuberculosis*, resposta imunológica celular específica com produção elevada de INF γ e controle da infecção em pacientes paucibacilares e indivíduos saudáveis, não encontrada nos doentes multibacilares. Os autores afirmam que o desenho de um teste diagnóstico sensível e específico para hanseníase, deverá incorporar uma mistura destes peptídeos, pois, observa-se que o uso de múltiplos antígenos aumenta a frequência de resposta em indivíduos infectados, o que vai favorecer o diagnóstico precoce.

Segundo estudo recente de Maeda et al. (2005) com soros de pacientes hansênicos paucibacilares, utilizando seqüenciamento N-terminal da proteína sérica reativa e avaliação funcional das frações de membrana do *M. leprae* pelo uso de células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos, foi identificada proteína maior de membrana II, do Inglês *Major Membrane Protein -II* (MMP-II) como uma das candidatas mais eficientes na ativação de células T. A MMP-II purificada, estimulada por células dendríticas de indivíduos saudáveis produziu interleucina-12 e regulou a expressão em superfície do complexo principal de histocompatibilidade classe I e II, e moléculas CD86 e CD83. Também houve um aumento na porcentagem de células CD83+ na população de DCs, trazendo à pesquisa mais uma proteína que pode ser estudada no sentido da avaliação dos mecanismos imunomoduladores presentes na hanseníase.

Patogênese, Patologia, Aspectos Clínicos e Diagnósticos da Hanseníase

O contato do hospedeiro sadio com o *M. leprae* se faz principalmente pela via aérea superior e a infecção subclínica ocorre em uma grande proporção de pessoas (HARBOE M, 1985 *In*: Hastings RC, Leprosy, 1985). As células linfocitárias de pessoas adultas expostas uma única vez a pacientes com hanseníase apresentaram alta reatividade (linfoproliferação *in vitro*) ao *M. leprae*, fato demonstrado desde 1972 (GOULART et al., 2002).

Somente uma pequena porção de indivíduos infectados apresenta propagação bacilar para nervos periféricos e pele, onde é fagocitado pelas células de Schwann e macrófagos. O período de incubação é de cinco anos em média, em função de que o bacilo de Hansen faz uma divisão binária em cada 12 a 21 dias e sua localização intracelular obrigatória no sistema fagocítico-monocitário imprimem a característica de doença crônica à hanseníase (HASTINGS e OPROMOLLA, 1985; MADEIRA S *In*: OPROMOLLA 2000; GOULART et al., 2002).

A hanseníase pode ser definida como doença infecciosa que afeta primariamente a pele e o sistema nervoso periférico, além de apresentar manifestação clínica espectral. Segundo os pesquisadores ingleses Ridley e Jopling, os pólos deste espectro são ocupados, de um lado, pela forma mais localizada denominada Tuberculóide, a qual está associada à resposta imunológica do tipo TH1, e do outro lado pela forma Virchowiana (termo brasileiro que substitui a palavra “Lepromatosa”), sistêmica e associada à resposta imunológica do tipo TH2, com três forma clínicas intermediárias ou *borderline*. Os pólos tuberculóide e virchowiano correspondem aproximadamente às formas paucibacilar e multibacilar, respectivamente, criadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para fins de orientação terapêutica (HASTINGS e OPROMOLLA, 1985; OPROMOLLA, 2000; PREVEDELO e MIRA, 2007).

Os sinais e sintomas clínicos da hanseníase podem ser discretos e imperceptíveis no início da doença. De modo geral, iniciam com manchas ou máculas hipoestésicas na superfície exposta da pele ou em todo o tegumento cutâneo ou até mesmo somente apresentando áreas da pele que se tornam

hipoestésicas, anidróicas, ressecadas e com alopecia. A perda da sensibilidade pode ser restrita às lesões, mas podem também manifestar-se com anestesia envolvendo a região ocular, palmar e/ou plantar com ou sem comprometimento motor, nos olhos, mãos e pés. Nos casos de hanseníase neural pura, ou seja, sem alterações dermatológicas, a manifestação clínica pode ser unicamente o comprometimento de um ou mais nervos periféricos com alterações motoras visíveis ou discretas tornando o diagnóstico da doença mais difícil (HASTINGS e OPROMOLLA, 1985; TALHARI e NEVES 1997; BUHRER, 1998; OPROMOLLA 2000).

Para alguns autores a hanseníase nos seres humanos é essencialmente uma doença dos nervos periféricos (CHARLES, 1998). O diagnóstico clínico da doença depende muito do reconhecimento das conseqüências do dano neural no paciente. Nervos periféricos espessados, áreas anestésicas na pele, músculos paralisados nas mãos, pernas ou face, levam ao diagnóstico da hanseníase. A demonstração histopatológica da invasão dos nervos pelo *M. leprae* ou a presença de um granuloma inflamatório dentro ou ao redor do nervo é relevante para confirmar o diagnóstico da hanseníase (HASTINGS e OPROMOLLA 1985; TALHARI e NEVES, 1997 CHARLES JOB, 1998).

Desta forma o diagnóstico correto da hanseníase depende do entendimento do conceito espectral da doença, possibilitando entre o curso clínico-evolutivo e a extensão do comprometimento cutâneo-neural característico de cada forma clínica da doença (SOUZA 1997; CHARLES, 1998; WHO, 2002). A partir deste conhecimento são aplicadas as classificações que auxiliam a compreensão e norteiam a terapêutica.

Segundo a classificação de Madri (1953) a qual adota critérios de polaridade baseados nas características clínicas da doença, acrescidos dos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos da hanseníase, esta classificação define os grupos polares tuberculóide (T) e virchowiano (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma borderline (B) ou dimorfo (D). Os critérios clínico, bacteriológico, imunológico e histopatológico definem esta classificação (HASTINGS

e OPROMOLLA, 1985; TALHARI e NEVES, 1997; SOUZA, 1997; PIMENTEL et al., 2004).

Resumidamente, a expressão clínica da forma indeterminada (I) inicia com o aparecimento de uma área de hipoestesia definida ou não por uma lesão visível. A manifestação cutânea mais comum é o surgimento de uma ou algumas máculas hipopigmentadas, discretamente eritematosas e mais secas do que a pele circunjacente. A hanseníase Indeterminada pode evoluir com cura espontânea, desenvolver-se de forma insidiosa ou evoluir para formas clínicas definidas dentro do espectro da doença de acordo com sua capacidade de resposta imunológica ao *M. leprae* (FALTZGRAFF e BRYCESON, 1985 *apud* SOUZA, 1997; OPROMOLLA 2000).

A hanseníase tuberculóide caracteriza a forma clínica de contenção da multiplicação bacilar dentro do espectro da doença. As lesões cutâneas, com bordas pronunciadas, são únicas ou em pequeno número, distribuídas pelo corpo de forma assimétrica. Apresenta-se , quando mácula, como lesão hipocrômica ou eritematosa, delimitada por micropápulas e, quando em placa, como lesão eritematosa ou acobreada, difusamente infiltrada, ou com tendência central ao aplainamento, e limites externos sempre nítidos e bem definidos. Além da pele, o envolvimento de troncos nervosos ocorre em pequeno número, usualmente, próximo às lesões cutâneas. Os nervos preferencialmente acometidos são o cubital, mediano, radial, peroneiro comum, tibial posterior, auricular e supraorbitário. Quando ocorre somente comprometimento neural, sem lesões cutâneas, denomina-se hanseníase tuberculóide neural pura (TALHARI e NEVES, 1997; SOUZA, 1997; HASNTINGS e ORPROMOLLA, 1997,OPROMOLLA, 2000).

Na forma tuberculóide, ao ser avaliada a resposta imunológica ao *M. leprae*, por meio da intradermorreação de Mitsuda, observa-se reação fortemente positiva, sempre maior que 5 mm, atingindo até 8 a 5 mm de diâmetro, freqüentemente com ulceração central. A baciloscopia é negativa e na histopatologia de cortes de pele observa-se granuloma de células epitelióides, gigantócitos circundado por linfócitos na periferia constituindo granuloma bem definido que invade a derme e, por vezes, a epiderme, além de comprometer filetes nervosos e anexos cutâneos, como

glândulas sudoríparas e aparelho pilosebáceo (TALHARI e NEVES, 1997; SOUZA, 1997; HASTINGS e OPROMOLLA, 1985; BÜHRER, 1998).

A forma virchowiana, no pólo de anergia, expressa a forma clínica de susceptibilidade ao bacilo, resultando em multiplicação e disseminação da doença. A progressão lenta desta forma avança através dos anos, envolvendo difusamente extensas áreas do tegumento, múltiplos troncos nervosos, e inclusive outros órgãos. Inicia-se com máculas mal definidas, discretamente hipocrômicas ou eritematosas, pouco visíveis, ampla e simetricamente distribuídas sobre a superfície corpórea.

A progressão da doença resulta em acentuação do eritema e infiltração, pele luzidia, com poros dilatados, tipo “casca de laranja”; e sobre estas áreas se sobrepõem pápulas, nódulos e tubérculos. Frequentemente estão comprometidas a região frontal, centro-medial da face e lóbulos da orelha, caracterizando a fácies leonina. Usualmente as regiões mais quentes como axilas, linha média do dorso, perineo e virilhas são poupadas. Nos membros há comprometimento das superfícies extensoras, particularmente dorso das mãos e extremidades, tanto dos membros superiores, como dos inferiores, observando-se articulações e dígitos edemaciados. As lesões se encontram com diminuição ou ausência de pêlos na face. O comprometimento na cauda da sobrancelha é denominado madarose. Com a evolução da doença, múltiplos troncos nervosos são comprometidos simetricamente, e se tornam de firmes a espessados, fibrosos e endurecidos e, progressivamente, sobrevêm à perda sensitiva e motora, conseqüentemente, levando à perda da função, atrofia muscular; paralisias, deformidades e contratura. Na forma virchowiana avançada frequentemente o trato respiratório superior está envolvido, causando mucosa congesta e edemaciada.

Imunologia da Hanseníase – Mecanismos de interação entre o *Mycobacterium leprae* e as células do sistema imune

O *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório que apresenta grande afinidade por células da pele e dos nervos periféricos. Multiplica-se a cada 12-13 dias, principalmente nas células de Schwann e histiócitos, mas também em outras células, como a célula muscular e o endotélio vascular. É o agente causador da

hanseníase, doença endêmica em várias regiões do mundo (NISHINO 1997, TALHARI e NEVES, 1997, OPRMOLLA 2000).

A hanseníase é considerada uma doença complexa do ponto de vista genético, já que não existe correlação específica entre genótipo e fenótipo, característica das doenças relacionadas com herança Mendeliana clássica. Além disso, a doença apresenta multiplicidade de sinais e sintomas e variações no quadro clínico. Conseqüentemente ocorre também variabilidade no padrão de resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção com *M. leprae* (CELLIER et al. 1994; FOSS, N.T., 1997; CELLIER e GROS, 2004; PREVEDELO e MIRA, 2007).

A trajetória realizada pelo *M. leprae* desde a sua entrada no organismo humano ainda é controversa. Evidências mostram que a cavidade nasal é o sítio primário da infecção com o bacilo. Acredita-se que indivíduos em estágio sub-clínico da infecção com *M. leprae* ou mesmo, aqueles que evoluem para cura espontânea, podem representar fonte de infecção, mesmo que seja por período transitório, no qual ocorre excreção da bactéria pela via nasal e/ou bucal (GOULART et al. ,2002; COSTA, M.R.S., 2008; MENDONÇA et al., 2008).

As células efectoras da imunidade inata são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* – *NK*, sendo que os mecanismos da imunidade inata incluem a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas (MACHADO et al. , 2004; MENDONÇA et al., 2008; CASTELO et al., 2009; CRUVINEL et al., 2010).

A primeira linha de interação entre o *M. leprae* e o homem é mediada por receptores das células do hospedeiro que reconhecem padrões moleculares das micobactérias, os chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como por exemplo, os receptores *Toll-Like* (TLRs), os quais são essenciais para o reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas durante a resposta da imunidade inata. Dez TLRs já foram identificados, dos quais os heterodímeros TLR2-TLR1, os homodímeros TLR2 e TLR4 parecem ser importantes

para o reconhecimento de micobactérias (BRIGHTBILL et al., 1999, MENDONÇA et al., 2008).

Os receptores TLRs, especialmente o TLR-2, são ativados por lipoproteínas do *M. leprae*, e a capacidade de iniciar a resposta protetora está diretamente relacionada com a secreção de IL-12/23 e a diferenciação de macrófagos e células dendríticas (VERECK et al., 2004, KRUTZIK et al., 2005).

As células dendríticas apresentam o antígeno e causam ativação das células T virgens através da secreção de IL-12 (DEMANGEL, C. e BRITTON, W.J, 2000). Esse processo pode levar à expansão e diferenciação de células TH1 produtoras de interferon ($\text{INF}\gamma$) que induz os elementos da resposta imunológica 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 (BRIGHTBILL et al., 1999, MENDONÇA et al., 2008), citocina pró-inflamatória responsável pela indução da imunidade celular e formação do granuloma, que também está relacionada com destruição tecidual associada aos surtos reacionais da hanseníase (SARNO et al., 1991; FOSS et al., 1993).

Anticorpos salivares anti-PGL-I das classes IgA e IgM podem ser encontrados em indivíduos que tiveram contato recente com o *M. leprae*, ou seja, são resultantes de exposição prévia ou atual com os bacilos por meio da mucosa nasal que uma vez exposta aos antígenos do *M. leprae*, ocorrerá estimulação de mecanismos inatos para prevenir adesão de microorganismos à superfície epitelial, os quais podem ser identificados na saliva antes mesmo do que no soro (SMITH et al., 2004; NAGAO-DIAS et al., 2007).

O bacilo dentro do organismo é fagocitado, metabolizado e processado pela APCs (Células Apresentadoras de Antígeno) que são os macrófagos, mas também podem ser as células de Langherans da epiderme, células de Schwann, queratinócitos e células endoteliais. Os fragmentos formados são expressos na superfície das APCs juntamente com o HLA classe II que é reconhecido pelo receptor dos linfócitos T helper (auxiliares) e a secreção de linfocinas. Para que isto ocorra é necessária a presença da interleucina-1 produzida pelo macrófago e

interleucina-2 produzida pelo próprio linfócito. Esta fase é importante para o desenvolvimento de clones de linfócitos reativos ao *M. leprae* capaz de exercer as funções fundamentais na resposta imunológica TH1. Os linfócitos ativados produzem várias citocinas, entre elas, a interleucina-2 (fator indispensável à proliferação de linfócitos) e o interferon gama (fator fundamental na ativação de macrófagos) (NISHINO 1997, GOULART et al., 2002).

Os macrófagos produzem várias citocinas, entre elas, a IL1, IL6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A IL1 atua sobre os linfócitos T (LT) levando à produção de linfocinas, especialmente a IL2, bem como aumentando a expressão de receptores para IL2. Tal fato leva a ativação macrófagica, ocorrendo “superrespiração” e produção de radicais livres derivados do oxigênio altamente tóxicos para o bacilo de Hansen, o que representa limitação para a sobrevivência da bactéria dentro do macrófago e, conseqüentemente, expressão clínica da forma Tuberculóide com limitação de lesões. A IL6 tem ações muito semelhantes a IL1, porém, atua também sobre os linfócitos B (LB) promovendo a diferenciação terminal deles em células secretoras de Ig. O TNF α apresenta atividades biológicas diversificadas, isto é, induz a produção de linfocinas e a expressão de receptores para IL2 pelos LT, aumenta a produção de anticorpos (AC) e promove a proliferação dos LB, atua como quimiotático para monócitos-macrófagos e induz a produção de IL1, IL6 e IL8 por macrófagos fazendo com que haja predomínio de resposta humoral e, conseqüentemente, expressão das formas graves da hanseníase (HASTINGS e OPRMOLLA 1994, TALHARI e NEVES, 1997, OPRMOLLA 2000).

Com relação aos reativos Intermediários de Oxigênio e Nitrogênio (ROI e RNI), pode-se dizer que são sistemas bioquímicos antimicrobianos dos fagócitos mononucleares de vital importância na defesa do organismo contra as infecções. Desta forma, no momento da interação entre a partícula a ser fagocitada e o fagócito observa-se aumento na respiração celular, fenômeno conhecido como explosão respiratória, sendo gerado o ânion superóxido (O₂⁻) e a água oxigenada (H₂O₂) que podem ser convertidos para formar radical hidroxila (OH⁻) e o oxigênio simples (O₂). Esses metabólitos do oxigênio são altamente tóxicos para os microorganismos e reagem com a maioria das moléculas orgânicas, como o DNA, proteínas e lipídeos, alterando-as restringindo a multiplicação bacilar levando à formação de granuloma

rico em células epitelióides as quais representam o máximo de resistência frente à infecção com *M. leprae*, ainda que o fato impeça o adoecimento (OPROMOLLA, 2000).

A resposta imunológica adaptativa caracteriza-se por apresentar mecanismos que se baseiam no reconhecimento específico de antígenos, mediado por receptores presentes nas membranas dos linfócitos T e B. Classicamente a resposta imunológica adaptativa pode ser categorizada em tipo 1 e tipo 2. A capacidade de os linfócitos auxiliares (CD4+), também conhecidos como linfócitos T helper (TH) em induzir resposta TH1 na qual ocorre resposta imune celular competente com restrição bacteriana e desenvolvimento de formas paucibacilares da hanseníase ou TH2 na qual ocorre predominância de resposta imune humoral com multiplicação bacilar e desenvolvimento das formas graves ou multibacilares da doença. Os dois tipos de resposta estão relacionados com o padrão de citocinas secretadas, e isso pode influenciar na evolução da doença e estar associado, pelo menos em parte, com as características clínicas observadas nos pacientes portadores das formas TT (tuberculóide tórpida) e VV (virchowiana), respectivamente (MOARAES et al., 2006, MENDONÇA et al. 2008).

Os fatores genéticos do hospedeiro parecem desempenhar papel relevante no desenvolvimento e no padrão da hanseníase (ALCAIS et al., 2005). Atualmente, é amplamente aceita a noção de que os genes modificam a susceptibilidade à doença em pelo menos dois momentos distintos: 1) No controle da infecção *per se*, isto é, a doença independentemente de sua forma de manifestação clínica; e 2) Uma vez o indivíduo infectado, na definição das diferentes formas clínicas da doença (PREVEDELO e MIRA 2007).

Polimorfismos e mutações em diversos genes relacionados ou não com a resposta imunológica têm sido associados com hanseníase como, por exemplo, os seguintes genes: TNF α , IL10, TLR, Lectina ligante de manose MBL-2, Laminina $-\alpha$ 2 (Lama 2) e mesmo genes envolvidos com a doença de Parkinson (Park2 e PACRG) (BRITTON e LOCKWOOD, 2004; ALCAIS et al. 2005).

Estudo genético identificou *loci* susceptíveis no cromossomo 10p13, próximo do gene para receptor de manose C tipo 1, um receptor de macrófagos envolvidos com fagocitose, e no cromossomo 6 na região de complexo de antígenos leucocitários humanos (HLA) (SIDIQUI et al., 2005). Dentro dessa região têm sido mostradas ligações com genes dos antígenos de classe II em pacientes indianos com hanseníase (SHAW et al., 2001). Os alelos HLA DR2 e DR3 estão associados com a forma TT, e o HLA DQ1 está relacionado com a forma VV (COOKE e HILL, 2001).

Polimorfismos na região promotora dos genes para TNF α e IL10 estão associados com o desenvolvimento da hanseníase (SANTOS et al., 2002), particularmente com a hanseníase multibacilar no caso do polimorfismo da região promotora do TNF α (-3086/A) também regula a produção de TNF durante os episódios reacionais e que a frequência de neurites é muito maior nos pacientes heterozigotos (ROY et al., 1997; SARNO et al., 2000).

Estudos com pacientes hansenícos indicam que o receptor TLR2 é mais comum nos pacientes portadores das formas VV em comparação com portadores de outras formas da doença na Coreia, sugerindo que o mesmo contribui para susceptibilidade (CHEMOUILLI et al., 1996). Polimorfismos do gene da proteína 1 do macrófago associado à resistência natural (NRAMP1) estão associados com hanseníase MB em pacientes africanos, polimorfismo da região 3' não traduzida do gene NRAMP1 apresentando inserção/deleção de 4 pb – GTGT (MEISNER et al., 2001) e esse gene também tem sido relacionado com a resposta imunológica celular ao *M. leprae* (ALCAIS et al., 2000). Estudo realizado com pacientes hansenícos indianos indicou que diferentes alelos do gene receptor de vitamina D (VDR) estão associados com hanseníase TT e VV (ROY et al., 1999).

Discordâncias e conflitos encontrados em alguns estudos genéticos podem estar associados às diferentes metodologias adotadas e ao tipo de amostras utilizado, bem como à diferença genética entre as distintas populações estudadas (CELLIER et al., 1994; MENDONÇA et al., 2008).

O gene humano, homólogo murino, NRAMP1 apresentou em diversos estudos de ligação e associação, susceptibilidade para hanseníase multibacilar representada pela frequência dos alelos de deleção entre os pacientes multibacilares comparados aos paucibacilares e/ou controles. É interessante observar que no camundongo o fenótipo de susceptibilidade é recessivo, mas em humanos parece ser um efeito dominante e haver predominância de heterozigotos entre os doentes de formas graves comparados aos controles sadios (ABEL et al., 1998; MEISNER et al., 2001; CELLIER e GROS, 2004).

Resistência Natural e o gene NRAMP1

MALO et al. (1994) estudaram o *locus* do cromossomo 1 do camundongo *Bcg* (*ITY*, *Lsh*) o qual controla a capacidade do macrófago de restringir a replicação de parasitos intracelulares antígenicamente não relacionados e determina resistência natural (BCG-R, dominante) ou susceptibilidade (BCG-S, recessivo) de cepas de camundongos para infecção com diversos patógenos, incluindo várias espécies de Mycobactérias, Salmonella Typhimurium e Leishmania donovani. Os autores usaram uma estratégia de clonagem posicional no mapeamento genético e físico para isolar o gene candidato para Bcg (*Nramp1*) que codifica uma proteína de transporte macrófago-específica.

De acordo com BUU et al. (1995), resistência para infecção por microorganismos intracelulares tais como os gêneros *Mycobacteriae*, *Leishmaniae* e *Salmolleae*, no camundongo, se demonstrou que a susceptibilidade é controlada por um único gene denominado *Bcg/Lsh/Ity*, o qual localiza-se no camundongo no cromossomo proximal 1 (BLACKWELL et al., 1998). Um gene candidato para *Bcg* (*Nramp1*) ou resistência natural associada à proteína 1 do macrófago foi identificado por codificar uma proteína de membrana politópica macrófago-específica (MALO et al., 1994; VIDAL et al., 1993).

O gene humano homólogo do camundongo NRAMP1 foi clonado e sua organização genômica foi estabelecida (CELLIER et al., 1994). Localizado no cromossomo 2 região q35, o gene contém 15 EXONS e abrange um tamanho genômico de aproximadamente 14 kilobases (Kb). Análise da seqüência de

aminoácidos indicou que o gene NRAMP1 codifica uma proteína de membrana de 550 aminoácidos com 10 para 12 domínios transmembrânicos, dois N-ligados a sítios de glicosilação e um evolutivamente conservado relacionado com transporte (CELLIER et al., 1994).

Análise conformacional de fita única da proteína e seqüenciamento direto, revelou nove polimorfismos e variações na seqüência, os quais podem ser marcadores importantes em análise genética do NRAMP1 na susceptibilidade para doenças infecciosas (LIU et al., 1995). No estudo de BUU et al., 1995, a região 3' não traduzida (3'UTR) do gene NRAMP1 foi isolada para se pesquisar alelos adicionais. Análise da seqüência desta região identificou uma inserção/deleção de 4 pares de bases (pb) elevadamente polimórficas na cadeia poly A (na extremidade da seqüência) da família do gene NRAMP1 (BUU et al., 1995).

O gene NRAMP1 é um dos genes associados à susceptibilidade do hospedeiro à infecção com *M. leprae*. Ele codifica uma proteína integral de membrana de 60 kDa, com 12 domínios transmembrânicos, que se localiza em fagolisossomas de macrófagos. A proteína possui vários sítios de fosforilação e alças extracelulares glicosiladas. Há evidências de que sua função seja de canal iônico, transportando íons divalentes através da membrana. (REMUS et al. 2003 .; MEISNER et al., 2001; BUU et al., 2000; SKAMENE et al., 1998; BLACKWELL et al., 1998; ABEL et al., 1998; BUENO 2006).

Outro mecanismo de ação da proteína NRAMP1 seria o transporte de íons para fora do fagolisossoma, transporte este dependente de pH. A diminuição do conteúdo iônico dentro do fagolisossoma, principalmente ferro (Fe^{2+}), manganês (Mn^{2+}) e zinco (Zn^{2+}), controlaria a proliferação de microorganismos intracelulares em fagócitos, já que os patógenos utilizam estes íons como cofatores para a replicação do DNA, produção de importantes enzimas para seu metabolismo e para neutralização de componentes tóxicos do fagolisossoma e também expressão de diferentes fatores de virulência (GRUENHEID et al., 1995; CANONNE-HERGAUX et al., 1999; JABADO et al., 2000; FORBES e GROS, 2001; WYLLIE 2002 *apud* BUENO 2006).

Segundo LAGRANGE et al. (1996), modelos experimentais demonstram a existência de um gene dominante envolvido com resistência para infecção com micobactérias, sendo que este gene existe em duas formas alélicas, **bcgr** e **bcgs**. O alelo **bcgr** confere resistência e é mais dominante que o alelo **bcgs**, o qual representa grande vulnerabilidade para infecção. O gene candidato murino para o gene bcg foi chamado de Nramp (Natural resistance-associated macrophage protein). Este gene atua preferencialmente em macrófagos conferindo capacidade bacteriostática aumentada nestas células. O Nramp1 é estruturalmente homólogo à família das proteínas de membrana com função transportadora ligadas ao ATP e semelhante ao sistema bacteriano de membrana que transporta nitritos. A proteína NRAMP está também envolvida com um sinal de transdução durante a ativação de macrófagos e isso justifica o polimorfismo genético neste locus de intervenção na resposta imunológica específica primária ou inata, porém não específica à infecção, já que esta última é determinada pelo polimorfismo de moléculas de HLA de classe II, que interviriam na evolução da resposta imunológica secundária ao *M. leprae*.

O efeito fisiológico de polimorfismos existentes na região 3' não traduzida de alguns genes não está totalmente entendido, contudo há evidências de elementos regulatórios nessas regiões que podem interferir no mecanismo que leva à resistência ou susceptibilidade mediante infecção com patógenos intracelulares obrigatórios, entre eles, o *M. leprae*. Na ausência de efeito fisiológico bem definido, marcador elevadamente polimórfico descrito pelos autores pode ser proveitoso em estudos de associação genética testando o papel do NRAMP1 na susceptibilidade para tuberculose, hanseníase e leishmaniose (BUU et al., 1995).

Segundo LANG et al. (1997) em seu estudo experimental com camundongos, o mecanismo de efeitos pleiotrópicos que o gene Nramp1 exerce sobre o sistema imunológico parece dever-se à atividade transportadora de cátions divalentes da proteína cuja concentração dos íons influencia funções celulares tais como: a) regulação da transcrição por proteínas ligantes do DNA; b) funções de centenas de enzimas, incluindo metaloproteases, superóxido dismutase (SOD) e Óxido Nítrico Sintase (iNos); c) regulação de células Killer, Interleucina 1 β , indução da síntese do Óxido Nítrico (iNOs); d) regulação das moléculas do complexo principal de

histocompatibilidade humano de classe II com influência na apresentação de antígenos às células T; e) lançamento do óxido nítrico e estouro oxidativo e microbicida dos macrófagos, entre outros.

Estudos de REMUS et al., (2003) , MEISNER et al. (2001), BUU et al.(2000), SKAMENE et al. (1998), BLACKWELL et al. (1998), ABEL et al. (1998), concordam com a assertiva de que o gene humano NRAMP1, homólogo do gene murino *nramp1*, está envolvido com susceptibilidade e/ou resistência à infecção com patógenos intramacrofágicos, entre eles, o *M. leprae*.

Para ROGER et al. (1997) e FERREIRA et al. (2004), o gene NRAMP1 não está associado com susceptibilidade à hanseníase em famílias da Polinésia Francesa testadas para este gene e o alelo 2 do NRAMP1 é um fator genético independente que predispõe células para incapacitar a sobrevivência do patógeno, provavelmente devido à sua ineficiência no transporte de íons.

Considerando que o perfil da resposta imunológica e a capacidade de montar uma resposta mediada por células, específica e capaz de eliminar o patógeno intracelular ou restringir a infecção com *M. leprae* depende potencialmente de fatores genéticos, estudos de associação do perfil imunológico dos indivíduos com identificação de genes candidatos para susceptibilidade e resistência às infecções, certamente teremos respostas mais evidentes sobre a manutenção da endemia hanseníca em determinadas populações.

O NRAMP1 é um dos poucos genes de resistência do hospedeiro que tem sido bem caracterizado no nível molecular e funcional. A NRAMP1 é uma proteína integral transmembrânica expressa no compartimento lisossomal de células fagocitárias e é recrutada para a membrana fagossomal onde afeta a replicação do patógeno. É uma proteína que faz parte de uma extensa família de genes conservada através da evolução, a qual codifica para transporte de cátions divalentes, participando desse mecanismo semelhante a uma bomba de efluxo na membrana fagossomal (CELLIER e GROS, 2004).

A resistência ou susceptibilidade a diversos patógenos sob a influência do gene NRAMP1 foi inicialmente demonstrada em estudos *in vitro* (LISNER et al., 1993; STACH et al., 1984; OLIVIER e TANNER 1987 *apud* BUENO 2000) e *in vivo* (GROS et al., 1983; CROCKER et al., 1984), nos quais o objetivo era estabelecer como este gene afeta a capacidade do macrófago de inibir a replicação intracelular de patógenos. Foi verificado em ensaios *in vitro*, após a infecção de macrófagos por patógenos intracelulares obrigatórios, que estas células apresentam taxas de infecção e de sobrevivência intracelular distinta, conforme terem sido isoladas de indivíduos resistentes (originam taxas menores) ou susceptíveis (originam taxas maiores), sugerindo ser este um critério de seleção destes indivíduos, nos quais se pretende estudar a influência de genes de resistência (PRICE et al., 1990, CAMPBELL e ADAMS, 1992; QUERESHI et al., 1996; BARTHEL et al., 2001).

Assim, considerando estudos prévios (BRADLEY e KIRKLEY, 1997; CELLIER e GROS, 2004), os quais determinaram modelos e definição dos fenótipos, afetados e não afetados ou resistentes e susceptíveis, o presente estudo selecionou os indivíduos considerados susceptíveis – doentes hansênicos recentemente diagnosticados apresentando sinais clínicos e/ou imunológicos sugestivos de hanseníase clínica, os quais foram classificados em Multibacilares e Paucibacilares, e considerados como resistentes, indivíduos classificados como contatos de doentes e controles (doadores de sangue) sem sinais clínicos e/ou imunológicos de atividade da doença em questão.

A proteína macrofágica associada à resistência natural (do Inglês *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*) – NRAMP1 regula ativação de macrófagos. Um dos seus efeitos pleitrópicos na função do macrófago é regular a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II, bem como, expressão, processamento e apresentação de antígenos protéicos para células TCD4⁺, conforme demonstrado experimentalmente por LANG et al. (1997).

O gene NRAMP1 é um dos genes associados à susceptibilidade do hospedeiro à infecção com *M. leprae*. Este gene codifica uma proteína integral de membrana de 60 kDa, com 12 domínios transmembrânicos, que se localiza em fagolisossomas de macrófagos. A proteína possui vários sítios de fosforilação e

alças extracelulares glicosiladas. Há evidências de que sua função seja de canal iônico transportando íons divalentes através da membrana (LANG et al., 1997; BUENO, 2006).

Outro mecanismo de ação da proteína NRAMP1 seria o transporte de íons para fora do fagolisossoma, transporte este dependente de pH. A diminuição do conteúdo iônico dentro do fagolisossoma, principalmente ferro (Fe^{2+}), Manganês (Mn^{2+}) e Zinco (Zn^{2+}), controlaria a proliferação de microorganismos intracelulares em fagócitos, já que os patógenos utilizam estes íons como co-fatores para a replicação do DNA, produção de importantes enzimas para seu metabolismo e para neutralização dos componentes tóxicos do fagolisossoma e também expressão de diferentes fatores de virulência (GRUENHEID et al., 1995; CANNONE-HERGAUX et al., 1999; JABADO et al. , 2000; FORBES e GROS, 2002).

A NRAMP1 (Resistência Natural Associada à Proteína Macrofágica) define uma família de proteínas extremamente conservada durante a evolução, distribuídas em grupos evolutivos que variam de bactéria ao homem, sugerindo participação fundamental em todos os organismos vivos (VIDAL et al., 1993; CELLIER et al., 1994; SKAMENE et al., 1998).

Em camundongos, uma mutação recessiva no gene NRAMP1, causando a substituição de uma glicina por ácido aspártico na posição 169 do quarto domínio transmembranico, resulta em susceptibilidade a alguns patógenos intracelulares, entre eles o *M. bovis*. O interesse no estudo do polimorfismo do gene NRAMP1 e associação com susceptibilidade para hanseníase é exatamente a influência que ele exerce na apresentação antigênica às células CD4^+ , não somente por meio da expressão de moléculas de MHC Classe II, mas também pela regulação do processo de apresentação de antígenos e conseqüentemente a determinação do padrão de resposta imunológica do hospedeiro à infecção com *M. leprae* (LANG et al., 1997; MEISNER et al., 2001; BUENO, 2006).

3.OBJETIVOS

3.1.GERAL: Estabelecer associação entre a frequência dos haplótipos do gene NRAMP1 e as formas multibacilares da hanseníase.

3.2. ESPECÍFICOS:

a) Avaliar o potencial do gene humano NRAMP1 (Natural resistance-associated macrophage protein) e de seus haplótipos com deleção e inserção de 4 pares de bases na associação com resistência e susceptibilidade para hanseníase entre doentes hansênicos comparados aos contatos de pacientes.

b) Investigar associação da resposta imunológica humoral por meio de ensaio sorológico para o anti-PGL-I com perfil genético dos indivíduos estudados, por meio da frequência dos haplótipos específicos do gene NRAMP1.

4. MATERIAL E MÉTODO

- **População do estudo**

Pacientes com hanseníase e grupo de não doentes representados pelos contatos cosanguíneos (CCOS) e contatos não consanguíneos (CNCOS) foram selecionados das Unidades de saúde dos municípios de Tucuruí, Breu Branco, Curionópolis e Redenção, todos localizados ao sudeste do estado do Pará, após aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas e Carta de Anuência das Secretarias Municipais de Saúde dos municípios visitados. A classificação utilizada para especificar as formas clínicas da hanseníase foi a Classificação de Madri (1953), por meio da qual se dividiu o grupo de pacientes em Multibacilares, incluindo as formas Dimorfa (HD) e Virchowiana (HV) e Paucibacilares, incluindo as formas Indeterminada (HI) e Tuberculóide (HT).

Entre o grupo de pacientes com hanseníase, 71 eram do sexo masculino (71/122-58.19%) com média de idade igual a 44.5 e média dos níveis de anticorpos IgM contra PGL-1 do *Mycobacterium leprae* igual a 0.416 e 51 eram do sexo feminino (51/122-41.80%) com média de idade igual a 41.0 e média dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 igual a 0.197. Destes, 61(61/122-41.80%) foram classificados como multibacilares (MB), sendo 5% da forma virchowiana(HV) e 95.08% da forma Dimorfa(HD). O total de pacientes paucibacilares (PB) foi 27 (27/122-22.13%), sendo 10 do sexo masculino (10/27-37.03%) com média de idade igual a 37.22 e média de anticorpos anti-PGL-1 igual a 0.151 e 17 do sexo feminino (17/27-62.96%) com média de idade igual a 40.56 e média dos anticorpos anti-PGL-1 igual a 0.083. Destes, 15(15/27-55.5%) foram classificados como forma Indeterminada (HI) e 12 (12/27- 44.4%) como forma Tuberculóide(HT).

O grupo de não doentes apresentou 43 indivíduos do sexo masculino (43/110-39.9%) com média de idade igual a 30.99 e média de anticorpos anti-PGL-1 igual 0.095 e 67 eram do sexo feminino (67/110-60.90%) com média de idade 34.52 e média de anticorpos anti-PGL-1 igual a 0.126. Destes, 74 (74/110-67.27%) foram

classificados como contatos cosanguíneos (CCOS) e 36 (36/110-37.72%) como contatos não cosanguíneos (CNCOS).

O grupo de não doentes foi subdividido em contatos cosanguíneos – representado por indivíduos que possuíam algum caso de hanseníase na família e o grupo de contatos não cosanguíneos – representado por indivíduos que não possuíam nenhum caso de hanseníase na família. O grupo de pacientes e contatos foi selecionado no período de fevereiro a março de 2008 a 2011. Todos os indivíduos selecionados passaram por Consulta Médica com os profissionais de saúde dos municípios visitados e foi submetido a exame clínico dermatoneurológico, teste de sensibilidade cutâneo àqueles que apresentaram sinais e/ou sintomas compatíveis com hanseníase. Após assinatura do termo de consentimento Livre e Esclarecido, foi coletado material biológico – sangue total e soro – para realização dos testes imunológico e de genotipagem para os haplótipos do gene NRAMP1.

Dados demográficos como idade, sexo, sexo, procedência, classificação clínica, estado vacinal com BGC, foram obtidos por meio da aplicação de ficha epidemiológica específica para esse fim.

- **Coleta de material biológico**

Aos pacientes encaminhados à nossa equipe do IEC, após assinatura do Termo de Consentimento livre e esclarecido, preencheu-se ficha epidemiológica e realizou-se o exame físico dermatoneurológico bem como o teste de sensibilidade cutâneo, aos indivíduos com um ou mais sintomas de hanseníase. Posteriormente realizou-se a coleta do material biológico, sangue total para procedimentos de amplificação do DNA humano e identificação do tamanho dos polimorfismos estudados, soro e saliva para realização da pesquisa de anticorpos contra PGL-I do *M. leprae* pelo método de enzimaensaio padrão (ELISA).

O material biológico (sangue) foi coletado (10 mL) de uma veia periférica, após antissepsia com álcool a 70% e distribuído em tubos vacutainer com gel (5 mL) e tubos para hemograma contendo anticoagulante (EDTA) (5 mL). As amostras nos tubos com gel foram centrifugadas e acondicionadas em tubos KMA devidamente rotulados e identificados, os quais foram colocados no butijão de Nitrogênio líquido,

após a realização dos testes sorológicos. As amostras de sangue total foram transferidas para tubos de 2 mL devidamente rotulados e identificados, os quais foram também acondicionados no Nitrogênio líquido.

- **Extração de DNA e Genotipagem – PCR**

O DNA humano NRAMP1 foi extraído de amostras de sangue total por meio do DNAzol BD (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Foi analisado um polimorfismo de inserção/deleção de 4 pb (pares de bases) de CAAA de um elemento *Alu* detectado na região 3' não traduzida (3'UTR) do NRAMP1 Buu(1995).

Foram utilizados os primers NB3'F– 5'CTTTAACACAGTGTCTGGCAC3' e NB3'R2 – 5'TCAAGCTCCAGTTTGGAGCCT 3', Buu (1995) para amplificação de um fragmento do DNA que sobrepõe o comprimento do polimorfismo, originando um produto de 159pb quando ocorre a deleção das bases, 163 pb quando ocorre a inserção, 159 pb e 163 pb quando o indivíduo for heterozigoto.

A reação de amplificação com volume final de 25µL foi composta por 2µL do DNA genômico, 2,5µL de tampão da enzima; 0,70µL de MgCl₂, 0,5µL de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs), 1µL de cada primer e 0,2µL de taq DNA polimerase e ocorreu com desnaturação inicial a 92°C/10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 92°C/1,5 min com anelamento a 61°C/1,5 min e extensão a 72°C/1,5 min, após os ciclos foi feita uma extensão a 72°C/10 min. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de poliácridamida 8%.

- **Sorologia para PGL-I**

Os níveis de anticorpos IgM dirigidos contra PGL-1 do *Mycobacterium leprae* foram medidos por meio de ensaio imunoenzimático padrão (ELISA) conforme descrito previamente^{5,6,7,8,9,10}. De forma breve, placas NUNC de 96 poços foram sensibilizadas com antígeno semi-sintético Trisacáride Natural ligado a um radical Fosfato ligado a albumina bovina (NT-P-BSA), lavadas com PBSTween a 0,1% e bloqueadas com 100uL de solução de PBST a 1% de BSA, incubadas a 37°C por 1

hora. Adicionou-se soro de pacientes previamente diluídos com solução de PBST a 10% de soro normal de cabrito (NGS) em concentração de 1: 300 e novamente incubadas a 37°C por 1 hora. As placas foram novamente lavadas com PBST quatro vezes e então se adicionou 50 uL do conjugado anti-IgM humana com a enzima Peroxidase em concentração de 1:2000 e incubou-se novamente a 37°C por 1 hora. As placas foram novamente lavadas quatro vezes com PBST e foi adicionado o substrato tetrametilbenzidine (TMB- Invitrogen) e as placas foram Incubadas em temperatura ambiente e no escuro por aproximadamente **30''min**. Dependendo do substrato este tempo varia bastante. A reação foi parada com a adição de 50 uL da solução de **ácido sulfúrico 2,5N** de H₂SO₄ no soro padrão apresentou absorvância de **450nm**. Amostras consideradas positivas apresentaram média de absorvância ≥ 0.2 e as negativas ≤ 0.2 .

- **Teste Imunocromatográfico de leitura rápida MI Flow**

O teste MI Flow é o mais rápido e facilmente executável ensaio sorológico para hanseníase. É indicado para uso em trabalhos de campo e estudos soro-epidemiológicos, visto que não requer treinamento e/ou equipamento para sua realização, além possuir reagentes estáveis que suportam temperaturas mais elevadas por longos períodos. O teste MI Flow possui uma ótima concordância com o teste ELISA (Kappa = 0.77) BUHRER *et al.* 2003

O teste ML Flow é realizado usando-se 5 ou 10 uL de soro ou sangue total heparinizado e 130 uL do tampão. A reação ocorrerá por meio de um fluxo que se deslocará a partir do receptáculo das amostras até a fita de nitrocelulose. Quando o teste é negativo haverá a formação de uma linha rosa somente na banda do controle e, quando positivo, haverá a formação desta linha na banda do teste e do controle, conforme as figuras abaixo:

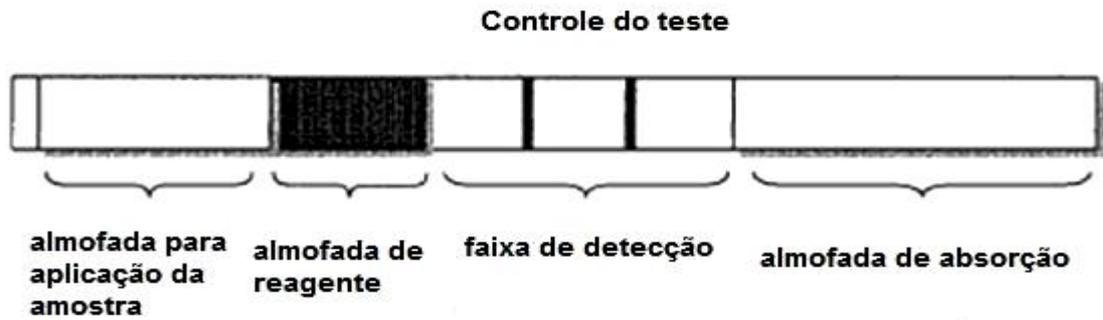


FIGURA V – Diagrama do teste MI Flow. Faixa de detecção de nitrocelulose, Bühner, 1999

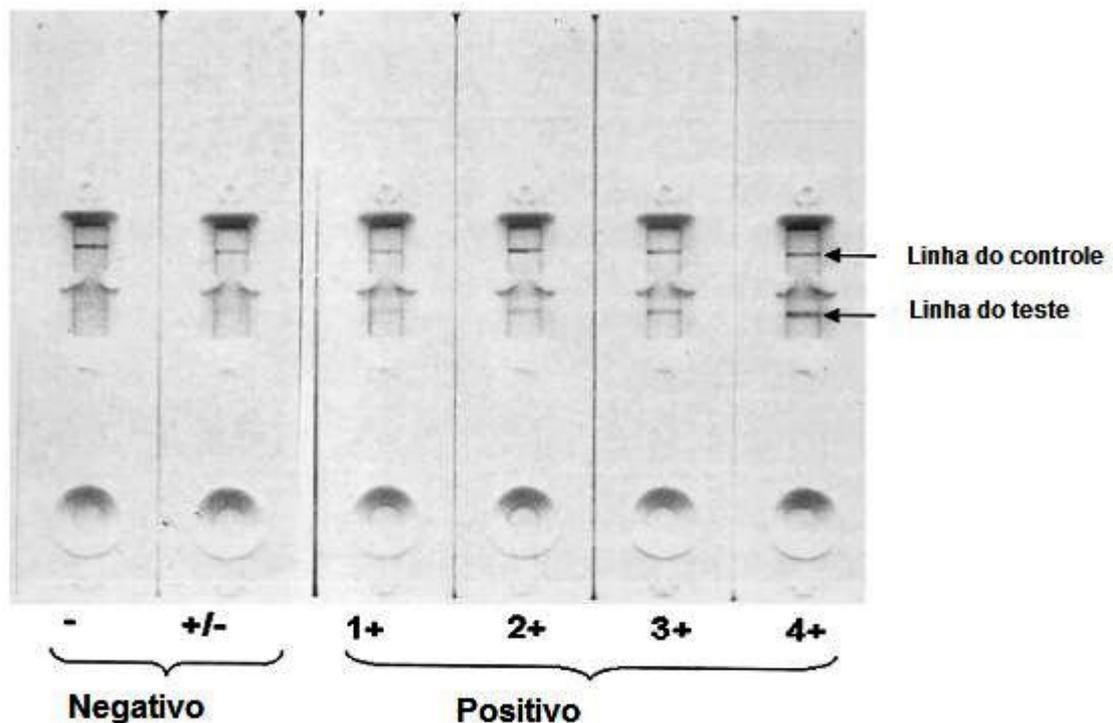


FIGURA VI – Resultado do teste MI Flow. O teste é considerado positivo quando ocorre fixação distinta na linha do antígeno (linhas 1+ até 4+) e negativo quando não se observa fixação (linha -) ou fixação fraca (linha +/-), Bühner, 1999

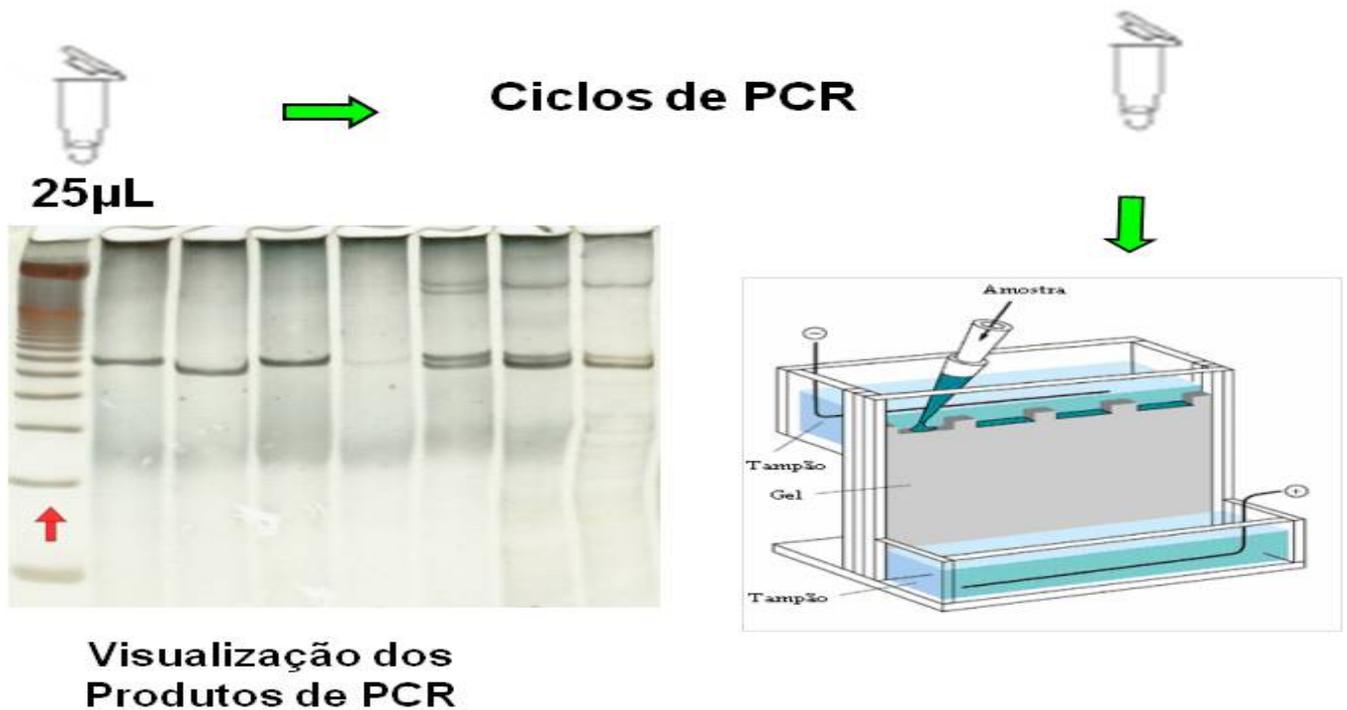


FIGURA VII – Visualização dos Produtos alélicos (haplótipos) do gene NRAMP1 resultantes da reação em cadeia de polimerase (PCR) em gel de poliácridamida a 12% - Laboratório e Biologia Molecular do IEC, 2008

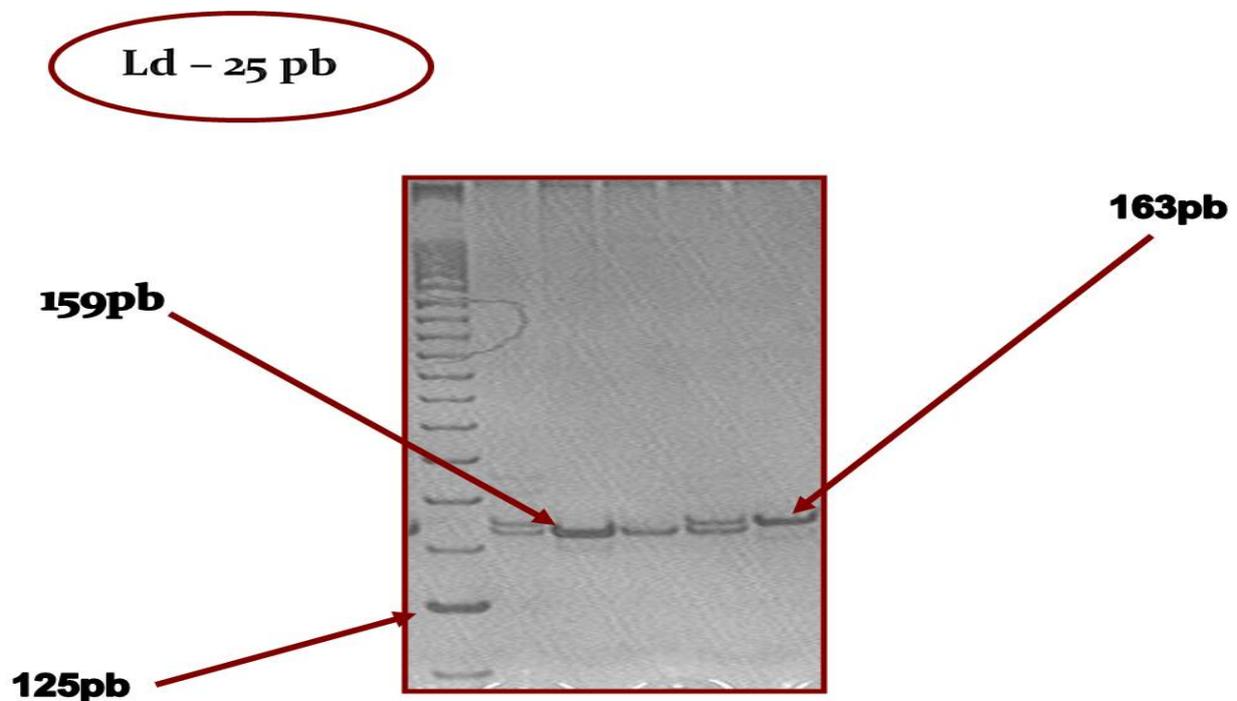


FIGURA VIII – Representação esquemática do reação em cadeia de polimerase (PCR) para o gene NRAMP1 e os produtos resultantes da PCR em gel de poliácridamida 12% - Laboratório de Biologia Molecular do IEC, 2008

- **Seqüenciamento do gene NRAMP1**

O seqüenciamento das amostras foi realizado empregando o método de terminação em cadeia descrito por SANGER et al. (1997). A análise das seqüências foi feita utilizando-se o software BioEdit versão 7.0 (HALL, 1999) para alinhamento e comparação, conforme a seguir: Para confirmação do resultado das PCRs foi feito o seqüenciamento dos fragmentos amplificados de 159pb e 163pb. Foram escolhidas algumas amostras de indivíduos homozigotos para deleção e inserção e heterozigotos. A região seqüenciada e os primers utilizados encontram-se na Figura IX.

```
AGGTTAAGCACTTTAACACAGTGTCTGGCACCTGGGACAAAAACAAACAAACAAACGAAAAACAT
TTCAAAGGTATTTATTGAGCACCTGCAGGCGTGACCTGACAGCCCAAGGGTGGGTGGGGTGAGG
GCTGAGGACTTGGGCGGGACACAGGCTCCAAACTGGAGCTTGAAATAGTGTCTG
```

FIGURA IX: Parte da região 3' não traduzida (3'UTR) do NRAMP1 Buu(1995) que contém a inserção de CAAA indicada pela cor azul. O primer NB3'F indicado em amarelo e o primer NB3'R2 em vermelho.

Para o seqüenciamento foi feita uma 2ª PCR com o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Para 0,75µl de cada primer na concentração 5 pmol foi feita uma reação contendo 1µl do produto da 1ª PCR com os primers NB3'F e NB3'R2, 11µl de água Milli-Q, 1,5µl de tampão 2,5X e 0,75µl do Big Dye. No termociclador foram utilizadas as condições de ciclagem: 96° - 2' + 25 ciclos de: 96° - 45"; 50° - 30"; 60° - 2' + 60° - 2'.

Em seguida foi feita a purificação com *BigDye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) utilizando 2µl do produto da 2ª PCR, 45µl da Sam Solution e 10 µl do XTerminator.

Após a purificação da reação foi feita agitação de 30' a 1800 rpm, centrifugação de 7' a 1000 rpm e então a reação foi submetida ao analisador genético ABI3130 (Applied Biosystems, Tóquio, Japão).

Este projeto gerou um subprojeto, o qual foi desenvolvido para o Programa de Iniciação Científica (PIBIC) do IEC em 2008 e encaminhado ao Comitê de ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas, tendo sido aprovado no dia 10/03/2008, sob o número 0016/2007(ANEXO) . O atual projeto foi encaminhado para avaliação pelo CEP do IEC em 01/06/2009 e também recebeu aprovação pelo Comitê (ANEXO II).

- **Análise Estatística**

As variáveis de predição (X) foram: idade, sexo, classificação dos pacientes, história familiar de hanseníase, cosanguinidade e procedência; as variáveis de desfecho (Y) foram: os níveis séricos de anticorpos anti-PGL-I e o perfil genético para o gene NRAMP1.

Os dados brutos foram organizados em planilhas no Programa computacional *Excel 2000*, contendo idade, sexo, classificação clínica (formas clínicas e categorias de exposição), estado vacinal com BCG, níveis de anticorpos anti-PGL-I e resultado do teste rápido ML Flow em amostras de soro e saliva, resultado para o gene humano NRAMP1 representado pela frequência dos haplótipos de 159pb ou 163pb (homozigotos) e 159pb/163pb (heterozigotos).

Inicialmente foi realizada análise de significância para todas as variáveis estudadas por meio de regressão logística simples com o software EPI-INFO 2000. O nível de significância para cada variável individual associada aos desfechos foi realizado por meio de tabelas 2x2, calculada a Razão de Chances (Odds Ratio), Risco Relativo (RR) e o teste Qui-Quadrado, sendo o nível de significância estabelecido ≤ 0.05 . Análises de concordância foram feitas em relação à idade, sexo, Classificação clínica, positividade ao anti-PGL-1 e frequência dos haplótipos do gene NRAMP1 tipados.

Para o cálculo da estatística descritiva (Média, desvio padrão, erro padrão, etc...) dos níveis de anticorpos anti-PGL-I em amostras de soro e saliva, utilizou-se tanto o Programa Excel 2000 e 2007, quanto o Programa BioStat 5.0. Para esta análise, realizamos o teste *t* (*student*) comparando-se o desempenho do teste anti-PGL-I em amostras de soro e saliva nos diversos grupos – doentes multibacilares (MB, paucibacilares (PB) e contatos de doentes hansenicos (CCOS e CNCOS) avaliando-se o grau das diferenças por meio das médias e concordância dentro dos grupos supracitados por meio do resultado do teste *t*, o qual, quando se obteve valor significativo, juntamente com o *p* valor, considerou-se haver diferença estatisticamente significativa entre os níveis de anticorpos nas amostras de soro e

saliva dentro do mesmo grupo, ou o contrário, quando o teste *t* não foi significativo, considerou-se não haver diferença importante dentro do mesmo grupo.

O exame sorológico de toda a amostra, inclusive dos contatos foi feita através do teste MI Flow somente para triagem inicial e Enzimaimunoensaio - ELISA padrão para medir níveis de anticorpos IgM anti-PGL-1 do *Mycobacterium leprae*. (Bührer *et al.*, 2000). Para maior acuidade quanto à densidade óptica no teste de ELISA, todas as amostras foram testadas em duplicata.

O perfil genético para os alelos polimórficos da região 3'UTR do gene NRAMP1 expressos pela amplificação da seqüência de primers específicos previamente selecionados com produtos de PCR de 159pb e 163 pb, os quais, apresentaram freqüência, nos indivíduos estudados, em forma de um único alelo – 159pb ou 163 pb, indivíduos homozigotos ou os dois alelos conjuntamente, sendo então denominados indivíduos heterozigotos.

5. RESULTADOS

Um total de 122 pacientes com hanseníase e 110 contatos de pacientes procedentes de Tucuruí, Breu Branco, Curionópolis e Redenção, ao sudeste do estado do Pará foram genotipados. Entre os pacientes com hanseníase.

A tabela 1 demonstra a distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 tipados os quais apresentam caráter heterozigoto (159/163pb), homozigoto com a deleção de 4 pares de bases (159pb) e homozigotos com a inserção de 4 pares de bases (163pb) de acordo com a classificação clínica dos indivíduos estudados.

Tabela 1 – Freqüência dos haplótipos do gene NRAMP1 tipados segundo a classificação clínica do estudo, Pará, 2012

Genótipos NRAMP1 3'-UTR	Multibacilar (MB) n (%)	Paucibacilar (PB) n (%)	CCOS n (%)	CNCOS n (%)
159/163pb	34 (40,96)	7 (8,43)	27 (32,53)	15 (18,07)
159pb	36 (45,00)	11 (13,75)	25 (31,25)	8 (10,00)
163 pb	25 (36,26)	9 (13,04)	22 (31,88)	13 (18,84)
Total	95	27	74	36

Obs: Teste Mc Nemar- MBxPB $X^2(A/D)= 20,00$, $p<0,0001$; MBxCCOS - $X^2(A/D)= 32,40$, $p<0,0001$; MBxCNCOS - $X^2(A/D)= 23,26$, $p<0,0001$; PBxCNCOS - $X^2(A/D)= 0,1154$, $p=0,7341$

A tabela 2 mostra resultado da análise da frequência dos haplótipos do gene NRAMP1 com caráter heterozigoto (159/163pb) somados à distribuição do alelo com a deleção de 4 pares de bases(159pb) comparados à frequência do alelo homozigoto com a inserção de 4 pares de bases (163pb) na hanseníase “per se”, comparando-se o grupo de pacientes com hanseníase com o grupo de não doentes, cálculo da Odds ratio (OR), Risco Relativo (RR), teste Qui-quadrado e o valor de p.

Tabela 2 – Distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 heterozigotos (159/163pb) somados à frequência do alelo com a deleção (159pb) comparada à distribuição do alelo com a inserção (163pb) na hanseníase “per se”, Pará, 2012

Genótipos do Gene NRAMP1	Doentes n (%)	Não doentes n(%)	*OR IC(% valor de p
159/163pb + 159pb	88 (53,98)	75 (46,01)	1.21, 0.66 – 2.21 0.51
163 pb	34 (49,27)	35 (50,72)	
Total	122	110	

OBS: *Razão de Chances (Odds Ratio) entre pacientes e não doentes; RR = 1.06 – IC95% 0.89 – 1.25; X²= 0.43; p= 0.51.

A tabela 3 demonstra a distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 heterozigotos somados à frequência do alelo de deleção (159pb) comparados à frequência do alelo com a inserção (163pb) entre pacientes com hanseníase (Multibacilares e Paucibacilares) positivos para o antígeno PGL-1 do *Mycobacterium leprae* e o grupo de não doentes (CCOS+CNCOS) negativos para PGL-1.

Tabela 3 – Distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 heterozigotos somados à frequência do alelo de deleção (159pb) comparados à frequência do alelo com a inserção (163pb) entre pacientes com hanseníase positivos para anti-PGL-1 e contatos negativos para o anti-PGL-1, Pará, 2012

Genótipos do Gene NRAMP1	Positivos para PGL-1		Negativos para PGL-1		
	Doentes n (%)	Não doentes n (%)	OR	IC95%	valor de p
159/163pb + 159pb	23 (62,16)	14 (37,83)	3.83	1.23 – 12.26	0.00087
163 pb	9 (30,00)	21 (70,00)			
Total	32	35			

Obs: RR=1.80, IC95% 1.13 – 2.85; X²=6.87

A tabela 4 mostra análise da frequência do alelo de deleção (159pb) comparado à frequência do alelo de inserção (163pb) entre pacientes multibacilares com PGL-1 positivo e contatos não cosanguíneos (CNCOS) com PGL-1 negativo.

Tabela 4- Distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 portadores do alelo de deleção (159pb) comparados à frequência do alelo com a inserção (163pb) entre pacientes multibacilares positivos para anti-PGL-1 e contatos não cosanguíneos negativos para o anti-PGL-1, Pará, 2012

Genótipos do Gene NRAMP1	Positivos para PGL-1		Negativos para PGL-1		
	Doentes MB n (%)	CNCOS n (%)	OR	IC95%	valor de p
159pb	16 (57,14)	1(12,5)	9.33	0.90 – 230.65	0.025
163 pb	12 (42,85)	7(87,5)			
Total	28	8			

Obs: RR=4.57, IC95% 0.71 – 29.40; X²= 4.98

A tabela 5 mostra análise da frequência do haplótipo do gene NRAMP1 que possui o caráter heterozigoto (159/163pb) somado à frequência do alelo com deleção (159pb) comparada ao alelo com a inserção (163pb) entre pacientes multibacilares PGL-1 positivos e contatos cosanguíneos (CCOS) PGL-1 negativos.

Tabela 5 – Distribuição dos haplótipos do gene NRAMP1 heterozigotos somados à frequência do alelo de deleção (159pb) comparados à frequência do alelo com a inserção (163pb) entre pacientes multibacilares positivos para anti-PGL-1 e contatos cosanguíneos negativos para o anti-PGL-1, Pará, 2012

Genótipos do gene NRAMP1	Positivos para PGL-1		Negativos para PGL-1		
	Doentes MB n (%)	CCOS n (%)	OR	IC95%	valor de p
159/163pb + 159pb	20 (83,33)	9 (39,13)	7.78	1.69 – 38.95	0.0018
163 pb	4(16,66)	14 (60,86)			
Total	24	23			

OBS: RR=2.13, IC95% 1.24 – 3.66; X² = 9.71

Os gráficos I, II, III e IV mostram a correlação entre os níveis de anticorpos anti-PGL-I em amostras de soro e saliva por grupo estudado, bem como, inferência estatística por meio do cálculo do Coeficiente de Correlação de Pearson e *p* valor.

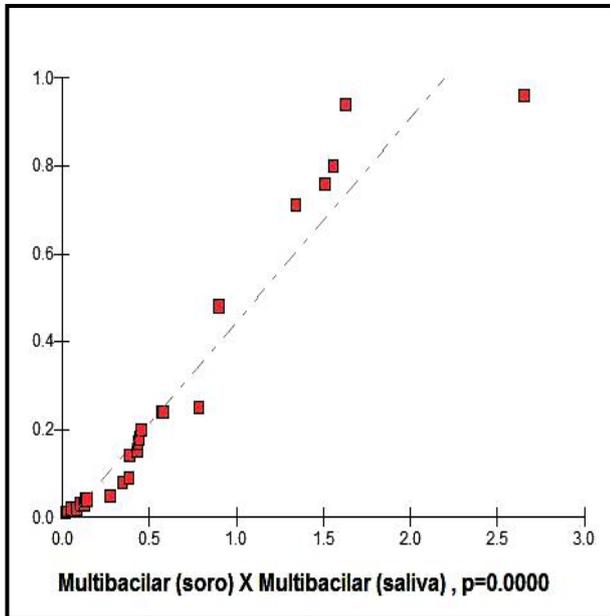


Gráfico I – Níveis de anticorpos IgM contra PGL-I do *M.leprae* em amostras de soro e saliva entre doentes hansênicos Multibacilares, Pará,2009

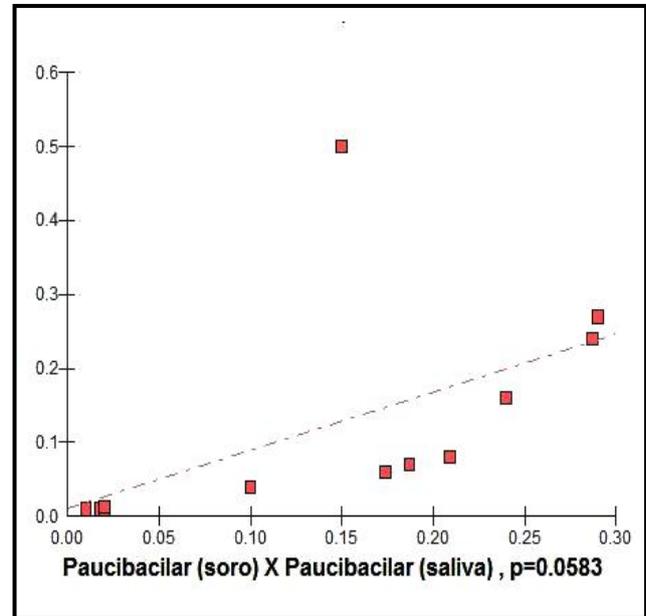


Gráfico II – Níveis de anticorpos IgM contra PGL-I do *M.leprae* em amostras de soro e saliva entre doentes hansênicos Paucibacilares, Pará,2009

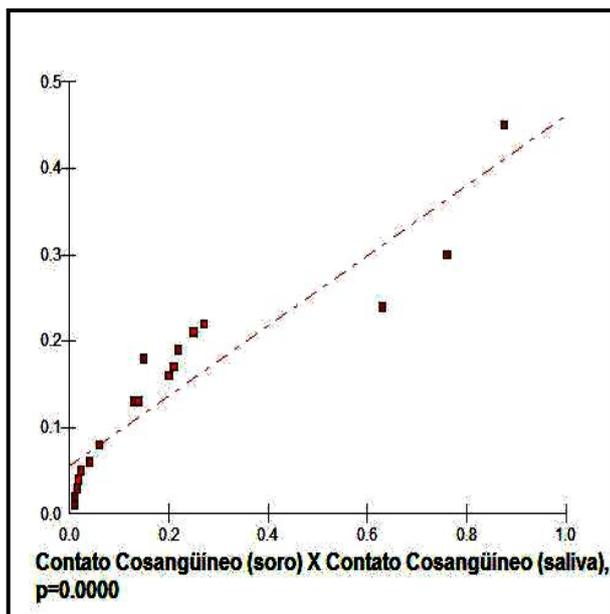


Gráfico III – Níveis de anticorpos IgM contra PGL-I do *M.leprae* em amostras de soro e saliva entre Contatos Co-sangüíneos , Pará,2009

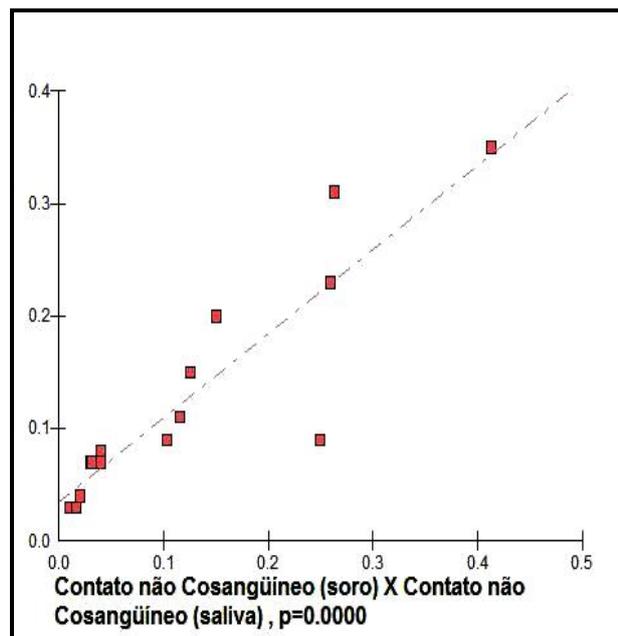


Gráfico IV – Níveis de anticorpos IgM contra PGL-I do *M.leprae* em amostras de soro e saliva entre Contatos Não Co-sangüíneos , Pará,2009

6. DISCUSSÃO

Hanseníase é doença infecciosa crônica que possui histórico de endemicidade no mundo, região das Américas, Brasil e estado do Pará, a qual se mantém presente por muitos anos, mesmo depois do advento do tratamento poliquimioterápico na década de 80 e disponibilização de métodos diagnósticos nas unidades de referência no tratamento da hanseníase (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; ENDO, H., 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Avaliar a situação epidemiológica da endemia hanseníase no Brasil foi possível por meio da análise do Coeficiente de detecção de casos novos e Taxa de prevalência anual, constante em séries históricas de 10 ou 20 anos a partir da década de 80, após a implantação do tratamento multidroga recomendado pela Organização Mundial de saúde (OMS - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004, 2008).

O tratamento poliquimioterápico reduziu consideravelmente a prevalência global e, mais recentemente, dos anos 90 em diante, tem sido possível se vislumbrar a redução da taxa de detecção de casos novos em algumas regiões do Brasil, embora permaneçam índices elevados em municípios das regiões norte, nordeste e centro-oeste, evidenciando focos de transmissão ativa nesses locais, mesmo com o Programa de Controle da hanseníase implantado e disponível à população, bem como, métodos básicos de diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

O diagnóstico da hanseníase, embora seja eminentemente clínico, em determinadas ocasiões, é necessária a disponibilização de métodos mais efetivos e capazes de identificar portadores de formas potencialmente multibacilares não identificáveis facilmente apenas com dados clínicos, tal fato refletirá de forma positiva ou negativa na credibilidade do serviço de saúde no momento de se determinar tratamento com duração de seis meses ou doze meses (BÜHRER, 1998, 2000, 2001, 2003, 2008; CALADO et al., 2005).

Além disso, ações de vigilância epidemiológica são fundamentais para que se possa vislumbrar a redução dos casos potencialmente transmissíveis nas comunidades nas quais a doença é endêmica. Desta forma métodos que forneçam dados preditores do risco de adoecimento por formas graves da hanseníase podem ser instrumentos importantes para monitorar e potencializar o efeito das intervenções epidemiológicas nas comunidades que ainda convivem com elevadas taxas de prevalência e detecção da hanseníase (ARAÚJO M.G., 2003; BÜHRER et al., 1998).

Neste estudo de associação genética referente a dois polimorfismos do gene humano NRAMP1 com susceptibilidade para hanseníase “per se” e às formas clínicas da doença, dois métodos foram utilizados para que se pudesse analisar a taxa de exposição/infecção na população estudada por meio da pesquisa de anticorpos IgM contra PGL-I do *M. leprae* em amostras séricas e salivares, bem como susceptibilidade/resistência para hanseníase por meio da análise da frequência dos haplótipos polimórficos do gene NRAMP1 estudados por BUU et al.(1995) nesta população.

Realizou-se então correlação dos dados imunológico/sorológicos relativos à soropositividade ao anti-PGL-I e frequência dos haplótipos do gene NRAMP1 (inserção/deleção) no grupo de doentes comparado ao grupo de não doentes e, desta forma, estabelecer instrumentos passíveis de serem usados como complementos ao diagnóstico da doença, mas principalmente como ferramentas para a vigilância epidemiológica da hanseníase no estado do Pará.

Análise do resultado da positividade ao teste anti-PGL-I por meio da pesquisa de anticorpos da classe IgM contra PGL-I do *M. leprae* em amostras de soro e saliva apresentou correlação positiva ($p = 0.0000$) para os grupos Multibacilares, Contatos Cosangüíneos e Contatos não Cosangüíneos (Gráficos I, III e IV), o que demonstra que estes indivíduos apresentam sinais de infecção recente comprovada pelo fato de que os pacientes eram casos novos recentemente diagnosticados; a correlação positiva para os grupos de contatos Cosangüíneos e não Cosangüíneos sugere que

há índices elevados de transmissão ativa nos locais estudados (NAGAO-DIAS et al., 2007; BÜHRER et al., 2008; BONFITO et al., 2009).

Estudos de mapeamento genético demonstraram o *locus* do cromossomo 1 do camundongo (Ity, Lsh, Bcg) o qual controla capacidade do macrófago em restringir a replicação de parasitos intracelulares antígenicamente não relacionados e determina resistência natural (BCG-R, dominante) ou susceptibilidade (BCG-S, recessivo) de cepas de camundongo para infecção com diversos patógenos, incluindo várias espécies de micobactérias, *Salmonella Typhimurium* e *Leishmania donovani*. No estudo de Malo *et al* (1994) foi feita clonagem posicional no mapeamento genético e físico para isolar o gene candidato para Bcg (Nramp1) o qual codifica uma proteína de transporte macrófago-específica (BLACKWELL et al.,1980; MALO et al.,1994; VIDAL et al.,1993; CELLIER et al.,1994; MEISNER et al.,2000).

Estudo realizado no oeste africano mostrou claramente associação do polimorfismo do gene NRAMP1(1729+55del4, uma deleção de TGTG na região 3' não traduzida, uma transversão de nucleotídeo único no íntron4 – 469+14G/C e um CA microssatélite na região 5' do gene) com as formas clínicas da hanseníase, no qual se observou número significativo de pacientes heterozigotos entre as formas multibacilares, inclusive, o mesmo polimorfismo já havia demonstrado associação com a tuberculose pulmonar escarro positiva em estudo anterior (MEISNER et al.,2000; BELLAMY et al.,1998).

Outros estudos de associação genética não encontraram significância na susceptibilidade para hanseníase em famílias da Polinésia Francesa e Paquistão (ROGER et al 1997; SHAW et al 1993), mas esse fato não invalida estudos que encontraram esta diferença e não significa que não há associação com hanseníase, pois a validação na estratificação e tamanho da população de pacientes e o fato de que as variações testadas não serem polimórficas nessas populações são fatos importantes a serem considerados (MEISNER et al.,2000; CELLIER e GROS, 2004; GROS et al.,1983).

A distribuição das freqüências dos haplótipos do gene NRAMP1 tipados revela diferenças significativas nos percentuais entre os grupos estudados. Análise da freqüência dos alelos com 159/163pb somado à freqüência do alelo 159pb entre pacientes multibacilares comparado ao grupo paucibacilar apresentou valor do teste (McNemar) dos pares discordantes, $X^2(A/D)= 20.00$ e valor de $p < 0.0001$, o mesmo acontecendo para os grupos MBxCCOS - $X^2(A/D)= 32.40$ e valor e $p < 0.0001$: MBxCNCOS - $X^2(A/D)= 23.26$ e valor e $p < 0.0001$. Somente para o grupo PBxCNCOS não houve significância estatística, $X^2(A/D)= 0.1154$ e valor e $p =0.7341$, fato que sugere que o perfil genético e imunológico dos indivíduos classificados como paucibacilares é realmente diferenciado do grupo MB, sendo que neste último, o polimorfismo do gene humano NRAMP1 estudado pode estar contribuindo para susceptibilidade para hanseníase (BLACKWELL et al.,1995; LANG et al.,1997; ABEL et al., 1998 , MEISNER et al., 2001; REMUS et al.2003; FERREIRA et al.2004; BACKER et al., 2005).

Roger et al(1997) realizou estudo de ligação para análise de susceptibilidade para hanseníase “per se” com nove polimorfismos do gene NRAMP1 e três marcadores polimórficos fisicamente ligados, marcadores de microssatélites polimórficos D2S104, D2S173 e D251471. Análises de ligação foram feitas usando pares de irmãos afetados e métodos de pontuação por LOD score empregando diversos modos de herança com penetrância completa e reduzida. Este estudo não encontrou significância na associação do polimorfismo estudado com hanseníase em famílias da Polinésia Francesa.

Shaw et al (1993) utilizou um painel de marcadores na região do cromossomo humano 2q33-Q37 conhecido por ser conservado e conter região do cromossomo murino 1. Conjunto de marcadores utilizados foram CRYGP1, MAP2, FN1, TNP1, VIL1 e DES e entre os pares adjacentes de região mais distal(2q35-Q57) definiu COL6A3, D2S55 e D2S3, e também não encontrou significância na associação deste polimorfismo com hanseníase.

Associação do genótipo do NRAMP1 tipado neste estudo, como a maioria dos estudos de associação genética com hanseníase, não encontrou significância estatística para hanseníase “per se” ($p=0.51$) Tabela 2, ROGER et al (1997), SHAW

et al. 1993; MEISNER et al., 2000; BAKKER et al., 2005), porém quando esta análise foi ampliada com dados de sorologia positiva para anti-PGL-1, observou-se significância estatística para hanseníase “per se” ($p= 0.0087$) e Risco Relativo (RR) considerado de efeito moderado (RR= 1.80, IC95% - 1.13 – 2.85; $X^2= 6.87$) Tabela 3, achado semelhante foi também encontrado no estudo de Ferreira et al., (2004) o qual utilizou a reação de Mitsudina para determinar indivíduos com predominância de resposta imunológica do tipo Th1 (celular) e, desta forma, separando com maior precisão casos paucibacilares dos multibacilares que, neste estudo utilizou o antígeno PGL-1 do *Mycobacterium leprae* para discriminar indivíduos potencialmente multibacilares dos paucibacilares, já que o PGL-1 discrimina a imunidade predominantemente humoral.

Alguns estudos de ligação familiar e associação genética com hanseníase mostraram que algumas variações polimórficas do gene NRAMP1 testadas associou às formas multibacilares não somente o caráter heterozigoto, mas principalmente, o fato de o indivíduo ser portador de pelo menos um alelo de deleção BLACKWELL et al (1995), LANG et al (1997), ABEL et al (1998), MEISNER et al (2001), REMUS et al (2003), FERREIRA et al (2004), BAKKER et al (2005). Neste estudo observou-se forte associação entre a frequência do alelo com a deleção de CAAA de um elemento Alu da região 3' e hanseníase multibacilar com PGL-1 positivo comparada aos contatos não cosangüíneos (CNCOS) com PGL-1 negativo e portadores do alelo com a inserção ($p=0.025$) tabela 4. O risco de um indivíduo multibacilar PGL-1 positivo fazer parte do grupo com a deleção foi 4.57 vezes maior comparado ao grupo de CNCOS, considerado um risco forte do ponto de vista epidemiológico. Tal fato é relevante nas regiões endêmicas, pois isso representa mais um instrumento laboratorial para uso nas ações de vigilância epidemiológica da hanseníase.

Diferenças significantes também foram encontradas neste estudo quando se comparou pacientes multibacilares heterozigotos ou portadores do alelo com a deleção (159pb) PGL-1 positivos com o grupo de contatos cosangüíneos portadores do alelo com a inserção e PGL-1 negativos ($p=0.0018$) Tabela 5. É interessante observar que o grupo de CCOS representado por indivíduos que possuem casos de hanseníase na família apresentam semelhanças com o grupo de multibacilares nas frequências dos alelos com a inserção e deleção – heterozigotos (159/163pb) e com

a delação (159pb) Tabela 1, o que sugere que a transferência de genes com as variações polimórficas pode ser real nesta população e incita a necessidade de estudos mais profundos para apuração destes fatos BLACKWELL et al.,1995; LANG et al.,1997, ABEL et al., 1998; MEISNER et al., 2001; REMUS et al., 2003; FERREIRA et al., 2004; BAKKER et al.,2005).

Perguntas permanecem sobre a validação da estratificação da população de pacientes na ausência de um efeito total, considerando ser a hanseníase multifatorial. Um estudo de associação feito na população indiana não encontrou associações entre os polimorfismos da região 5' do gene NRAMP1 e hanseníase; é provável que este achado possa ser devido ao fato de que as variações testadas não eram muito polimórficas nesta população Indiana (MEISNER et al., 2001).

Embora a hanseníase seja uma doença infecciosa multifatorial, o componente genético parece ter importância crucial no desenvolvimento das formas graves da doença, principalmente, quando se relaciona os conhecidos efeitos pleiotrópicos exercidos pelo gene NRAMP1 sobre a resposta imune do hospedeiro, aspectos explicados com detalhe no trabalho experimental de LANG et al. (1997), o qual descreve os efeitos da proteína NRAMP1 no “estouro” oxidativo do macrófago e sua ação precoce nos caminhos da ativação macrofágica.

A função precisa da proteína NRAMP1 não está ainda bem explicitada, mas análises estruturais e estudos imuno-citoquímicos com anticorpos específicos mostraram que a NRAMP1 se localiza nas membranas de endossomas tardios e lisossomas e, ocorrendo fagocitose, a proteína se desloca para as membranas fagossomais (GRUENHEID et al. 1997; SCARLE et al. 1998; BLAKCWELL e SCARLE, 1999).

Existem evidências de que, em camundongos, com alelo susceptível do NRAMP1, ocorre multiplicação exacerbada de microorganismos nos macrófagos, devido a alterações conformacionais da proteína que impede seu direcionamento para endossomas tardios/lisossomas, ficando a mesma retida no retículo endoplasmático (WHITE et al., 2004). E desta forma, não realiza a sua função de ativação das células do sistema imune para uma resposta competente, contribuindo

para a disseminação do patógeno no interior do macrófago, determinando perfil de resposta basicamente humoral e, conseqüentemente, levando às formas graves da hanseníase TABELA 4.

Os níveis de anticorpos anti-PGL-I obtido da população de doentes hansênicos multibacilares e paucibacilares e grupo de não doentes – contatos de doentes hansênicos(CCOS e CNCOS) por meio dos testes imunológicos, Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e teste imunocromatográfico de leitura rápida (ML Flow), foram compatíveis, na maioria, com a condição clínica dos grupos e concordante com achados na literatura (BÜHRER et al., 2000; 2001; GOULART et al., 2002; SOEBONO et al., 1991).

6. CONCLUSÕES

- Este estudo de associação genética realizado com indivíduos residentes em áreas de alta endemicidade para hanseníase mostrou a importância do componente genético no padrão de resposta imune à infecção com *M. leprae* utilizando-se marcadores previamente descritos, tanto para hanseníase “per se”, quanto para associação de susceptibilidade para os subtipos da doença, além de ter sido concordante com a literatura em relação ao fato de que, apesar da susceptibilidade murina com o Nramp1, estar diretamente relacionada com a mudança de um aminoácido e ser um efeito homozigoto recessivo, trabalhos na literatura sugere a possibilidade de que este seja um efeito heterozigoto em humanos;
- Diferença estatisticamente significativa foi encontrada na análise da associação genética do gene NRAMP1 3’UTR com susceptibilidade para hanseníase, a qual não foi testada em trabalhos anteriores, comparando-se pacientes multibacilares com o grupo de não doentes (CCOS e CNCOS), achado semelhante com estudos anteriores, sugerindo haver uma diferença importante entre indivíduos heterozigotos e homozigotos, especialmente os

portadores de pelo menos um alelo de deleção para o polimorfismo estudado do gene NRAMP1.

- A pesquisa de anticorpos IgM contra PGL-I do *M. leprae* é um teste que avalia a imunidade humoral e um ótimo sinalizador de pacientes multibacilares, ainda que os aspectos clínicos, em virtude do grau de evolução da doença, ainda não aponte ser um caso potencialmente multibacilar. O estudo de associação genética que aponta susceptibilidade para um gene candidato associado com dados imunológicos nos parece pertinente e interessante e, neste estudo específico, apontou diferenças significantes do ponto de vista estatístico.
- Os marcadores genéticos da região 3'UTR do gene NRAMP1 foram bastante promissores para encontrarmos diferenças significantes nas análises de associação com susceptibilidade para hanseníase nas áreas endêmicas por nós estudada. A otimização da técnica de PCR e seqüenciamento forneceu exatamente os produtos alélicos descritos anteriormente na literatura.
- O polimorfismo estudado para o gene humano NRAMP1 resultando em produtos alélicos de 159 pb (deleção) e 163 pb (inserção) podem vir a ser marcadores genéticos que poderão ser utilizados para análise e predição de risco de adoecimento por formas graves da hanseníase em populações residentes em áreas endêmicas. Há necessidade, entretanto, de ampliação da amostra para confirmação do efeito na susceptibilidade para hanseníase.
- A análise dos níveis de anticorpos anti-PGL-I nas amostras de saliva também pode ser instrumento valioso para uso nas ações de vigilância epidemiológica e monitoramento dos indivíduos clinicamente sadios, especialmente se combinado com métodos de Biologia Molecular, os quais podem avaliar infecção recente nas amostras de saliva e possível estado de infectado ou infeccioso pela análise de amostras de swab nasal em conjunto com dados clínicos.

- Este estudo de associação genética mostrou que o polimorfismo estudado, embora não tenha sido testado para avaliar susceptibilidade para hanseníase anteriormente, mostrou forte associação com hanseníase multibacilar comparada com a paucibacilar e com o grupo de não doentes. É um achado relevante em áreas endêmicas, pois suscita necessidade da realização de estudos de ligação e associação genética para melhor entendimento dos mecanismos de manutenção de altos índices da doença nessa região e possibilita proposições para vigilância epidemiológica da hanseníase.

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABEL, L.; SANCHEZ, F.O.; OBERTI, J.; THUC, N.V.; HOA, L.V.; LAP, V.D.; SKAMENE, E.; LAGRANGE, P.H.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. **J. Infect. Dis.** United States v. 177, supl. 1, p. 133-145, jan, 1998

ALCAIS, A., MIRA, M., CASANOVA, J.L., SCHURR, E., ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Curr Opin Immunol.** v.17, p.44-8, 2005

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. Leishmania species models of intracellular parasitism. In: BUENO, R. Estudo do gene NRAMP1 canino em Macrófagos infectados com *Leishmania chagasi*, 2006, 105 f. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária da Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006

ANANIAS, M.T.P. **Hanseníase**: estudo da reação tipo I do anti-PGL-1 nos pacientes do Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 1998. .. f. **Dissertação** (Mestrado em Dermatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v. 36, supl.3, p. 90-102, 2003

BAKKER, M. Epidemiology and prevention of leprosy: a cohort study in Indonesia. 2005, 165 f. **Tese** (Doutorado). Departamento de Pesquisa Biomédica. Royal Tropical Institute., Amsterdam, 2005

BARTHEL, R.; FENG, J.; PIEDRAHITA, J.A. et al. Stable transfection of the bovine NRAMP1 gene into murine RAW264.7 cells: effect on *Brucella abortus* survival. **Infect. Immun.**, v.69, n.5, p.3110-9, 2001.

BELLAMY, R.J. **Susceptibility to Infectious diseases**: the importance of host genetics. Ed. Cambridge University Press, 398 f, 2004

BLACKWELL, J.M. Genetics of host resistance and susceptibility to intramacrophage pathogens: a study of multicase families of tuberculosis, leprosy and leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Int. J. Parasitol.**; England, v. 28, supl.1, p.21-28, jan., 1998b

BONFITO, N.L.B., MOTTA, A.C.F., FURINI, R.B., KOMESU, M.C., NASCIMENTO, M.M.P., FIGUEIREDO, J.F.C., FOSS, N.T. Determination of the salivary Anti-Phenolic Glycolipid-1 Antibody in Leprosy patients as a tool to Monitoring Multidrugtherapy. **American Journal of Infectious Diseases**. v.5 (4):p.314-319, 2009

BRADLEY, D.J.; KIRKLEY, J. Regulation of *Leishmania* populations within the host. I. The variable course of *Leishmania donovani* infections in mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v.30, n.1, p.119-29, 1977.

BRIGHTBILL, H.D., LIBRATY, D.H., KRUTZIK, S.R., YANG, R.B., BELISLE, J.T., BLEHARSKI, J.R. *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**. V.285, p. 732-6, 1999

BRITTON, W.J., LOCKWOOD D.N. Leprosy. **Lancet**. v.04;, supl.363, p.1209-19. 2004

BUENO, R. Estudo do gene NRAMP1 canino em Macrófagos infectados com *Leishmania chagasi*, 2006, 105 f. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária da Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006

BUHRER, S. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae*. 1998, 123 f. **Tese** (Doutorado em Imunologia) Departamento de Pesquisa Biomédica. Royal Tropical Institute., Amsterdam, 1998.

_____. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation. **Immunol. Med. Microbiol.** Netherlands, v. 21, supl. 3, p. 197-201, jul. 1998.

_____. Use of MI Dipstick as a tool to classify leprosy patients. **Int. J. Lepr Other Mycobact. Dis.** Unated States, v.68, supl. 4, p.456-63, dez. 2000.
 BUHRER, S.; CUNHA, M.G.; FOSS N.T.; OSKAM L, FABER W.R.; KLATSER P.R. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Trop. Int. Health.** England, v. 6, p.317-326, abr. 2001.

BUHRER, S.S.; SMITS, H.L; GUSSENHOVEN, G.C.; LEEUWEN, J.V.; AMADOR, S.; FUJIWARA, T.; KLATSER, P.R.; OSKAM, L.A. A simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with risk of developing leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** United States, v.41, supl. 5, p.1991-95, maio, 2003.

BUHRER, S.S., VAN BEERS, S., OSKAN, L., LECCO, R., MADEIRA, E.S., DUTRA, A.L., *et al.* A relação entre soroprevalência de anticorpos contra o glicolípido fenólico-I entre crianças em idade escolar e endemicidade da hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.41(II), p. 81-88, 2008

BUU, N.T.; CELLIER, M.; GROS, P.; SCHURR, E. Identification of a highly polymorphic length variant in the 3'UTR of NRAMP1. **immunogenetics**. Canada, v.42, p. 428-429, may.1995

CALADO, K.L.S.; SÉKULA, S.B.; VIEIRA, A. G.; OLIVEIRA, M.L.W.; DURÃES, S. Positividade Sorológica anti-PGL-I em contatos domiciliares e peridomiciliares de hanseníase em área urbana. **Anais Brás Dermatol**, vol. 80, supl. 3, p.301-6, 2005

CHARLES, K.J. O comprometimento Neural na Hanseníase - **13º Congresso Internacional sobre hanseníase**, Haia, Holanda, 1998

CELLIER, M. e GROS, P. **The NRAMP1 Family**. Ed. Eureka, Québec, Canadá, 200 f., 2004

CELLIER, M.; GOVONI, G.; VIDAL, S. *et al.* Human Natural resistance associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. **J.Exp.Med**; vol.180, supl.5, p.1741-52, 1994

CHEMOUILLI, P., WOODS, S., SAID, G., COLE, S.T. Detection of *Mycobacterium leprae* in nerve lesions by the polymerase chain reaction. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. v. 64, p.1-5, 1996

CAMPBELL, G.A.; ADAMS, L.G. The long-term culture of bovine monocytederived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.34, n.3-4, p.291-305, 1992.

CANONNE-HERGAUX, F.; GRUNHEID, S.; GOVONI, G. *et al.* The NRAMP1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v. 111, supl. 4, p. 283 – 289, 1999

CASTELO, A.A.M.C., TROMBONE, A.P.F., ROCHA, C.D., LORENZI, J.C.C. Resposta Imune a doenças infecciosas. **Medicina (Ribeirão Preto)**. v.42(2), p. 127-42, 2009

CELLIER, M.; GOVONI, G.; VIDAL, S. et al. Human natural resistance associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissuespecific expression. **J. Exp. Med.**, v.180, n.5, p.1741-52, 1994.

COLE, S.T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K.D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P.R. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**. v. 393, p. 537-544, 1998

COLE, S.T.; BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHUERCHER, C.; HARRIS, D. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**. v. 393, p. 537-544, 1998.

COSTA, R.S.N. Considerações sobre o envolvimento da cavidade bucal na hanseníase. **Hansen Int.** v.33 (1),p.41-4, 2008

COOKE, G.S. e HILL, A.V.S. Genetics of susceptibility to human infectious disease. **Nat Rev Genet.** v.2, p.967–77, 2001

CROCKER, P.R.; BLACKWELL, J.M.; BRADLEY, D.J. Transfer of innate resistance and susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mouse radiation bone marrow chimaeras. **Immunology**, v.52, n.3, p.417-22, 1984

CRUVINEL, W.M., JÚNIOR, D.M., ARAÚJO, J.A.P., CATELAN, T.T.T., SOUZA, A.W.S., SILVA, N.P. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da Imunidade Inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Re Brás Reumatol.** v.50(4), p. 434-61, 2010

DEMANGEL, C. e BRITTON, W.J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. **Immunol Cell Biol.** v.78, p. 318–24, 2000

DOCKRELL, H.M. ; BRAHMBHATT, S.; ROBERTSON, B.D.; BRITTON, S.; FRUTH, U.; GEBRE, N. *et al al.* postgenomic approach to identification of *Mycobacterium leprae*-specific peptides as T-cell reagents. **Infection. Immun.** V.68, p. 5846 – 5855, 2000

ENDO, Hiroyshi. For the elimination of leprosy nº 12. [S.I.] WHO SPECIAL AMBASSADOR'S NEWSLETTER; 2004. Disponível em: <<http://www.com.br/Nippon.zaidan.info/seikabtsu/2004/00003/contents/0002.htm>> Acesso em: 22 fev.2005, 1:05:03

FLEISCHMANN, R.D.; ALLAND, D.; EISEN, J.A.; CARPENTER, L.; WHITE, O.; PETERSON, J. *et al.* whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. **J. Bacteriol.** v. 184, p. 5479-5490, 2002.

FERREIRA, F.R.; GOULART, L.R.; SILVA, H.D.; GOULART, I.M. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 72, supl. 4, p. 457-467, dec., 2004

FORBES, J.R.; GROS, P. Divalentmetal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. **Rev. Trends Microbiol.**, v.9, n.8, p.397-403, 2001.

FOSS, N.T. Aspectos Imunológicos na hanseníase. **Simpósio Hnaseníase, cap II.** 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 erythemanodosum leprosum. **Int J Lepr.** v.61, p.218-26, 1993

GALLO, M.E.N.; RAMOS JÚNIOR, L.A.M.; ALBUQUERQUE, E.C.A. *et al.* Allocation of leprosy patients for Multidrugtherapy: Correlation between the classification according to number of skim lesions and the skim smears examination. **Anais. Bras. Dermatol.** Vol.78, supl.4, p.415-424, 2003

GARNIER, T.; EIGLMEIR, K.; CAMUS, J.C.; MEDINA, N.; MANSOOR, H.; PRYOR, M. *et al.* The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. **PNAS, Microbiology**, vol. 100, supl. 13, p. 7877-7882, 2003

GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; FRANKEN, K.L.M.C.; WIELES, B.; AREND, S.M.; FABER, W. R.; NAAFS, B.; OTTENHOFF, T.H.M. Immunological cross reactivity of the *Mycobacterium leprae* CFP-10 with its homologue in *Mycobacterium tuberculosis*. **Scand. J. Immunol.** V.59, p. 66 -70, 2004

GELUK, A.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; FRANKEN, K.L.M.C.; SUBRANTO, Y.W.; WIDES, B.; AREND, S.M.; SAMPAIO, E.P.; DE BOER, T.; FABER, W.R.; NAAFS, B.; OTTENHOFF, T.H.M. Identification and characterization of the ESAT-6 homologue of *Mycobacterium leprae* and T-cell cross reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** V.70, p. 2544-2548, 2002

GELUK, A.; KLEIN, M.R.; FRANKEN, K.L.M.C.; VAN MEIJGAARDEN, K.E.; WIELES, B.; PEREIRA, K.P.; BUHRER-SÉKULA, S.; KLATSER, P.R.; BRENNAN, P.J. SPENCER, J.S.; WILLIAMS, D.L.; PESSOLANI, M.C.V.; SAMPAIO, P.; OTTENHOFF, T.H.M. Postgenomic Approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. **Infect. And Immunity**. Netherlands, v. 73, supl. 9, p.5636-5644, sept.,2005

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta immune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v.35, supl 4, p. ago. 2002.

GROS, P.; SKAMENE, E.; FORGET, A. Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). **J.Immunol.**, v.131, n.4, p.1966-72, 1983.

GRUENHEID, S.; CELLIER, M.; VIDAL, S. *et al.* Identification and Characterization of a second mouse Nramp gene. In : BUENO, R. Estudo do gene NRAMP1 canino em Macrófagos infectados com *Leishmania chagasi*, 2006, 105 f. **Tese** (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária da Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006

HALL, T. A. BioEdit: a user –Friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. v.41, p. 95-98, 1999

HASTINGS, R.C.; OPRMOLLA, D. V. A. **Leprosy**. Ed.2, New Orleans: Churchill Livingstone, 1994, p. 49 – 76

JABADO, B.N.; JANKOWSKI, A.; DOUGAPARSAD, S. *et al.* Natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pHdependent the phagosomal membrane. **J. Exp. Med.**, v.192, p.1237-47, 2000.

KASLOW, A., MCNICHOLL, J., HILL, A. V. S. **Genetic Susceptibility to Infectious Diseases**. Ed. Oxford University Press US, 447 f, 2008

KLATSER, P.R.; CHO S.N.; BRENNAN P.J. The contribution of serological tests to leprosy control. **Int. J. Lepr. Other Mycobact.Dis**. United States, v.64, p.63-66, 1996.

KRUTZIK SR, TAN B, LI H, OCHOA MT, LIU PT, SHARFSTEIN SE, *et al.* TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat Med**. v.11, p.653-60, 2005

LAGRANGE, P.H. & ABEL, L. The genetic susceptibility to leprosy in humans. **Acta Leprol.** Switzerland; v. 10, supl. 1, p. 11 – 27, 1996

LANG, T.; PRINA, E.; SIBTHORPE, D. e BLACKWELL, J.N. Nramp1 Transfection Transfer *Ity/Lsh/Bcg*-related Pleiotropic Effects on Macrophage Activation: Influence on Antigen Processing and Presentation. **Infection and Immunity**, vol. 65, supl 2, p.380-386, 1997

LAURENT, A.; DESSEIN, A.J. Genetic Epidemiology of infectious Diseases in humans: Design of population based studies. **Emergin Infectious Diseases**. vol. 4, supl. 4, 1998

LEVY, L. e JI, B. Técnica de La Inoculación Em Almohadilla Plantar para cultivo Del *Mycobacterium leprae*. **Revista de leprologia de Fontilles**, vol. XXV, supl. 5, p.407-432, 2006

LISSNER, C.R.; SWANSON, R.N.; O'BRIEN, A.D. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonellatyphimurium*: expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. **J. Immunol.**, v.131, n.6, p.3006-13, 1983.

MACHADO, P.R.L., ARAÚJO, M.I.A.S., CARVALHO, L., CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An Brás Dermatol.** V.79 (6), p.647-664, 2004

MADEIRA, S. Aspectos Microbiológicos do *Mycobacterium leprae* In: OPROMOLLA, D.V.A. **Noções de Hansenologia**. ed.1. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p.13

MAEDA, Y.; MUKAI, T.; SPENCER, J.; MAKINO, M. Identification of na Immunomodulating Agent from *Mycobacterium leprae*. **Infection and Immunity**, may 2005, p.2744-2750

MALO, D.; VOGAN, K.; VIDAL, S. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse NRAMP gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. **Genomics**.vol.23, supl. 1, p.51-61, 1994

MEISNER, S.J.; MUCKLOW, S.; WARNER, G.; SOW, S.O.; LIENHARDT, C. e HILL, A.V.S. Association of NRAMP1 Polymorphism with leprosy *per se* in Weast Africans. **Am. J. Hyg.** Vol.65, supl. 6, p.733-735, 2001

MENDONA, V.A., MELO, G.E.B.A., TEIXEIRA, A.L., COSTA, R.D., ANTUNES, C.M. Imunologia da Hanseníase. **Na. Brás. Dermatol.** V.83, supl 4, p.345-50, 2008

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações de Saúde. [S.l.] Informações de 1995 a 2000. Disponível em: <<http://www.google.com.br/datasus.gov.br.htm>.. Acesso em: 02 fev. 2005, 14:25:20.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Casos novos e coeficiente de detecção da hanseníase no Brasil e estados – 1985 – 2003. [S.l.] Detec 85; 2004. Disponível em: < [http//www.Google.com.br/detec85.03xls.htm](http://www.Google.com.br/detec85.03xls.htm)> Acesso em: 28 dez. 2004, 12:40:03.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vgilância em Saúde: Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil. Programa Nacional de Controle de Hanseníase. SINAN/SVS/MS, 2008

MORAES, M.O., CARDOSO, C., VANDERBORGHT, P.R., PACHECO, A.G. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev.** v.77,;p.189-202, 2006

NAGAO-DIAS, A., ALMEIDA, T.L.P., OLIVEIRA, M.F., SANTOS, R.C., LIMA, A.L.P, BRASIL, M. Salivary Anti-PGL-I IgM and IgA Titers and Serum Antibody IgG Titers and Avidities in leprosy Patients and their Correlation with Time od infection and Antigen Exposure. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases.** v.11 (2), p.215-219

NISHINO, L. Hanseníase – Alterações Imunológicas. Disponível em: <HTTP://www.saudetotal.com.br/artigos/diversos/hanseníase.asp>. Acesso em 18/03/2009, às 17:35:04

OLIVIER, M.; TANNER, C.E. Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.**, v.55, n.2, p.467-71, 1987.

OPROMOLLA, D.V.A. **Noções de Hansenologia.** ed.1. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p. 101 – 115

PFALTZGRAFF, R. E. e BRYCESON, A. **Clinical Leprosy.** In: HASTINGS, R.C. Ed. Leprosy , Churchill Livingston, New York, p. 134-176, 1985

PIMENTEL, M.I.F.; NERY, J.A.C.; ROLO, R.; BORGES, E.; SARNO, E. N. Neurite silenciosa na hanseníase multibacilar avaliada através da evolução das incapacidades antes, durante e após a poliquimioterapia. **Na. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, vol.79, supl.2, p.169-179, 2004

PENNA, M.L.F., OLIVEIRA, M.L.W. e PENNA, G.P. Spatial Distribution of Leprosy in the Amazon Region of Brasil. **Emerging Infectious Diseases.** V.5, supl 4, p.650-652, 2009

PREVEDELO, F.C.; MIRA, M.T. Hanseníase: Uma doença genética? **Na. Bras. Dermatol.** Curitiba, Brasil. Vol. 82, supl. 5, p. 451-459, 2007

PRICE, R.E.; TEMPLETON, J.W.; SMITH, R. 3RD. et al. Ability of mononuclear macrophages from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*. **Infect. Immun.**, v.58, n.4, p.879-86, 1990.

QURESHI, T.; TEMPLETON, J.W.; ADAMS, L.G. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, and *Salmonella typhimurium* in macrophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.50, n.1- 2, p.55-65, 1996.

REMUS, N.; ALCAIS, A.; ABEL, L. Human genetics of common mycobacterial infections. **Immunol. Res.** v. 28, supl.2; p. 109-129, United States, 2003

ROGER, M.; LEVEE, G.; CHANTEAU, S.; GICQUEL B. ; SCHURR, E. No evidence for linkage between leprosy susceptibility and human natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene in French Polynesia. **Int. J. lepr. Other Mycobact. Dis**; United States.; v. 65, supl. 2, p. 197-202, jun, 1997

ROY, S., MCGUIRE, W., MASCIE-TAYLOR, C.G., SAHA, B., HAZRA, S.K., HILL A.V. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J Infect Dis.** v.176, p.530-2, 1997

ROY, S., FRODSHAM, A., SAHA, B., HAZRA, S.K., MASCIE-TAYLOR, C.G., HILL, A.V.. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **J Infect Dis.** v.179, p.187-91, 1999

SALAZAR, L. A.; HIRATA, M. H.; CAVALLI, S. A.; MACHADO, M. O.; HIRATA, R. D. C. Optimized Procedure for DNA Isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clinical Chemistry.** v. 44, p. 1748-1750, 1998.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Nat. Acad.Sci.** USA, v.74, p.5463-5467, 1977.

SANTOS, A.R., SUFFYS, P.N., VANDERBORGHT, P.R., MORAES, M.O., VIEIRA, L.M., CABELLO, P.H., et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis.** v.186, p.1687-91, 2002

SARNO, E.N., GRAU, G.E., VIEIRA, L.M.M., NERY, J.A. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 during leprosy reactional states. **Clin Exp Immunol.**v.84, p.103–8, 1991

SARNO, E.N., SANTOS, A.R., JARDIM, M.R., SUFFYS, P.N., ALMEIDA, A.S., NERY, J.A.C. *et al.* Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF α . **Lepr Rev.** v.;71, supl.154 p.60. 80, 2000

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ. Relatório anual dos indicadores epidemiológicos e operacionais referentes ao programa de controle da hanseníase. 45 p., 2002

SHAW, M.A.; ATKINSON, S.; DOCKRELL, H.; HUSSAIN, R.; LAINSON-LINS, Z.; SHAW, J.; *et al.* An RFLP map for 2q33 – q37 from multigene *mycobacterial* and *Leishmania* disease families no evidence for an Lsh/lty/Bcg gene homologous influencing susceptibility to leprosy. **Annals of Human Genetics.** V. 57, p.251-257, 1993

SIDDIQUI, M.R., MEISNER, S., TOSH, K., BALAKRISHNAN, K., GHEI, S., FISHER, S.E., *et al.* A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nat Genet.** v.27, p.439-41, 2001

SKAMENE, E.; SCHURR, E.; GROSS, P. Infecção genômica: NRAMP1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. **Annu. Rev. Med.** ; United States, v. 49, p. 275 -287, 1998

STACH, J.L.; DELGADO, G.; TCHIBOZO, V. *et al.* Natural resistance to mycobacteria: antimicrobial activity and reactive oxygen intermediate releasing functions of murine macrophages. **Ann. Immunol.**, v.135D, n.1, p.25-37, 1984.

TALHARI, S.; NEVES, R. G. **Dermatologia Tropical: Hanseníase.** Ed.3 Manaus: Gráfica Tropical, 1997. 167 p.2 – 131

VERRECK, F.A., DE BOER, T., LANGENBERG D.M., HOEVE, M.A., KRAMER. M., VAISBERG, E., *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10 producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proc Natl Acad Sci USA.**v.101, p.4560-5, 2004

VIDAL, S.M.; TREMBLAY, M.L.; GOVONI, G. *et al.* The lty/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. **J. Exp. Med.**, v.182, n.3, p.655-66, 1995.

WHITE, J.K.; STEWART, A.; POPOFF, J.F. Incomplete glycosylation and defective intracellular targeting of mutant solute carrier family 11 member 1 (Slc11a1). **Biochem. J.**, v.382, p.811-819, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers.** Geneva: Novartis Foundation for sustainable development, Basle, Switzerland, 2002. 134p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Scientific working Group. Report on Leprosy. Programme for research and training in tropical diseases. Current status in reactions and nerve damage in leprosy- What next? 26-28 november, Geneva, Switzerland, 2002

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Weekly epidemiological Record: Global Leprosy Situation, beginning of 2008. v. 83, p. 293-300, 2008

WYLLIE, S.; SEU, P.; GOSS, J A. The natural resistance-associated macrophage protein 1 Slc11a1 (formerly Nramp1) and iron metabolism in macrophages. **Microbes Infect.**, v.4, p.351–59, 2002.

ANEXOS



ANEXO I

TESTE DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM DIRIGIDOS CONTRA PGL-I DO *Mycobacterium leprae* por meio de um Enzimaimunoensaio (ELISA) padrão.

O teste de detecção de anticorpos IgM para hanseníase utiliza como antígeno, fração semi-sintética (NT-P-BSA – Natural disaccharide + Phosphate + Bovine serum albumin)) do Glicolípido fenólico I (PGL-I) do *M. leprae*, um antígeno de parede celular espécie-específico desta micobactéria. Usa-se um conjugado IgM anti-humano ligado a uma enzima- a peroxidase que quando em contato com o substrato (tetrametilbenzidine –TMB) converte a reação em cor azul que, quando bloqueada pelo ácido sulfúrico (H₂SO₄) torna-se amarela.

Resumidamente a técnica é executada da seguinte maneira:

1. Cobertura das placas NUNC 96 “well” em U com o antígeno NT-P-BSA
2. Lavagem da placa com tampão salina fosfato (PBST) + tween 20 4 vezes, sendo que o tempo de espera na 1^a. Lavagem deve ser de 5 minutos e nas seguintes de um minuto cada uma.
3. Após lavagem, bater bem a placa em papel toalha para retirar todo o líquido. Adicionar 100 uL de solução de PBST a 1% de BSA (soro-albumina-bovina) em toda a placa e incubar por uma hora em estufa bacteriológica a 35°C.
4. Trazer a placa da estufa e retirar toda a solução de BSA batendo bem a placa em papel toalha. Diluir os soros a serem testados, o soro standart, o controle positivo e o controle negativo com solução de PBST a 10% de NGS (Normal Goat serum) em uma proporção de 1:300 (5 uL de soro para 1,5 mL da solução) em tubos 12 x 74 e distribuir na placa nos referidos lugares conforme figura 1. e 2 .Incubar na estufa por uma hora.

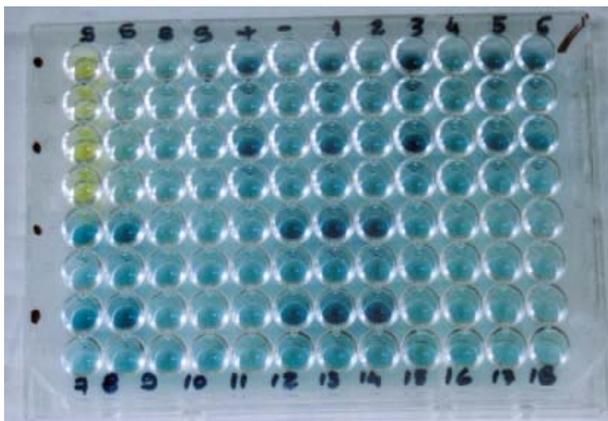


Figura 1 - Placa equipada com NT-P-BSA após bloqueio do 1º. Standart com ácido sulfúrico (H₂SO₄)



Figura 2 - Microplaca NUNC 96 well equipada com NT-P-BSA após bloqueio total com H₂SO₄ e para leitura final.

5. Após a incubação, trazer a placa, lavar novamente 4 vezes e adicionar o conjugado anti-IgM humano-Peroxidase diluído a 1:2000) em PBST a 10% de NGS – 5 mL de PBST para 2,5 uL de IgM. Adicionar 50 uL por poço em toda a placa e incubar novamente por uma hora.

6. Trazer a placa, lavar novamente 4 vezes (1 minuto de espera em cada lavagem), adicionar 50 uL/poço de substrato tetrametilbenzidine e deixar a placa dentro de uma cuba tampada por um período de 1 a 10 minutos, tendo o cuidado de monitorar a reação que torna a solução nos poços de cor azul, quanto mais forte o tom de azul, mais próxima se torna a hora de bloquear a reação com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,5 N e ler no equipamento (leitor de ELISA) para medir a absorbância. Bloqueia-se com ácido o 1º. Standart, lê-se a placa, se a densidade óptica estiver próxima de 0,6, então bloqueia-se a placa toda e se realiza a leitura final no equipamento.

Laboratório de Hanseníase do Instituto Evandro Chagas – IEC

Pesquisador responsável: Maria do Perpétuo Socorro C. Amador



ANEXO II

Testes sorológicos para hanseníase têm sido úteis para avaliação da magnitude do problema e mapeamento de áreas endêmicas e hiperendêmicas (estudos soropidemiológicos) objetivando a proposição de medidas de controle efetivas e impactantes na incidência da doença em nosso meio.

O advento do glicolípido fenólico-I (PGL-I), antígeno espécie-específico, único do *Mycobacterium leprae* na década de 70 e a possibilidade de síntese de novos glicolípidios específicos do *M.leprae* permitiram vários estudos da imunidade humoral em doentes hanseníacos e seus familiares. (BUHRER, 1998, 2000, 2001; KLATSER et al 1999; JAGANATI & SENGUPTA, 1983)

Ensaio imunoenzimático (ELISA) para medir níveis de anticorpos da classe IgM dirigidos contra PGL-I do *M. leprae* foram desenvolvidos mas requerem laboratório com equipamentos e pessoal qualificado para realização dos testes e interpretação dos mesmos.

Mais recentemente foram desenvolvidos testes imunocromatográficos de leitura rápida, os quais possuem ótima concordância com o teste ELISA (Kappa=80%) que não requerem equipamentos e nem treinamento de pessoal, pois são muito simples de serem realizados e apropriados para trabalhos de campo. (BUHRER et al 2000).

De forma geral os testes sorológicos são importantes e adequados para:

1. Classificar pacientes hanseníacos diagnosticados em multibacilares (MB) e paucibacilares (PB).
2. Monitorar eficácia do tratamento poliquimioterápico em doentes MB.
3. Realizar vigilância epidemiológica em contatos de doentes que possuem risco elevado de adoecimento por formas graves da doença.

A interpretação dos resultados de testes sorológicos tem as mesmas regras que qualquer outro teste diagnóstico complementar para hanseníase, devem ser analisados com todas as informações possíveis, como por exemplo: a) dados clínicos; b) história familiar ; c) ser residente de área de alta endemicidade; d) dados bacteriológicos, etc...

Assim como grande parte dos doentes apresenta baciloscopia negativa e histopatologia inconclusiva e, ainda assim, pode estar doente e apresentar lesões dermatoneurológicas inconfundíveis, assim ocorre com testes sorológicos, os quais, quando apresentam resultado positivo e o indivíduo não possui lesões de pele e nem neurológicas, é necessário ter o bom senso de acompanhar este indivíduo por pelo menos a cada seis meses para que o diagnóstico, se necessário ser feito, seja realizado com a maior brevidade possível, evitando-se que pessoas infecciosas, permaneçam por longos períodos contaminando a comunidade.

Pacientes hansênicos apresentando lesões de pele e/ou neurais, negativos a qualquer teste diagnóstico complementar, não devem ser despachados e sim diagnosticados e classificados corretamente para que não venham a evoluir para formas graves da doença. O quadro abaixo demonstra o procedimento a ser tomado quanto aos resultados sorológicos:

Quadro para Interpretação de testes sorológicos e procedimento a ser adotado

Resultado sorológico- Teste MI Flow	Categoria do indivíduo	Baciloscopia	Dados clínicos	Procedimento
Negativo ou positivo/negativo*	Contato intradomiciliar	Negativa ou não realizada	Sem sinais de pele e/ou de nervos	Liberação do paciente com as devidas orientações e vacinação com BCG conforme preconizado pelo M.S.
Positivo 1+	Contato intradomiciliar	Negativa ou não realizada	Sem sinais de pele e/ou de nervos	Acompanhamento com exame dermatoneurológico a cada seis meses- Não tratar
Positivo 1+ a 4+	Contato intradomiciliar, extradomiciliar	Negativa ou não realizada	Qualquer sinal de pele e/ou de nervos sugestivo de hanseníase	Realizar teste de sensibilidade cutâneo, baciloscopia e de acordo com a análise dos resultados iniciar tratamento específico.

* Observar que este tipo de resultado pode ser considerado negativo, olhar esquema de resultado abaixo

ANEXO III



Parecer de Aprovação nº 0014/2009
 Protocolo CEP/IEC - Nº 011/2009
 CAAE: 0013.0.072.000-09

Ananindeua/PA, 30 de junho de 2009.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Fatores imunogenéticos na determinação do perfil de resposta imune à infecção com *Mycobacterium leprae* e delineamento do tipo clínico de hanseníase em área endêmica do estado do Pará”.

Pesquisador Responsável: **MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO CORRÊA AMADOR**

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epígrafe foi considerado **aprovado**.

Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Atenciosamente,


MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

ANEXO IV



Parecer de nº 097/2011/CEP/IEC/SVS/MS
 PROTOCOLO CEP/IEC - Nº 0011/09
 CAAE: 0013.0.072.000-09

Ilmo.Sra.dra.

MARIA DO PERPETUO SOCORRO C. AMADOR
 Investigadora principal do Projeto

Ananindeua/PA, 07 de novembro de 2011.

Senhora Coordenadora,

Em atenção ao solicitado por meio de carta datada de 04 de novembro de 2011, informamos que após análise das justificativas, o CEP/IEC/SVS/MS, por entender que a modificação solicitada não interfere na conduta ética do projeto, **aprovou** a modificação no título.

Dessa forma, informamos que o mesmo passa a ser identificado com o título: **“Associação de dois polimorfismos do Gene humano NRAMP1 na susceptibilidade/resistência para hanseníase em áreas endêmicas do Estado do Pará”**.

2. Recomendamos o devido arquivamento dos dados dos sujeitos da pesquisa conforme estabelecido na Res. CNS 196/96 IV. 3. f. bem como atender ao item III.3.t da referida Resolução (utilizar o material biológico e os dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista no protocolo).

3. Caso haja a intenção de utilizar esse material para outras pesquisas, o pesquisador responsável deverá encaminhar um novo protocolo devidamente autorizado, conforme norma estabelecida pela Resolução 441/11 e observar o estabelecido no Regulamento Interno do CEP/IEC para a utilização de informações ou materiais armazenados (Resolução 196/96-III.3.i) e .

Atenciosamente,


 MANOEL DO CARMO-PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

APÊNDICES

APÊNDICE I

Termo de Consentimento Pós-informado		
(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução nº196 de 10 de 10 de 1996 – CNS)		
1) Identificação do paciente ou responsável legal		
Nome:		
Documento de identidade nº:	Nascimento: / /	
Endereço:		
Cidade	Estado:	Tel.: ()
2) Dados sobre o estudo		
Título: FATORES IMUNOGENÉTICOS NA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO COM <i>Mycobacterium leprae</i> E DELINEAMENTO DO TIPO CLINICO DE HANSENÍASE EM ÁREA ENDÊMICA DO ESTADO DO PARÁ.		
Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em:		
3) Esclarecimento do sujeito:		
<p>Você está convidado a participar de um estudo para examinar doentes hansênicos e contatos de pacientes hansênicos objetivando a aplicação de métodos que possam auxiliar no diagnóstico precoce desta doença. Hanseníase é um problema de saúde pública no Brasil, ela é causada por micróbios chamados bacilos de Hansen. A maioria das pessoas é saudável o suficiente para matar os bacilos quando eles invadem os seus corpos. Os serviços de saúde pública precisam saber se o trabalho deles para acabar com a hanseníase está sendo suficiente para garantir à comunidade o bem estar social. É muito difícil descobrir se os trabalhos realizados são adequados. Nós estamos utilizando métodos que talvez ajudem os serviços de saúde pública a buscar maneiras mais efetivas de fazer o diagnóstico o mais precocemente possível da hanseníase, bem como a prevenção de deformidades. Se você e/ou seu pai ou responsável concordarem em participar deste estudo, você será submetido a um exame cuidadoso de sua pele e se houver alguma possibilidade de você estar doente, você será encaminhado para que um médico te examine e te medique. Depois do exame, nós vamos colher um pouco de sangue (5 ml) de uma veia superficial e um pedacinho de pele. Você sentirá uma picada leve nos locais da coleta, estas picadas ardem um pouco, mas não representam nenhum risco para sua saúde. Você receberá toda a assistência à saúde pela equipe do Instituto Evandro Chagas e do Centro de Referência em Dermatologia Dr. Marcelo Cândia, que poderá ser chamada a qualquer momento, caso haja necessidade. As despesas decorrentes da participação na pesquisa e indenização por eventuais danos decorrentes da mesma, serão de total responsabilidade dos pesquisadores principais e suas respectivas instituições de origem. Caso você não deseje participar, não deixará de ser atendido e acompanhado durante todo o seu tratamento se assim o desejar. Socorro Amador: Instituto Evandro Chagas- fone/Fax: (91) 3214-21-12/ 3214-21-14/88426845</p>		
Autorizo o uso do material destinado ao laboratório da Unidade de Saúde.		
Belém, ____/____/____		
Assinatura do paciente ou responsável		

APÊNDICE II



FICHA EPIDEMIOLÓGICA PARA SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO
 CONTATO co-sanguíneo () CONTATO NÃO co-sanguíneo DOENTE MB ()
 DOENTE PB () CONTROLE ()

Data do atendimento: ___/___/___

Município :.....

IDENTIFICAÇÃO:

Nome:

Endereço:_____

Telefone:_____

Tempo de moradia no endereço registrado: _____

Nome da mãe:_____

Data do nascimento:_____ Naturalidade:_____ Est.civil:_____

Profissão:_____ Ocupação habitual:_____

Tempo na ocupação registrada:_____ (meses ou anos)

Estado vacinal : BCGid – 0 dose (); 1 dose (); 2 doses (); + doses ()

Etnia: Branco () Não branco () Especificar:.....

Escolaridade:_____ (1º, 2º ou 3º. Grau completo ou incompleto, analfabeto, semi-analfabeto , sabe assinar o nome)

Casos de hanseníase na família: Sim (); Não ()

Se sim, quantos casos:; Grau de parentesco:

Tempo de doença: _____(meses ou anos)

Principais sinais e /ou sintomas pregressos ou atuais:_____

Em caso de doente:

Forma clínica: _____; Data do início do tratamento: _____

Resultado da baciloscopia: _____

MI Flow: Positivo (); Negativo ()

Histopatologia: _____

IgM ELISA anti-PGL-I: Positivo () DO= _____; Negativo () DO= _____

ELISA quantiferon (INF γ): Positivo (); negativo ()

OBS:

APÊNDICE III - ORÇAMENTO**QUADRO 1 - MATERIAL DE CONSUMO
ELEMENTO DE DESPESA - 3490.30**

DESCRIÇÃO	UNIDADE	QUANTIDADE	PREÇO UNITÁRIO R\$	VALOR TOTAL R\$
1.testes ML flow	2.000 testes	2.000	2,00	4.000,00
2. Punches descartáveis p/ biópsia de pele 4 mm	500	10 cx. C/ 50	250,00	2.500,00
3. Punches descartáveis p/ biópsia de pele 5 mm	500	10 cx. C/ 50	250,00	2.500,00
4. Seringas de 1 ml tipo insulina	5800 unid.	08 cx. C/ 725	250,00	2.000,00
5. Cartucho colorido p/ computador	20 unid.	20 unid.	70,00	1.400,00
6. Papel toalha	50 rolos	10 fardos	30,00	300,00
7. Seringas de 5 ml	1750	05 cx. C/ 350	50,00	250,00
8. Papel Chamex a 4	20 resmas	20 resmas	7,00	140,00
9. Papel ofício	“	“	7,00	140,00
10.Álcool metílico e etílico a 95 graus	10 lit.	10 lit. de cada	5,00	50,00
11. Seringas de 20 ml	350	01 cx. C/ 350	50,00	50,00
12. Agulha 25x7	200	02 cx. C/ 100	20,00	40,00
13. Agulha 25x8	200	02 cx. C/ 100	20,00	40,00
14. Agulha 30x7	200	02 cx. C/ 100	20,00	40,00
15. Agulha 30x8	200	02 cx. C/ 100	20,00	40,00
16. lenço de papel	05	05 cx.	5,00	25,00
TOTAL	-	-	-	13.515,00

Observação: informar a fonte e referência para cálculo do preço unitário.

Obs: Fonte de Preço unitário: Setor de compras do I.E.C.

DESPESAS DE CAPITAL.**QUADRO 2 - EQUIPAMENTO/ MATERIAL PERMANENTE.
ELEMENTO DE DESPESA - 4590.52**

DESCRIÇÃO	UNIDADE	QUANTIDADE	PREÇO UNITÁRIO R\$	VALOR TOTAL R\$
1. microscópio	01	01	15.000,00	15.000,00
2.Multiskan (Espectofotômetro) leitor de ELISA	01	01	10.000,00	10.000,00
2. Centrífuga	02	02	700,00	1.400,00
3. Lavador de placas p/ exame de ELISA	01	01	4.000,00	4.000,00
4. Copiadora pessoal	01	01	4.000,00	4.000,00
5. Computador 266 MHz	01	01	3.000,00	3.000,00
6. Banho Maria	01	01	3.000,00	3.000,00
7. Estufa para esterilização pequena	01	01	3.000,00	3.000,00
8. Máquina fotográfica c/ aproximação	01	01	1.000,00	1.000,00
9.Fax	01	01	800,00	800,00
10. Frezer	01	01	800,00	800,00
11. Impressora jato de tinta	01	01	800,00	800,00
12.Geladeira	01	01	700,00	700,00
13. Vídeo Cassete	01	01	500,00	500,00
14. Projetor de slides	01	01	400,00	400,00
15. Scanner	01	01	400,00	400,00
16. Retroprojetor	01	01	300,00	300,00
17. Relógio Alarme	02	02	50,00	100,00
18. Porta agulha dermatológico	02	02	50,00	100,00
19. Bebedouro	01	01	60,00	60,00
20. Caneta a laser	02	02	20,00	20,00
TOTAL	-	-	-	52.980,00