

Márcia Almeida Galvão Teixeira



Reação hansênica e imunidade: polimorfismos do gene *NRAMP1(SLC11A1)* em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência no Recife, nordeste do Brasil

Tese aprovada pelo Colegiado do Curso de Doutorado em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical

Orientadora:

Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira (UFPE)

Co-orientador:

Prof. Dr. Emmanuel Rodrigues de França (UPE)

RECIFE 2009

Teixeira, Márcia Almeida Galvão

Reação hansênica e imunidade: polimorfismos do gene NRAMP1(SLC11A1) em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência no Recife, nordeste do Brasil / Márcia Almeida Galvão Teixeira. – Recife : O Autor, 2009.

Xiv + 91 folhas ; il., fig., tab. e quadros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2009.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Hanseníase. 2. Reações hansênicas. 3. Polimorfismo genético. 4. Fragmento de restrição. I. Título.

616-002.73
616.998

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-162



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

MÁRCIA ALMEIDA GALVÃO TEIXEIRA

No dia 19 de outubro de 2009, às 08h00, na Sala de Reunião do PPGMEDTROP, Bl. "A", térreo do Hospital das Clínicas (HC) do CCS/UFPE, os Membros Doutores: **Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro** (Presidente da Banca Examinadora – UFPE – Membro Interno), a **Prof^ª. Dr^ª. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva** (CPqAM/FIOCRUZ – Membro Externo), a : **Prof^ª. Dr^ª. Angela Cristina Rapela Medeiros** (UPE – Membro Externo), a : **Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura** (UPE – Membro Externo) e a **Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima de Medeiros Brito** (UPE – Membro Externo), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda **MÁRCIA ALMEIDA GALVÃO TEIXEIRA** sobre a sua Tese intitulada “Reação hansênica e imunidade: polimorfismos do gene *NRAMP1*(*SLC11A1*) em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência no Recife, nordeste do Brasil”, a qual foi orientada pela **Prof^ª. Dr^ª. Vera Magalhães da Silveira** (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Angela Cristina Rapela Medeiros

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima de Medeiros Brito

APROVADA

Célia M. M. B. Castro

Prof^ª. Dr^ª. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Prof^ª. Dr^ª. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Angela Cristina Rapela Medeiros

Prof^ª. Dr^ª. Angela Cristina Rapela Medeiros

Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

Maria de Fátima de Medeiros Brito

Prof^ª. Dr^ª. Maria de Fátima de Medeiros Brito

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**REITOR**

PROF. AMARO HENRIQUE PESSOA LINS

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROF. ANÍSIO BRASILEIRO DE FREITAS DOURADO

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROF. JOSÉ TADEU PINHEIRO

DIRETOR SUPERINTENDENTE DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS

PROF. GEORGE DA SILVA TELLES

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL**

PROFA. ROSÂNGELA CUNHA DUARTE COELHO

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

PROFA. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO

CORPO DOCENTE PERMANENTE

PROFA. CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA DE CASTRO
PROF. EDMUNDO PESSOA DE ALMEIDA LOPES NETO
PROFA. ELIZABETH MALAGUEÑO DE SANTANA
PROF. FÁBIO ANDRÉ DOS SANTOS BRAYNER
PROFA. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO
PROFA. MARIA AMÉLIA VIEIRA MACIEL
PROFA. MARIA DO AMPARO ANDRADE
PROFA. MARIA ROSÂNGELA CUNHA DUARTE COELHO
PROF. RICARDO ARRAES DE ALENCAR XIMENES
PROFA. VALDÊNIA MARIA OLIVEIRA DE SOUZA
PROFA. VERA MAGALHÃES DA SILVEIRA

CORPO DOCENTE COLABORADOR

PROFA. MARIA DE FÁTIMA PESSOA MILITÃO DE ALBUQUERQUE
PROFA. SÍLVIA LEMOS HINRICHSEN

DEDICATÓRIA

A **Edgar**,

pelo estímulo e apoio na realização desse trabalho;

Ao meus filhos **Bárbara e Heitor**,

por estarem juntos e compreenderem os momentos de ausência;

A minha **avó materna** (in memoriam),

por todos os conselhos e motivação para o estudo;

Aos **meus pais**,

Pelo carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que num gesto de desprendimento concordaram em participar do estudo.

Aos professores Vera Magalhães e Emmanuel França pela orientação, críticas e sugestões.

À dra. Ana Hatagima, Dra. Norma Lucena, Alessandra Ramos e os funcionários do laboratório do IMIP pela imensa colaboração na realização da genotipagem.

Aos colegas dras. Fátima Brito, Iara Santana, Márcia Oliveira, Miguel Vasconcelos, Jane Martins, Rosana Libório e a enfermeira Ivaneide pelo incentivo e colaboração no encaminhamento dos pacientes.

Aos funcionários do CISAM e da Policlínica Lessa de Andrade que me receberam de braços abertos e sempre prestativos.

Aos drs. Socorro Pereira, Luidson, Patrícia Moura e Tatiana pela orientação e ajuda nas questões relativas aos aspectos genéticos da pesquisa.

A dra. Ângela Rapela pelo tempo dedicado ao auxílio na preparação do projeto da tese.

Ao professor dr. Ricardo Ximenes e o estatístico Ulisses Montarroyos pela ajuda nas questões estatísticas.

Às médicas residentes do Hospital Oswaldo Cruz, Juliana Fontan, Cláudia Elise Ferraz e Carolina Lins pela ajuda no atendimento aos pacientes.

Aos professores e colegas de pós-graduação, Walter Galdino e demais funcionários por estarem juntos e auxiliarem nessa caminhada.

Aos meus pares do Hospital Oswaldo Cruz pela boa vontade em flexibilizar horários.

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa que pode vir acompanhada das reações hansênicas que são quadros frequentes e importantes no contexto da doença, pois podem ser responsáveis pelo retratamento e pelas incapacidades. O entendimento dos padrões reacionais é primordial para o seu manejo. Vários são os fatores, dentre eles o genético, que podem influenciar no desenvolvimento das formas clínicas da hanseníase e das reações. Este trabalho consta de dois artigos. O primeiro cujo título é: *“Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência para hanseníase na cidade de Recife-PE”*, teve a finalidade de descrever as características epidemiológicas e clínicas de 201 pacientes com história de quadro reacional. Variáveis epidemiológicas e clínicas como baciloscopia inicial, sexo, idade, fototipo, procedência, forma clínica, retratamento e tipo de tratamento e de reação, índice baciloscópico final e período de surgimento da reação em relação ao tratamento, foram avaliados. Para cálculo dos fatores de risco para as formas multibacilares foram realizadas análises univariada e multivariada. Sexo masculino, pele fototipo V, idade entre 30 - 44 anos e procedência do Recife caracterizaram a maioria da amostra. Em relação às características clínicas, a forma clínica borderline, tratamento regular, reação tipo I, neurite, presença de 10 a 20 nódulos e surgimento da reação hansênica durante o tratamento foram os achados mais frequentes. Pela análise univariada, os pacientes submetidos ao retratamento tiveram chance uma vez maior de serem multibacilares. Ainda em relação à comparação do quadro reacional entre indivíduos paucibacilares e multibacilares, pela análise multivariada, indivíduos do sexo masculino tiveram chance uma vez maior de serem multibacilares. As reações hansênicas se desenvolveram predominantemente durante o tratamento. O segundo artigo, sob o título: *“Polimorfismos do gene NRAMP1 em indivíduos com reações hansênicas atendidos em dois centros de referência no Recife, Nordeste do Brasil”* abordou o aspecto genético da amostra estudada no primeiro artigo, avaliando três polimorfismos do gene NRAMP1 por meio de um estudo comparativo e observacional, que através do polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP), investigou a frequência de três polimorfismos gênicos da proteína NRAMP1: 274C/T, D543N, 1729+55del4. O genótipo mutante 274 TT foi associado positivamente ao eritema nodoso ($p=0,04$) e negativamente à reação reversa ($p=0,03$). Esses resultados sugerem que o polimorfismo 274 C/T do gene NRAMP1 pode auxiliar na determinação da susceptibilidade à reação tipo II em indivíduos com hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase, reações hansênicas, polimorfismo genético, fragmento de restrição.

Abstract

Leprosy is a infectious disease and reactions are very frequent and responsible for retreatment and incapacities. The pattern of theses reactions is primordial to their management. Many factors including genetics can influence the development of paucibacillary, multibacillary and reactions. This study includes two articles. The first one, under the title "*Clinical and epidemiological characteristics of the leprosy reactions in paucibacillary and multibacillary off two different reference hospitals in Recife – PE*" described epidemiological and clinical characteristics of 201 patients with history of leprosy reactions. Initial bacilloscopy, sex, age, skin phototype, origin, clinical form, retreatment, treatment and leprosy type, final bacilloscopy and the relationship between the treatment period and the onset of the reaction were evaluated. Univariate and multivariate analysis were performed to calculate *odds ration* to multibacillary forms. Male, Fitzpatrick's skin type V, age between 30-44 and origin from Recife were the majority of the sample. In attend to clinical characteristics, borderline type, regular treatment, reverse reaction, neuritis, 10 to 20 nodules and leprosy reaction developed during the treatment were the most frequent. Retreatment demonstrated statistical association with multibacillary forms on univariate analysis. Male had one more chance to have multibacilar form. The reaction developed mainly during the treatment. Within the second article, under the title "*NRAMP1 gene polymorphisms in individuals with Leprosy reactions of two different reference hospitals in Recife, northeast of Brazil*" broached genetics aspects of the sample studied in the first article analyzed, three *NRAMP1* gene polymorphisms 274C/T, D543N and 1729+55del4 in a comparative and observational study typed by Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain (RFLP). The wild genotype 274 TT was associated with positivity of erythema nodosum leprosum ($p=0,04$) and with the negativity of the reversal reaction ($p=0,03$). The 274 C/T *NRAMP1* polymorphism aids in the determination to the susceptibility to type II reaction in Leprosy patients.

Keywords: Leprosy, leprosy reactions, genetic polymorphism, Restriction Fragment Length Polymorfism-Polimerase Chain.

Lista de Figuras

Figura 1 - Variações polimórficas do gene <i>NRAMP1</i>	18
---	----

Lista de Figuras do Artigo I

Figura 1 - Distribuição dos achados clínicos comuns às reações tipo I e II, diagnosticadas em 201 pacientes segundo reação hansênica acompanhados em dois Centros de Referência em Recife - PE	55
--	----

Figura 2 - Distribuição dos achados clínicos dos pacientes com reação hansênica tipo II, isolada ou associada à reação tipo I, acompanhados em dois Centros de Referência em Recife – PE.....	56
---	----

Lista de Quadros

Quadro1 - Polimorfismos do gene <i>NRAMP1</i> e associação com a hanseníase.....	20
--	----

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas do Artigo I

Tabela 1 - Distribuição das características demográficas e clínicas dos 201 pacientes reacionais atendidos no CISAM e Centro de Saúde Lessa de Andrade.....	54
---	----

Tabela 2 - Análise univariada da associação entre variáveis de risco e a forma multibacilar em 201 indivíduos com quadro reacional.....	57
---	----

Tabela 3 - Regressão logística das variável sexo com a forma multibacilar em 201 indivíduos reacionais.....	58
---	----

Lista de Tabelas do Artigo II

Tabela 1 - Distribuição das variáveis de caracterização dos 201 pacientes reacionais atendidos no CISAM e Policlínica Lessa de Andrade, 2007- 2008.....	76
---	----

Tabela 2 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos 274 C/T, D543N e 1729+55del 4 do gene <i>NRAMP1</i> dos pacientes multibacilares paucibacilares com reação hansênica.....	77
--	----

Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de cada polimorfismo segundo baciloscopia e sexo dos pacientes.....	73
--	----

Tabela 4 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de cada polimorfismo segundo baciloscopia e fototipo dos pacientes.....	78
--	----

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes reacionais estudados quanto às frequências genotípicas de cada polimorfismo e o tipo reacional.....	79
---	----

Lista de Siglas e Abreviaturas

A	Adenina
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
<i>Avall</i>	Enzima de restrição - <i>Anabaena variabilis</i> II
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BB	Borderline Borderline
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BT	Borderline Tuberculóide
BL	Borderline Lepromatosa
BV	Borderline Virchowiana
C	Citosina
C3D	Componente plasmático da cascata do sistema complemento 3D
CISAM	Centro de Saúde Amaury de Medeiros
CNDS	Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária
DD	Dimorfa – Dimorfa
DT	Dimorfa – tuberculóide
DV	Dimorfa – Virchowiana
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
EP	Eritema Polimorfo
ENN	Eritema Nodoso Necrotizante
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>Fok I</i>	Enzima de restrição - <i>Flavobacterium okeanokoites</i> I
G	Guanina
<i>GPDH</i>	Glicerol 3-fosfato desidrogenase
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<i>HLA</i>	<i>Histocompatibility leukocyte antigen</i> - Antígeno leucocitário humano
IBF	Índice Baciloscópico Final (alta terapêutica)
IBI	Índice Baciloscópico Inicial (início de tratamento)
IFN γ	Interferon gama
IL	Interleucina
INOS	Enzima Óxido Nítrico Sintetase
LL	Lepromatosa Lepromatosa
MB	Multibacilar
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MHD	Hanseníase Dimorfa
MHI	Hanseníase Indeterminada
MHT	Hanseníase Tuberculóide
MHV	Hanseníase Virchowiana
<i>Mnl</i>	Enzima de restrição - <i>Moraxella nonliquefaciens</i>
MS	Ministério da Saúde
<i>NRAMP1</i>	<i>Natural resistance associated macrophage protein 1</i> - proteína 1 associada à resistência natural do macrófago
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>PARK 2</i>	<i>Parkinson familiar 2</i>
<i>PARK G</i>	<i>Parkinson familiar G</i>
PB	Paucibacilar

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
PQT	Poliquimioterapia
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - Polimerase Chain - Polimorfismo de fragmento de restrição
RMP	Rifampicina
RNI	Reativos intermediários do nitrogênio
RR	Reação Reversa
SC	Complemento
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<i>Slc11a1</i>	<i>Solute carrier family 11, member 1</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> - Polimorfismo de nucleotídeo único
T	Timidina
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor beta 1</i> - Fator beta 1 de transformação de crescimento
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
TLR	<i>Toll like receptors</i> – Receptores tipo toll
TNF- alfa	Fator alfa de Necrose Tumoral
TT	Tuberculóide tuberculóide
VDR	Gene do receptor de vitamina D
VV	Virchowianos
WHO	World Health Organization

Sumário

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Quadros.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	x
Introdução.....	01
Apresentação do trabalho.....	01
Revisão da literatura.....	04
Imunopatologia da hanseníase.....	06
Reações hansênicas.....	08
Reação Tipo I ou reversa.....	10
Reação Tipo II ou eritema nodoso.....	12
Tratamento das reações.....	14
Genética e hanseníase.....	15
Gene <i>NRAMP1</i>	17
Pergunta condutora.....	23
Objetivos.....	24
Objetivo geral.....	24
Objetivos específicos.....	24
Casuística e métodos do estudo.....	25
Desenho do estudo.....	25

População alvo.....	26
Critérios de inclusão e exclusão.....	26
Tipo de amostragem.....	27
Definição das variáveis.....	28
Variável dependente.....	28
Variáveis independentes.....	29
Qualidade dos instrumentos de medida.....	32
Padronização das técnicas.....	32
Métodos de coleta.....	35
Plano de tabulação e análise de dados.....	35
Considerações éticas	36
Referências.....	37
Artigo I.....	43
Resumo.....	45
Abstract.....	46
Introdução.....	47
Métodos.....	49
Resultados.....	52
Discussão.....	58
Conclusões.....	63
Agradecimentos.....	63
Referências.....	64
Artigo II.....	66
Resumo.....	68

Abstract.....	69
Introdução.....	70
Métodos.....	72
Resultados.....	76
Discussão.....	79
Conclusão.....	82
Agradecimentos.....	83
Referências.....	84
Conclusões.....	86
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	87
Apêndice B - Protocolo da Pesquisa	88
Anexo I – Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa	
Anexo II – Artigo I – Confirmação de recebimento da Revista Brasileira de Medicina Tropical	
Anexo III – Artigo II – Confirmação de recebimento da Revista Brasileira de Medicina Tropical	

INTRODUÇÃO

Apresentação do trabalho

O número global de casos de hanseníase tem mostrado uma tendência de declínio desde o ano de 2001, exceto em regiões da África e no Brasil, que se mantém entre os países de mais alta endemicidade, com coeficiente de prevalência de 3,2/10.000¹.

Cerca de 40% dos novos casos de hanseníase no Brasil são provenientes de estados das regiões Norte e Nordeste². A Região Metropolitana do Recife (RMR) é considerada pelo Ministério da Saúde como uma área endêmica (taxa de detecção igual a 6,11/10.000 habitantes)². A taxa de cura do estado de Pernambuco foi de 65,51% em 2005, mostrando que esforços precisam ser feitos para que os casos de hanseníase sejam encerrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no momento em que receberem alta por cura².

Quadros reacionais estão presentes em cerca de 10 a 50 % dos casos de hanseníase, principalmente nas formas multibacilares. Os principais tipos de reação são: a reação reversa (tipo I) e o Eritema Nodoso Hansênico (tipo II). Podem surgir em até cinco anos após o aparecimento da doença³.

O diagnóstico diferencial entre reação hansênica e recidiva da doença, principalmente na rede assistencial básica, por dificuldades operacionais, como por exemplo, ausência de dados para comparação dos exames baciloscópicos pré-tratamento e pós-tratamento, muitas vezes é dificultado. Brito⁴ cita que esta diferenciação é, sobretudo, clínica e que os indivíduos que sofrem de episódios

reacionais após alta, apresentam aproximadamente três vezes mais chances de serem retratados por recidiva em relação aos grupos controle estudados.

A teoria que admite que a incapacidade de destruição dos bacilos da hansen pelos macrófagos pode ser influenciada por variações genéticas tende a ganhar forças nos últimos anos. Observa-se um aumento do interesse no entendimento do papel dos fatores genéticos controlando a susceptibilidade ou a resistência às doenças infecciosas em geral, inclusive a hanseníase⁵.

Várias abordagens têm sido realizadas para avaliar a associação da hanseníase com polimorfismos genéticos. Um conjunto de genes tende a modificar a susceptibilidade e o desfecho da hanseníase nas diferentes formas clínicas. O gene *Natural resistance associated macrophage protein 1* - proteína 1 associada à resistência natural do macrófago (*NRAMP1*) é um gene que tem nos seus polimorfismos, associações à susceptibilidade ou resistência a doenças auto-imunes, parasitárias e infecciosas, sobretudo micobacterioses, dentre elas a hanseníase^{6, 7, 8}.

A susceptibilidade à hanseníase necessita ser mais bem entendida, pois tem havido aumento do coeficiente de detecção de casos no Brasil. A presença de variações gênicas reflete mais uma característica importante no comportamento da doença, que pode fornecer subsídios para maior entendimento da hanseníase. Estudar o comportamento dos alelos 274 C/T, D543N e 1729+55del4 do gene *NRAMP1* nos pacientes reacionais poderá contribuir para melhoria da abordagem diagnóstica e terapêutica da doença^{9, 10}.

O acompanhamento e a vigilância sobre situações que possam elevar as taxas de prevalência da hanseníase são importantes para o cumprimento das metas de redução dos escores da doença¹¹.

Este estudo objetivou a descrição das características clínicas de pacientes com hanseníase reacional atendidos em dois centros de referência e investigou a associação entre três polimorfismos do gene *NRAMP1* e as reações hansênicas em pacientes multibacilares e paucibacilares, com o objetivo de detectar o perfil de maior susceptibilidade. O trabalho foi realizado através da genotipagem, pela técnica da PCR para o polimorfismo do gene *NRAMP1*, partindo da suspeição que variações alélicas nos indivíduos podem influenciar na susceptibilidade aos quadros reacionais.

Para atender aos objetivos, a tese apresentou duas abordagens: uma epidemiológica e clínica que constou de um estudo transversal e gerou o artigo: *“Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois Centros de Referência para hanseníase na cidade de Recife- PE.”* O artigo foi enviado e será submetido à publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

A segunda abordagem foi genética e gerou o segundo artigo sob título: *“Polimorfismos do gene NRAMP1 em indivíduos com reações hansênicas atendidos em dois centros de referência no Recife, Nordeste do Brasil”* registrou a diferença na distribuição das frequências alélicas e genotípicas de três polimorfismos (274 C/T, D543N e 1729+55del4) em relação ao sexo e cor da pele, além de investigar as diferenças na distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos entre os pacientes reacionais multibacilares e

reacionais paucibacilares. O artigo foi enviado e será submetido à publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Revisão da literatura

A Hanseníase é uma doença infecto-contagiosa milenar, causada por uma bactéria álcool-ácido resistente, o *Mycobacterium leprae*, o bacilo de Hansen ¹². A transmissão da doença ocorre pelo contato de indivíduos sãos com os infectados, geralmente virgens de tratamento, através das vias aéreas superiores que são a principal via de eliminação da bactéria. O bacilo de Hansen é um parasita intracelular obrigatório que acomete, principalmente, pele e nervos periféricos, refletindo em apresentação clínica diversificada, desde poucas lesões infiltradas discretas com alteração de sensibilidade (forma tuberculóide) até lesões disseminadas com sequelas importantes e incapacitantes (forma virchowiana)^{12,13}.

Trata-se de uma doença espectral e a organização mundial de saúde (OMS) tem orientado, para fins operacionais, a classificação clínica segundo Ridley e Jopling¹⁴, que divide a doença nas seguintes formas: tuberculóide tuberculóide (TT), borderline tuberculóide (BT) ou dimorfa tuberculóide (DT) que são paucibacilares e borderline borderline (BB) ou dimorfa-dimorfa (DD), borderline virchowiana (BV) ou borderline lepromatosa (BL) e virchowiana virchowiana (VV) ou lepromatosa lepromatosa (LL) que são multibacilares³. A forma dimorfa tem sido relatada como a mais frequente¹⁵.

Para fins de tratamento, a OMS, baseada na baciloscopia, classifica a hanseníase em duas formas: multibacilar (MB) e paucibacilar (PB). O índice baciloscópico (IB) é calculado pela média da contagem de bacilos álcool-ácido

resistentes (BAAR) no tecido, colhidos em quatro locais: lóbulos de orelha, cotovelo direito e em uma lesão suspeita de hanseníase, corados pelo Ziehl-Neelsen e quantificados de 1 a 6 + ou de acordo com a escala logarítmica de Ridley (índice bacteriológico): negativo (0) nenhum bacilo em 100 campos, positivo (1+) 10 bacilos em 100 campos, positivo (2+) 1 a 10 bacilos em 10 campos, positivo (3+) 1 a 10 bacilos por campo, positivo (4+) 10 a 100 bacilos por campo, positivo (5+) 100 a 1000 bacilos por campo, positivo (6+) mais de 1000 bacilos por campo^{14, 15,16}.

A forma paucibacilar é aquela forma clínica na qual o número de lesões cutâneas é pequeno, geralmente menor que cinco, e a baciloscopia negativa. Até 1988 classificava-se como forma paucibacilar aquela com BAAR ≤ 2 ¹⁷. A forma multibacilar é caracterizada por um grande número de lesões, baciloscopia positiva e tendência ao acometimento sistêmico. Não existe, no entanto, um padrão ouro para classificação dos doentes, uma vez que o cultivo da bactéria só ocorre através da multiplicação no coxim da pata do camundongo¹⁸.

A interrupção da transmissão da hanseníase é um desafio para os programas de controle da doença e evidenciam que, apesar da multidrogaterapia, a transmissão não tem sido reduzida. Dos números globais, cerca de 4% tem graves comprometimentos, 47% de casos novos são multibacilares e 12% são crianças, o que é preocupante, pois reflete a contaminação familiar precoce^{19,20,21}.

O diagnóstico da hanseníase segundo a OMS é baseado principalmente nos achados clínicos, caracterizados pelas lesões de pele com alterações de sensibilidade e consistentes com a doença, acompanhadas de perda sensitiva, com ou sem espessamento de nervos e esfregaços de pele positivos para o *M.*

*leprae*²². O diagnóstico baseia-se no quadro clínico, na baciloscopia e no exame histopatológico, que muitas vezes, não está disponível na rede assistencial básica^{23,24}.

Imunopatologia da Hanseníase

O *M. leprae* é um microrganismo que causa infecção no ser humano, com diferentes graus de gravidade. É um parasita intracelular dos macrófagos e células de Schwann. A sua capacidade de sobreviver e proliferar no interior deste tipo de células é dependente da resistência aos vários mecanismos antimicrobianos dos macrófagos e também da capacidade de obter todos os nutrientes de que necessita quando habita esse nicho^{24,25}.

A maioria dos indivíduos nas áreas endêmicas é exposta ao bacilo (alta infectividade), no entanto poucos desenvolvem a doença (baixa patogenicidade). A instalação da hanseníase, por se tratar de uma doença infecciosa, depende de fatores ambientais, sócio-econômicos, da resposta imune do indivíduo e da predisposição genética, que pode ser determinante para a expressão e variação clínica^{26,27}.

Tanto a resposta imune inata que tem a característica de ser um mecanismo de defesa não específico com ação geral sobre os microrganismos, independente de sua natureza, como a resposta imune adaptativa, que se baseia no reconhecimento específico de antígenos, mediado por receptores presentes nas membranas dos linfócitos T e B e pode ser categorizada em celular ou do tipo 1, e humoral ou do tipo 2, estão envolvidas na hanseníase. A capacidade de os

linfócitos auxiliares (CD4+), também conhecidos como linfócitos T helper (Th), em induzir as respostas celular ou humoral está relacionada com os tipos de citocinas secretadas e proporcionará o desenvolvimento das respostas Th1 ou Th2^{28,29,30}.

Dois padrões distintos de resposta imunológica são observados na hanseníase. O primeiro é o Th1 que é caracterizado pela ativação dos macrófagos e indução de resposta imune celular. Este padrão ocorre na forma tuberculóide da hanseníase. O padrão Th2 é aquele em que há ativação de células B, estímulo da imunidade humoral com alta produção de anticorpos. É o padrão observado na forma virchowiana da hanseníase³¹.

Durante a infecção pelo *M. leprae*, citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-10 e TGF- β 1 atuam sobre o macrófago, aumentando a sua capacidade de controlar o crescimento intracelular do microrganismo^{25,31}.

O TNF- α promove a ativação do macrófago para a destruição intracelular de *M. leprae* e potencializa os efeitos do IFN- γ e da IL-12. Este padrão é típico das formas benignas, como a tuberculóide, em que não são observadas citocinas supressoras e sim indutoras da reação inflamatória. O padrão que predomina na forma virchowiana é aquele no qual a produção das citocinas supressoras como TGF- β 1, IL-10 e IL-4 que desativam os próprios macrófagos, aumenta a proliferação bacilar e contrapõem os efeitos do TNF- α , IFN- γ e IL-12, citocinas ativadoras, com predomínio de resposta Th2. A presença de IFN- γ liberada pelos macrófagos ou pelas células *natural killer* é que vai determinar qual citocina prevalecerá. Há, ainda, menor produção de elementos responsáveis pela oxidação intracelular, como intermediários do nitrogênio (ROI), avaliada pela expressão da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS)^{30,31}.

Na hanseníase virchowiana, a eficácia da defesa é efetuada por células capazes de fagocitar a bactéria e destruí-la (células apresentadoras de antígenos), apresentando às células T auxiliares apenas a sua fração antigênica, em associação com complexo de histocompatibilidade principal da classe II(MHC). Nesta etapa, há interação entre o macrófago e os linfócitos T, capazes de reconhecer o antígeno através de receptores de superfície, desencadeando a resposta imune celular. Esta resposta é mediada pelas interleucinas ou citocinas. Macrófagos produzem as citocinas, IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-12, que atuam sobre linfócitos T, geralmente a população de fenótipo CD4+ (helper ou auxiliares), que passam a produzir suas próprias citocinas. A IL-12 estimula diretamente a célula NK, induzindo a produção de IFN- γ , com função de potencializar a ativação macrofágica^{32,33,34}.

Reações hansênicas

A hanseníase é uma morbidade infecciosa que assume caráter imunológico e é surpreendida por quadros ou estados reacionais que são intercorrências no curso da doença. As reações refletem fenômeno de hipersensibilidade aguda diante dos antígenos do *Mycobacterium leprae*³⁵.

Os quadros reacionais podem surgir antes ou, mais frequentemente, durante ou após o tratamento^{36,37}. A duração e o número desses surtos reacionais dependem da forma clínica, bem como do índice baciloscópico inicial³⁸. Na forma borderline tuberculóide tem duração de três a nove meses, já nas formas

borderline borderline e borderline virchowiana pode se prolongar por dezesseis a vinte e quatro meses^{3,39}.

Scollard *et al.*, em 1994⁴⁰, em um estudo prospectivo de seguimento por cinco anos de 176 pacientes para avaliar a influência da idade, do sexo, do tratamento e da duração da doença no desencadeamento das reações tipo 1 e 2, obtiveram os seguintes achados: as reações surgiram em 45% dos pacientes, 32% dos indivíduos desenvolveram reação tipo I e 37% reação tipo 2, predomínio do quadro reacional tipo I nos homens, sem variação em relação à idade, enquanto que a reação tipo II ocorreu de forma semelhante em homens e mulheres e foi mais recorrente. Os indivíduos com reação tipo I não foram propensos a recaídas. Concluíram também os autores que o risco de surgimento das reações não está associado ao tratamento mais prolongado.

Várias situações são consideradas fatores de risco para o surgimento das reações. Estados fisiológicos como menstruação, gravidez, puerpério, lactação, vacinações e idade avançada, estresse emocional e físico, drogas como contraceptivos e infecções associadas⁴¹.

As reações hansênicas são classificadas em dois tipos de acordo com Ridley e Jopling¹⁴: a reação hansênica tipo I ou reversa, quando está envolvida predominantemente a imunidade celular e a reação hansênica tipo II, com os tipos Eritema Nodoso Hansênico (ENH), Eritema Polimorfo (EP) e Eritema Nodoso Necrotizante (ENN). Neurite pura ou isolada pode ser classificada como reação tipo I ou um terceiro tipo de reação hansênica. A reação tipo I pode ser ascendente, quando há aumento da imunidade específica ou descendente quando há uma queda da imunidade. A distinção clínica é praticamente

inexistente e pode haver reação tipo I e tipo II, sobretudo em indivíduos que apresentam a forma borderline lepromatosa^{40,42}.

Ambos os tipos reacionais decorrem de processo inflamatório e estão acompanhados de aumento de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-10 e IL-12 entre outras^{43,44}. Ultimamente tem sido identificado o aumento dos níveis da neopterina nas reações hansênicas que é um produto da ativação de macrófago e marcadora da imunidade mediada por células⁴⁵.

Reação tipo I ou Reversa (RR)

Os episódios de reação tipo I acometem entre 10% e 33% dos pacientes com hanseníase e surgem geralmente durante o tratamento específico ou após o primeiro ano da alta. Estes episódios podem ser associados a alguns fatores de risco como vacinação pelo BCG, grande número de nervos espessados e de lesões que acometem principalmente a face, forma borderline e diagnóstico tardio da hanseníase^{46,47}.

Estudos mais recentes observaram que a reação tipo I está relacionada a um aumento abrupto da imunidade celular frente aos antígenos, um padrão típico da resposta tipo Th1, com aumento da expressão das citocinas IL-1b, TNF- α , IL-2 e IFN- γ , enquanto outras citocinas do padrão Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 estão reduzidas⁴⁵.

A reação tipo I está mais presente nas formas de hanseníase dimorfa ou borderline, tem duração de semanas a meses e pode levar ao abandono do

tratamento¹². Apresenta as seguintes características clínicas: infiltração de lesões antigas associadas ao surgimento de novas lesões em forma de manchas ou placas infiltradas, eritema, dor, lesões vésico-bolhosas, ulcerações, hiperestesia, parestesia, mal-estar e raramente febre, podendo vir acompanhada de neurite^{3,35}. A distinção entre recidiva e reação reversa pode ser difícil⁴⁷.

Algumas variações clínicas da reação tipo I podem ser observadas: presença de pseudonódulos, sobretudo em face de pacientes melanodérmicos, que podem ser confundidos com eritema nodoso, aspectos semelhantes à erisipela e manchas hipocrômicas ou eritematosas^{41,48}. Nos pacientes HIV +, principalmente naqueles com reconstituição imunológica proporcionada pela terapia anti-retroviral, podem surgir lesões verrucosas ou ulcerações em lesões pré-existentes⁴⁹.

Manifestações sistêmicas como febre, mal-estar, adinamia, artralguas, edema de extremidades ou generalizado podem acompanhar o quadro reacional tipo I, principalmente nos pacientes multibacilares⁴¹.

Os achados histopatológicos observados na reação reversa são: o encontro do granuloma, aumento do número de linfócitos, de células epiteloídes e de células gigantes, diminuição do número de bacilos, hiperplasia epitelial e necrose focais. No entanto há carência de um critério histológico mais uniforme para a reação reversa⁵⁰. Alterações bioquímicas e hematológicas geralmente não são observadas⁴¹.

Reação tipo II ou eritema nodoso hansênico (ENH)

A reação hansênica tipo II ou ENH é caracterizada por manifestações agudas que acometem os indivíduos com a forma clínica dimorfa virchowiana e em cerca de 60% dos casos virchowianos em tratamento, mas pode surgir antes do início da doença, bem como persistir até por cinco anos após tratamento^{51,52}. Gallo e Oliveira em 1997⁵³, avaliando o comportamento da hanseníase após alta em 133 indivíduos multibacilares, observaram que o eritema nodoso foi a reação mais frequente e recorrente.

O eritema nodoso é reconhecido como alteração da imunidade humoral, sendo exemplo de uma reação imunológica, com predomínio da reação de hipersensibilidade por imunocomplexos circulantes. Estudos têm observado aumento transitório da imunidade celular através da elevação dos níveis séricos de TNF- α e IL-1, estimulação policlonal de anticorpos, queda do produto C3d do sistema complemento e presença de imunocomplexos na área afetada por este quadro reacional⁵⁴.

Devido a liberação de grande quantidade de antígenos bacterianos e a formação de imunocomplexos circulantes, ocorre a nível tecidual, uma resposta inflamatória com ativação macrofágica, linfocítica, elevação de TNF- α e de anticorpos para as frações antigênicas do *M. Leprae*. Há um aumento seletivo IL-6, IL-8 e IL-10 nas lesões indicando uma resposta do tipo Th2. Tem sido detectada, durante o ENH, a presença da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos neutrófilos, além de TNF- α e TGF- β 1 estarem presentes nos neutrófilos e macrófagos das lesões reacionais^{30,32}.

As alterações imunológicas culminam com o aparecimento abrupto de nódulos inflamatórios, dérmicos ou subcutâneos, móveis à palpação, geralmente

dolorosos que variam de poucos a inúmeros, de coloração rósea, e podem evoluir para pústulas e bolhas, com posterior ulceração e formação de necrose, na forma mais grave do ENH, conhecida como “eritema nodoso necrotizante.” A face e as extremidades são áreas bastante afetadas e há tendência à simetria⁴¹.

A reação tipo II também vem acompanhada de sintomatologia relacionada ao acometimento de vários órgãos como olhos (irite), fígado, baço, linfonodos (linfadenomegalia sem fistulização ganglionar), peritônio, testículos, articulações (artrite), tendões, músculos, ossos e rins. Pode haver febre intermitente vespertina, perda de peso e leucocitose. Este quadro também pode se manifestar por alterações unicamente sistêmicas ou com lesões típicas de eritema polimorfo (manchas eritematosas centradas por vesículas), com ou sem neurites. Admite-se que esses fenômenos sejam devidos à destruição de bacilos, liberação de antígenos, formação de imunocomplexos, fixação de fragmentos do complemento que, por sua vez, atrai neutrófilos, cujas enzimas destroem os tecidos⁵⁵.

Nos achados histopatológicos da reação tipo II, observa-se infiltrado inflamatório neutrofílico, perivascular, em derme reticular, compatível com vasculite e numerosos bacilos fragmentados e granulosos⁵⁰.

A neurite é caracterizada pelo surgimento de dor espontânea ou à compressão de nervos periféricos. Pode acompanhar o quadro reacional tipo I, o tipo II ou surgir de forma isolada quando não vem acompanhada de manifestações cutâneas. Pode ser aguda, silenciosa, recorrente ou crônica e levar à perda da função sensitivo-motora. Acomete principalmente os nervos ulnar e tibial posterior. O dano neural é um evento importante e deve ser reconhecido e instituído o tratamento o mais rápido para impedir incapacidades^{3,35,46}.

Tratamento das reações

O tratamento dos episódios reacionais visa a prevenção de sequelas e deve ser o mais rapidamente instituído, podendo, no entanto, ser muito prolongado. Os corticosteróides são indicados tanto para reação tipo I, quanto a tipo II em mulheres em idade fértil. Sua redução é lenta e seu uso tende a ser prolongado. Não há relatos que a inibição da multiplicação do *M. leprae* seja comprometida com o uso dos corticosteróides⁵².

O tratamento do eritema nodoso é feito com talidomida, um potente inibidor do TNF- α e supressor dos mecanismos de fagocitose e é muitas vezes somada aos corticosteróides, por causa da associação com neurites (presentes em até 56% dos casos de eritema nodoso hansênico) e da associação com ENH necrotizante, orqui-epididimite, irite, nefrite, além de mão e pé reacional⁵⁵.

Frequentemente esse quadro reacional, semelhante ao que ocorre na reação tipo I, pode levar ao abandono do tratamento pelo paciente. O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são cruciais para o manuseio e prevenção das incapacidades³⁵.

As reações hansênicas são consideradas fator de risco para retratamento, principalmente quando o diagnóstico diferencial com a recidiva da doença é dificultado⁴. Segundo a OMS (1988) a recidiva da doença é caracterizada pelos seguintes achados: aumento de tamanho das lesões cutâneas antigas e surgimento de novas, eritema e infiltração, ulceração não-traumática das lesões, espessamento e/ou hiperestesia de nervos e troncos previamente normais,

paresia ou paralisia de músculos não afetados anteriormente, novas áreas anestésicas ou acentuação da alteração de sensibilidade em áreas previamente afetadas e não resposta ao tratamento com corticóides⁵³.

Genética e hanseníase

Antes da descoberta do agente etiológico, a hanseníase era considerada uma doença herdada. As observações clínicas de que é necessário algo mais além do contato com o bacilo para desenvolver a doença, bem como a melhoria de ferramentas para estudos genéticos, retomaram as pesquisas em cima do papel da herança genética na hanseníase^{44,56}.

Já em 1937, Rotberg⁵⁶ sugeriu a possibilidade de um componente genético, denominado fator N, como determinante de resistência observado pela positividade ao teste de Mitsuda. Hoje se atribui ao fator N um conjunto de genes que interagindo de forma complexa, determinam o comportamento da doença.

Beiguelman *et al.*⁵⁷, observavam que nas famílias em que o pai ou a mãe eram virchowianos, os parentes consanguíneos tinham maior risco de adoecimento. Fato que foi reforçado por Durães *et al.*⁵⁸, que estudaram vinte famílias no município de Duque de Caxias no Rio de Janeiro e verificaram que o risco de adoecimento foi 2,8 vezes maior nos contactantes consanguíneos dos casos de hanseníase.

A hanseníase é uma doença complexa resultando de uma combinação da expressão de um número variado de genes, que associados aos fatores

ambientais, socioeconômicos e a predisposição individual podem determinar seu desencadeamento⁵⁹.

Estudos observacionais (agregação familiar) e estudos comparativos (taxa de concordância da doença entre gêmeos) muitas vezes não conseguem elucidar de forma categórica a identidade, localização e o número de genes envolvidos em uma determinada doença. Para o melhor entendimento da influência genética na participação de processos patológicos são necessárias pesquisas que envolvem marcadores genéticos moleculares, como as de ligação, que realizam mapeamento genético e as de associação que comparam as frequências alélicas⁵⁹.

Um conjunto de genes pode interferir no desencadeamento da hanseníase e no desfecho das diferentes formas clínicas e a susceptibilidade para a expressão clínica da doença, depende dentre outros fatores, da predisposição genética^{5,44}.

A partir das observações das repostas no padrão Th1/Th2 nos doentes, os genes relacionados ao complexo antígeno leucocitário humano (HLA) e não-HLA foram estudados. O envolvimento de alelos e haplotipos, principalmente HLA-DR2 e HLA-DR3 foram considerados fatores de risco genético para susceptibilidade e são mais frequentes nas formas paucibacilares, pois o complexo DR indica resistência, enquanto o HLA DQ1 está relacionado ao surgimento de formas mais agressivas da doença¹⁶.

Além dos genes do complexo HLA, que foram avaliados quanto à susceptibilidade à doença, alguns genes relacionados ao complexo não-HLA têm sido estudados. Variações nos genes que expressam a IL-10, uma citocina importante na modulação da resposta imune, são associadas ao controle

fenotípico da doença. Outro grupo de genes estudados são os do sistema parquina (*PARK2*) e o co-regulado com parquina (*PACRG*) que, em estudo realizado em 86 famílias no Vietnã do sul, evidenciou um aumento de até 5,3 vezes mais o risco de contrair a doença^{60,61}.

Gene *NRAMP1* ou *SLC11A1*

Em pesquisas realizadas em camundongos observou-se resistência a parasitas intracelulares controlada pelo gene *NRAMP1*. Inicialmente identificou-se no cromossoma 1 do camundongo, um único gene que proporcionava resistência a *Salmonella typhimurium* (*lty*), *Leishmania donovani* (*Lsh*) e *Mycobacterium bovis* (*Bcg*), denominado *lty/Lsh/Bcg*. Logo após foi denominado *NRAMP1* e mais recentemente este gene tem sido chamado de *Slc11a1* (*solute carrier family 11, member 1*)^{62,63,64,65,66}.

Os estudos de Abel *et al.* em 1998⁹ e Meisner *et al.* em 2001¹⁰ demonstraram o envolvimento deste gene na hanseníase.

É um gene que não pertence ao grupo HLA, estende-se por 12kb, composto de quinze exons e localiza-se na região distal do braço inferior do cromossomo dois humano, região 2q35a. Codifica a proteína *NRAMP1* humana, composta de 550 aminoácidos⁶⁷.

As localizações mais estudadas das variações polimórficas do gene *NRAMP1* são exibidas na figura abaixo

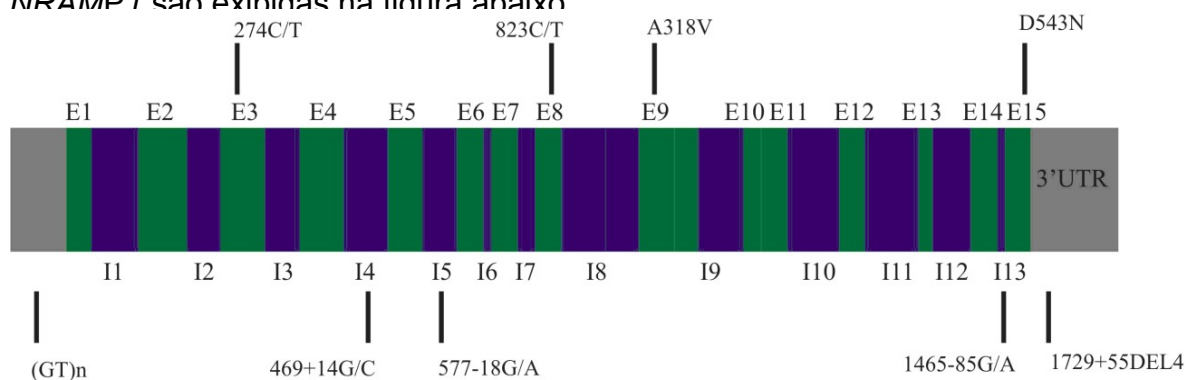


Figura 1. Variações polimórficas do gene *NRAMP1*.

Fonte: Adaptado por Liu *et al.*⁷⁸, 1995.

O *NRAMP1* vem sendo apontado como importante gene envolvido com a resistência a parasitas intracelulares por sua atividade estar diretamente ligada ao processamento de antígeno pelas células fagocitárias^{69,70}. É expresso no compartimento lisossomal dos macrófagos, monócitos teciduais e principalmente nos leucócitos periféricos, no fígado, baço e pulmões, após indução por linfocinas e produtos bacterianos^{71,72}. Recentemente foi relatada a sua expressão em células dendríticas⁷³.

A proteína codificada pelo gene *NRAMP1* pertence à família de proteínas de membrana e tem função no transporte celular. Entre as suas atribuições há a ativação do macrófago e da produção de interleucinas. Estudos recentes demonstram que a *NRAMP1* funciona com uma bomba de efluxo de metal que transporta cátions divalentes, como Fe^{++} e Mn^{++} . Ao remover estes metais pesados que são importantes para o metabolismo bacteriano, restringe a replicação intracelular do patógeno^{74,75}.

O importante trabalho de Abel *et al.*⁹ avaliou a predisposição à hanseníase *per se* em população vietnamita através de estudos de ligação em pares irmãos e concluiu que havia relação entre determinados haplotipos e susceptibilidade à hanseníase.

Frehel *et al.*⁷⁶ estudaram o efeito da expressão do *NRAMP1* na replicação e na maturação do *Mycobacterium avium* em fagossomos de macrófagos murinos, através de microscopia eletrônica e concluíram que essa expressão tem efeito bacteriostático nos macrófagos *NRAMP1* positivos.

Nevo e Nelson⁷⁷, em 2006 formularam a hipótese para a função da proteína codificada pelo *NRAMP1* na interação entre o patógeno e o macrófago. A bactéria fagocitada produz metaloenzimas como catalase e a superóxido dismutase que neutralizam a ação de componentes oxigênio reativos produzidos pelo macrófago. A proteína codificada pelo *NRAMP1* pode operar bombeando íons metais do lúmen fagossômico, restringindo a bactéria da produção dessas enzimas protetoras, bem como sua multiplicação e sua propagação.

Algumas mutações no gene *NRAMP1* anulam a resistência natural a infecções por *Mycobacteriae*. Liu *et al.*⁷⁸, investigando 80 pacientes com tuberculose, descreveram nove polimorfismos, dentre eles o 274C/T, que decorre de uma troca de bases citosina (C) por timina (T) na posição 274 do éxon 3, o polimorfismo D543N, no qual há troca de bases guanina (G) por adenina (A) na posição 1703 do éxon 15, e o terceiro polimorfismo 1729+55del4, no qual há deleção das bases TGTG na região 3' não traduzida (3'UTR). Concluíram que as variantes *NRAMP1* podem ser úteis para análise genética da susceptibilidade humana à hanseníase, em analogia à verificada para parasitoses intracelulares, porque esses polimorfismos são importantes reguladores das vias de diferenciação de macrófagos.

A codificação da proteína nos indivíduos *NRAMP1* leva a uma atividade macrofágica adequada, um padrão de resposta Th1 e tendência ao indivíduo ser

paucibacilar. Especula-se que isto ocorra quando há a expressão dos alelos selvagens, C para 274 C/T, G para D543N e +TGTG para o polimorfismo 1729+55del4⁷³.

O quadro 1 exibe as referências citadas do gene *NRAMP1* e a hanseníase.

Quadro 1. Polimorfismos do gene *NRAMP1* e associação com a hanseníase.

Polimorfismo	População – país	Relevância	n amostra	Autor -ano
(GT)n	Minas Gerais Brasil	Alelo 2 relacionado à susceptibilidade ao patógeno	90	Ferreira 2004
(GT)n	África –Gâmbia	Não houve relação	273	Meisner 2001
469+14G/C	África –Gâmbia	Não houve relação	273	Meisner 2001
1729+55del4	África –Gâmbia	Maior número de heterozigose nos multibacilares	273	Meisner 2001

Atualmente mais de dez sítios polimórficos têm sido descritos no gene *NRAMP1*. Há expressão de alelos que são promotores pobres e predispõem a susceptibilidade às infecções por parasitas intracelulares e oferecem proteção às doenças auto-imunes, bem como outros que oferecem proteção às infecções por parasitas intracelulares e levam à susceptibilidade às doenças auto-imunes⁶⁹.

Searle e Blackwell⁶⁶, através da técnica da PCR, observaram que o polimorfismo *GT* na região promotora do gene *NRAMP1* humano, codificava a formação de repetições dinucleotídicas para Z-DNA e encontraram quatro alelos possíveis: (1) t(gt)₅ac(gt)₅ac(gt)₁₁g; (2) t(gt)₅ac(gt)₅ ac (gt)₁₀g; (3)

t(gt)₅ac(gt)₅ac(gt)₉g; e (4) t(gt)₅ac(gt)₉g. Observaram que os alelos 1 e 4 são raros e os alelos 2 e 3 mais frequentes e concluíram que a expressão do alelo 2 do *NRAMP1* contribui para a susceptibilidade às infecções parasitárias.

Quando se tenta associar a expressão de susceptibilidade do *NRAMP1* ao *M. leprae* com a reação de Mitsuda, surgem resultados controversos. A reação de Mitsuda é a expressão clínica de uma resposta imune específica ao *M. leprae* e quando positiva, indica boa imunidade.

Os estudos de Hatagima *et al.*⁷⁹, em 2001, com a finalidade de correlacionar o teste de Mitsuda com três polimorfismos (274 C/T, D543N e 1729+55del4) do *NRAMP1*, não forneceram evidências da ligação entre o Mitsuda e estes polimorfismos estudados. Roger *et al.*⁸⁰ chegaram à mesma conclusão.

Alcais *et al.*⁸¹ avaliando pares irmãos de vinte famílias vietnamitas, através de estudos de ligação gênica, verificaram a relação entre reação de Mitsuda e haplótipos variantes para seis polimorfismos dialélicos que incluíam as posições 274C/T e D543N. Mostraram associação de haplótipos com a reação positiva $\geq 10\text{mm}$ e negativa $\leq 3\text{mm}$. Os resultados sugeriram, do ponto de vista conceitual, que a interação da proteína *NRAMP1* estava associada à modulação do risco para infecção e para o desenvolvimento da doença.

Um dos trabalhos mais importantes em relação à associação do polimorfismo do *NRAMP1* e a hanseníase foi o de Meisner *et al.*¹⁰, que tomando como base a associação entre polimorfismo da *NRAMP1* e susceptibilidade à tuberculose, compararam a distribuição do polimorfismo 1729+55del4 na hanseníase e observaram maior frequência de heterozigose entre multibacilares e

concluíram que variações nesse gene podem influenciar na apresentação clínica da doença.

Ferreira *et al.*⁸², em 2004, avaliaram a interação do polimorfismo (GT)_n do *NRAMP1* com o resultado da reação de Mitsuda em noventa indivíduos com hanseníase e sessenta e um contactantes não consanguíneos em Minas Gerais. Não observaram diferenças significativas nas frequências dos alelos 2, 3 e 4 em relação à prova de Mitsuda entre os doentes paucibacilares, multibacilares e contactantes. Porém os indivíduos mitsuda negativos foram mais associados aos genótipos 2/2 e 2/3 e tiveram sete a oito vezes mais chances de desenvolverem a doença.

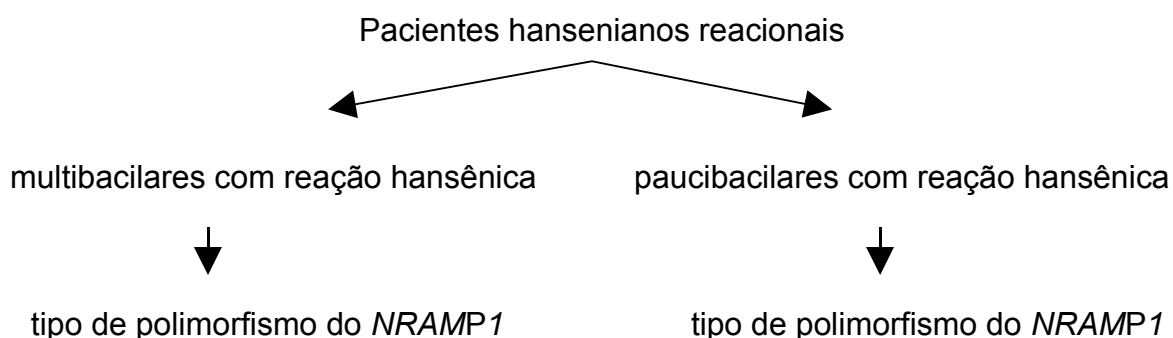
Os achados contraditórios em relação ao mitsuda e *NRAMP1* poderiam ser explicados pelas diferentes combinações de frequências de locos do *NRAMP1*. Em contrapartida tem-se observado também um aumento crescente nos achados da ligação do gene *NRAMP1* com a tuberculose e a leishmaniose que são doenças infecciosas em que a participação do macrófago é semelhante à hanseníase^{8,67}. É pertinente o interesse em estudar os polimorfismos deste gene e sua relação com a proteção ou susceptibilidade a hanseníase⁸³.

A presença de polimorfismos na região promotora do gene *NRAMP1* e suas relações com a hanseníase têm sido relatadas na literatura, mas não foram encontrados estudos que evidenciem a expressão de gene *NRAMP1* nas reações hansênicas. Na hanseníase, doença infecciosa crônica, a possibilidade de uma predisposição genética vir a ser um dos fatores responsáveis pela determinação das diferentes formas de comportamento desta moléstia, torna-se importante.

Os principais objetivos deste trabalho foram descrever e comparar as características epidemiológicas e clínicas da amostra estudada e investigar três polimorfismos gênicos da proteína NRAMP1: 274C/T, D543N, 1729+55del4, determinando as frequências alélicas e genotípicas em pacientes hansenianos multibacilares reacionais e pacientes hansenianos paucibacilares reacionais provenientes de uma área endêmica da hanseníase e acompanhados nas unidades de referência para o tratamento da hanseníase no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros/ Universidade de Pernambuco (CISAM/UPE) e na Policlínica Lessa de Andrade – Recife – PE.

Pergunta condutora

Quais as frequências de variações alélicas e genotípicas do gene *NRAMP1* observadas nos indivíduos reacionais multibacilares em comparação aos paucibacilares?



Objetivos

Objetivo geral

Descrever e comparar as características clínicas da população estudada e investigar três polimorfismos gênicos da proteína NRAMP1: 274C/T, D543N, 1729+55del4, determinando as frequências alélicas e genotípicas em pacientes hansenianos multibacilares reacionais e pacientes hansenianos paucibacilares reacionais acompanhados nas unidades de referência para o tratamento da hanseníase no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros/ Universidade de Pernambuco (CISAM/UPE) e no Lessa de Andrade - Recife - PE.

Objetivos específicos

- ✓ Detalhar as características clínicas da amostra estudada avaliando os seguintes aspectos: idade, sexo, cor de pele, procedência, forma clínica, baciloscopia inicial e final, tipo de tratamento, tipo de reação (I ou II), tempo de surgimento da reação em relação ao início do tratamento e drogas utilizadas.
- ✓ Verificar se existe diferença na distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos entre os pacientes reacionais multibacilares e reacionais paucibacilares.

- ✓ Verificar se existe diferença na distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos em relação ao sexo entre os pacientes reacionais.
- ✓ Verificar se existe diferença na distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos em relação ao fototipo entre os pacientes reacionais.
- ✓ Comparar as frequências genotípicas dos polimorfismos entre indivíduos com as reações tipo I e tipo II.

Casuística e métodos do estudo

Desenho do estudo

Estudo comparativo e de caráter observacional no qual foram avaliados e comparados clínica e laboratorialmente indivíduos com reação hansênica multibacilares e paucibacilares, com ênfase no tipo de variação alélica e genotípica observadas em cada um dos grupos.

População alvo

Foram estudados 101 pacientes hansenianos com baciloscopia positiva e 100 pacientes hansenianos com baciloscopia negativa com história de reação hansênica acompanhados no ambulatório de hanseníase do Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM) e no Lessa de Andrade em Recife – Pernambuco no período de Março de 2007 a Dezembro de 2008.

Critérios de inclusão

A inclusão dos doentes baseou-se nos seguintes critérios:

- ✓ Pacientes com baciloscopia inicial diferente de zero apresentando quadro reacional tipo I e/ou reação tipo II (descrito a seguir na definição das variáveis).
- ✓ Pacientes do grupo comparativo com baciloscopia inicial = 0 (paucibacilares), menos de cinco lesões dermatológicas e até um tronco nervoso afetado com história de quadro reacional tipo I (descrito a seguir na definição das variáveis).

Critérios de exclusão

- ✓ Foram excluídos os pacientes que fizeram tratamento irregular com monoterapia sulfônica.

- ✓ Foram excluídos também os pacientes com suspeita de recidiva da hanseníase adotando-se os critérios da área técnica de Dermatologia Sanitária (ATDS/MS)⁸⁴ que contemplam as manifestações cutâneas e nervosas não responsivas ao tratamento com corticóides e/ou talidomida e exame baciloscópico evidenciando bacilos íntegros ou se foi observado um aumento de dois *logs* em qualquer sítio, quando comparado com o exame da alta.
- ✓ Foram excluídos os pacientes com a forma neurítica pura de hanseníase.

Tipo de amostragem

O cálculo para estudo foi feito através de um estudo piloto, utilizando-se o programa estatístico Epi Info versão 6,04 considerando-se a frequência das reações hansênicas. O número final estimado foi de cem pacientes multibacilares e cem paucibacilares.

Os seguintes parâmetros estatísticos foram utilizados para a avaliação dos resultados.

- ✓ Proporção da exposição entre os pacientes paucibacilares e multibacilares: utilizou-se os percentuais de risco derivados de estudos publicados em literatura.
- ✓ Erro Alfa: Representou a probabilidade de rejeitar-se a hipótese nula sendo ela verdadeira, representa a probabilidade de, em não havendo associação entre a exposição (diferenças alélicas e/ou genotípicas dos três

polimorfismos estudados) e efeito (paucibacilar ou multibacilar), esta ser “falsamente” demonstrada. Foi considerado um erro alfa de 5%.

- ✓ A avaliação da magnitude da diferença de exposição entre os dois grupos foi estimada através da razão de chances.
- ✓ Power: Determinou a probabilidade que a diferença entre os dois grupos fosse encontrada, se presente. Foi estabelecido um erro beta de 20% que corresponde a um power de 80%.

Definição das variáveis

Variável dependente

Baciloscopia inicial no indivíduo com qualquer tipo de reação hansênica. O índice baciloscópico (IB) realizado com rotina para início do tratamento pela média da contagem de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) colhido em quatro locais (lóbulo de orelha, cotovelo direito e lesão de hanseníase), corados pelo Ziehl-Nielsen e quantificados de 1 a 6 +.

Definição:

Exame baciloscópico (procedimento de rotina para acompanhamento desses pacientes) que foram realizados no CISAM.

Categorização:

paucibacilar (índice = 0.00)

multibacilar (índice > 0.01)

Variáveis independentes

a) Padrão de variação alélica

Definição: tipo de variação alélica observada nos pacientes paucibacilares e multibacilares dos seguintes polimorfismos: 274 C/T: C ou T, D543N: A ou G e para 1729+55del4: – TGTG ou +TGTG.

b) Padrão de variação genotípica

Definição: tipo de variação genotípica observada nos pacientes paucibacilares e multibacilares dos seguintes polimorfismos: 274 C/T: CC, CT ou TT, D543N: AA, GA ou GG e para 1729+55del4: -TGTG/-TGTG, +TGTG/-TGTG ou +TGTG/+TGTG.

c) Sexo: masculino/feminino

d) Idade, segundo grupos etários: categorização: 1-14 anos, 15-29 anos, 30-44 anos, 45-59 anos, > 60 anos.

e) Tipo de pele: classificação segundo Fitzpatrick ⁸⁵.

Tipo I: Pele muito clara, sempre queima, nunca bronzeia.

Tipo II: Pele clara, sempre queima e algumas vezes bronzeia.

Tipo III: Pele menos clara, algumas vezes queima e sempre bronzeia.

Tipo IV: Pele morena clara raramente queima e sempre bronzeia.

Tipo V: Pele morena escura, nunca queima e sempre bronzeia.

Tipo VI: Pele negra, nunca queima, sempre bronzeia.

f) Procedência: categorização: Recife, grande Recife e interior de Pernambuco.

g) Forma clínica da hanseníase:

Definição: baseada na classificação clínica do paciente (classificação de Ridley e Jopling)¹⁴.

Categorização:

Hanseníase tuberculóide (MHT)

Hanseníase borderline ou dimorfa (MHBT/MHBB/MHBV)

Hanseníase virchowiana (MHV)

h) Esquema terapêutico adotado:

Definição: definido como esquema de tratamento adotado para o paciente e que constava no prontuário do mesmo. Como esquema padrão foi definido o preconizado pela organização mundial de saúde para as formas paucibacilares e multibacilares na época em que o mesmo foi tratado, ou seja, seis meses para as formas paucibacilares e um ano para as multibacilares. O esquema alternativo foi o regime terapêutico diferente dos anteriores descritos ou uso de drogas opcionais.

Categorização: padrão / alternativo / não informado

i) Tipo de reação:

Reação reversa ou tipo I: reação que apresentasse pelo menos uma destas características a seguir, quando observada pela pesquisadora no momento do exame, referida pelo paciente quando interrogado pela pesquisadora, ou pelo relato de prontuário pelo médico assistente. Presença de qualquer um destes sinais ou sintomas: infiltração nas lesões antigas de hanseníase, alterações de cor, edema, dor; surgimento de novas lesões em forma de placas eritemato-

infiltradas, tricotóides e com distúrbios de sensibilidade (parestesia/hipo ou anestesia), dor ou espessamento em um ou mais nervos periféricos. Associação de qualquer um destes citados anteriormente a: febre e/ou mal estar, hipersensibilidade palmar e plantar, lesões vésico-bolhosas, ulceração, edema de mãos e pés.

Reação tipo II ou eritema nodoso: reação que apresentasse pelo menos uma das características a seguir, quando flagrada pela pesquisadora, relatada pelo paciente, ou referida no prontuário pelo médico assistente. Foi quantificada pela contagem do número de nódulos nos seguimentos corporais afetados: membros inferiores e abdome ou membros superiores, tórax e face e foi considerada leve, na presença de menos de 10 nódulos, moderada quando havia 10 a 20 nódulos e severa, em presença de mais de 20 nódulos por seguimento corporal afetado. Os nódulos poderiam ser encontrados de forma isolada ou associados a qualquer um desses achados: febre e/ou mal estar; astenia; vesículas e/ou bolhas e/ou úlceras; dor ou espessamento em um ou mais nervos periféricos (neurite); linfadenopatia; irite; artrite e/ou artralgia e edema/ dor em mãos e pés. Também foi considerada reação tipo II se fosse observado o eritema polimorfo isolado.

j) Índice baciloscópico final:

Definição: resultado da baciloscopia realizada no final do tratamento conforme classificação da OMS.

Categorização:

paucibacilar (índice = 0.00)

multibacilar (índice >0,01)

não informado

k) Período de surgimento da reação clínica:

Definição: período de tempo em relação ao tratamento em que surgiu a reação hansênica que constava no prontuário ou referido pelo paciente.

Categorização:

antes do tratamento

no tratamento

menos de 6 meses após a alta

acima de 6 meses após a alta

acima de um ano após a alta

l) Regularidade do tratamento:

Categorização:

sem abandono por mais de 3 meses consecutivos

com abandono de tratamento por mais de 3 meses consecutivos

m) Retratamento:

Definição: se o paciente realizou novo tratamento para hanseníase, após ter realizado o tratamento completo.

Categorização: sim/não

Qualidade dos instrumentos de medida

Padronização das técnicas

Na pesquisa foram empregados os seguintes métodos diagnósticos:

a) Baciloscopia: Isolamento do *M. leprae* segundo normas nacionais e consiste de pequena incisão na pele feita com lâmina de bisturi nos seguintes locais: 02 lóbulos de orelhas, cotovelo direito e lesão, coloração de Ziehl-Neelsen e leitura pela escala logarítmica de Ridley, realizados no laboratório do CISAM/UPE.

b) Extração, amplificação do DNA, digestão enzimática e identificação dos polimorfismos através da técnica do polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP).

O DNA genômico foi extraído de leucócitos pelo protocolo de Lahiri e Nurnberger⁸⁶, e quantificado em gel de agarose pela comparação com padrões de DNA.

A determinação dos polimorfismos foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pela técnica do polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) proposto por Lui *et al.*⁷⁸. A reação foi realizada em um total de 25µL contendo 50 ng a 100 ng de DNA, Tris-HCL 10 mM (pH 9.0), KCl 50 mM, MgCl 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada iniciador e uma unidade de *Taq* DNA polymerase (Biotools, USA).

Os iniciadores utilizados na PCR foram: 5'-TCGCACCATCCCTATACCCAG-3' e 5'-TCTCGAAAGTGTCCCACTCAG-3' para o polimorfismo 274 C/T e 5'-GCATCTCCCCAATTCATGGT-3' e 5'-AACTGTCCCACTCTATCCTG-3' para os polimorfismos D543N e 1729 + 55 del 4. As condições da reação foram: um ciclo inicial de 94°C por 3 min, seguido de um protocolo com 35 ciclos a 94°C por 1 min para desnaturação, 60°C por 1 min para anelamento e 72°C por 1 min para extensão e um ciclo de extensão final de 72°C

por 10 min no termociclador *Gradient* da *Eppendorf*. As amostras foram submetidas à amplificação do gene constitutivo *GPDH* como controle positivo de reação e verificação da qualidade do DNA extraído. Como controle negativo da reação, foram usados os reagentes da PCR, em ausência de DNA. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídeo (0,5µg/mL), sob luz ultravioleta e fotografado com filme *Polaroid* 667.

A segunda etapa do ensaio constou de digestão enzimática de 5 µL do produto da PCR, adicionados a uma solução preparada com tampão (1x) de reação NEBuffer4 (*BioLabs*®, *United Kingdom*). Para o polimorfismo 274 C/T a PCR produziu fragmentos de 216 pares de bases (bp), os quais tratados pela enzima de restrição *Mnl I* a 37°C durante 18 horas, definiram o alelo mutante (T) correspondente aos fragmentos 167, 37 e 12bp e o alelo selvagem (C), correspondente aos fragmentos 102, 65, 37 e 12bp. Para o polimorfismo D543N, os fragmentos com 240 bp ou 244bp foram submetidos à enzima de restrição *Ava II*, definindo o alelo mutante (A) correspondente aos fragmentos 201 e 39bp e o selvagem (G) correspondente aos fragmentos 126, 79 e 39bp. Os fragmentos do polimorfismo 1729 + 55del4, com 240bp ou 244bp, foram submetidos à enzima de restrição *Fok I* definindo o alelo mutante (-TGTG), correspondente ao fragmento 240bp, e o alelo selvagem (+TGTG), com os fragmentos 211 e 33bp.

O produto da digestão foi visualizado em gel de poliacrilamida a 10% e corado pela prata. O gel foi secado em filme celofane e arquivado para determinação dos genótipos segundo o protocolo de Liu *et al.*⁷⁸.

Métodos de coleta

Os pacientes que compareceram ao ambulatório de hanseníase do Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM) e Centro de Saúde Lessa de Andrade por demanda espontânea, foram convidados a participar do estudo e, após explicação dos objetivos do mesmo e consentimento livre e esclarecido, foram divididos em dois grupos: aqueles com baciloscopia inicial positiva e que apresentaram reação hansênica, e o grupo comparativo que foi selecionado entre os pacientes com baciloscopia inicial negativa.

Nos pacientes foram realizados exame clínico dermatológico e neurológico. Os dados foram coletados através de um questionário, elaborado para este estudo (Apêndice B) que se compõe de dados relativos à identificação, diagnóstico e tratamento (dados do prontuário) e à caracterização do estado reacional e genotipagem.

Após o procedimento anterior foi coletado de cada paciente sangue venoso periférico, em torno de 7,0 ml em tubos vacutainer contendo citrato de sódio, estocados em refrigeração adequada no laboratório de biologia molecular do Aggeu Magalhães – FIOCRUZ para obtenção das amostras de DNA.

Plano de tabulação e análise dos dados

Para avaliar a associação da variável dependente com cada uma das variáveis independentes foi calculado o *odds ratio* (OR), intervalo de confiança e valor de p (teste do Qui-quadrado - χ^2).

Foi realizada uma análise multivariada através de modelo de regressão logística. O modelo foi inicialmente saturado com a inclusão de todas as variáveis que na análise univariada apresentaram valor de $p < 0,20$ e foi testada a significância estatística da retirada de cada uma das variáveis. A análise multivariada foi utilizada em virtude da necessidade de lidar, simultaneamente, com muitas variáveis, controlando o efeito de cada fator pelos outros fatores estudados para verificar quais são independentes.

As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas pela contagem gênica direta.

A análise estatística foi realizada pelos programas *MSOffice Excel* versão 2003 para o gerenciamento do banco de dados; *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) for Windows versão 12.0, para a execução dos cálculos estatísticos, elaboração e edição de gráficos e *MSOffice Word* versão 2003, para elaboração das tabelas. Foram empregados os testes Qui-quadrado (Mantel-Haenszel), para testar associação entre variáveis qualitativas, e exato de Fisher, nos casos em que o valor esperado era menor que cinco, ambos em nível de significância de 0,05.

Considerações éticas

Os pacientes que participaram do estudo assinaram um termo de consentimento (Apêndice A) e foram esclarecidos dos riscos e benefícios além da confidencialidade da pesquisa.

O projeto teve a aprovação do Comitê de Ética do CISAM por meio do CAAE nº. 0009.0.250.250-07 (Anexo I).

Referências

1. World Health Organization. WHO. Weekly epidemiological record. No. 25, 2007, 82, 225–232 Geneva, 2007.
2. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/DATASUS/MS). Doenças de notificação. Acompanhamento da Hanseníase [base de dados na internet]. Up to date. [citado em 01 de Julho de 2009]. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br>.
3. Soares CGMS. Hanseníase no estado do Pará: perfil epidemiológico da população que demanda internação por reações hansênicas. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. RJ, 2000.
4. Brito MFM. O retratamento em hanseníase: Identificação dos fatores de risco – Um estudo caso-controle. [Dissertação de Mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 2004.68p.
5. Alcaïs A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. Curr Opin Immunol. 2005; 17:44-8.
6. Bassuny WM, Kenji I, Nobuo M, Saifuddin A, Hitoshi K. Association study of the NRAMP1 gene promoter polymorphism and early-onset type 1 diabetes. Immunogenetics. 2002; 54(4): 282- 285.
7. Rodriguez MR, Gonzalez- Escribano MF, Aguilar F, Valenuela A, Garcia A, Nunez- Roldan A. Association of NRAMP1 promoter gene polymorphism with the susceptibility and radiological severity of rheumatoid arthritis. Tissue Antigens. 2002; 59(4), 311–315.
8. [Gallant CJ](#), [Malik S](#), [Jabado N](#), [Cellier M](#), [Simkin L](#), [Finlay BB](#), [Graviss EA](#), [Gros P](#), [Musser JM](#), [Schurr E](#). Reduced in vitro functional activity of human NRAMP1 (SLC11A1) allele that predisposes to increased risk of pediatric tuberculosis disease. Genes Immun. 2007; 8(8):691-8.
9. Abel L, Sanchez FO, Oberti J, Thuc NV, Hoa LV, Lap VD, Skamene E, Lagrange PH, [Schurr EJ](#). [Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene](#). Infect Dis. 1998; 177(1):133-45.
10. Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AVS. Association of NRAMP1 Polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in West Africans. Am J Trop Med. Hyg. 2001; 65: 733–735.
11. Sociedade Brasileira de Hansenologia e sociedade brasileira de Dermatologia. Hanseníase: Episódios Reacionais Projeto Diretrizes, 2003.
12. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. Textbook of Dermatology. Boston: Dnj Lockwood, 2002.chap 29,p.29.1- 29.2.
13. Azulay RD, Azulay DR. Micobacterioses. In: Dermatologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2006; 302-312.
14. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1966; 34:255-73.
15. Gomes CCD, Pontes MA, Gonçalves HS, Penna GO. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em um centro de referencia na região nordeste do Brasil. An Bras Dermatol. 2005; 80(3): 283-8.
16. Talhari S, Neves RG. Hanseníase 3 ed. Editora Gráfica tropical; 2006.

17. Kumar B, Dogra S, Kaur I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004;72:125-33.
18. Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina, Ribeirão Preto.* 1997; 30: 325-334.
19. Almeida EC, Martinez AN, Maneiro VC. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 509-512.
20. Hinrichsen SL, Pinheiro MRS, Jucá MB, Rolim H, Danda GJN, Danda DMR. Aspectos epidemiológicos da hanseníase na cidade de Recife, PE em 2002. *An Bras Dermatol.* Rio de Janeiro. 2004 jul/ago; 79(4):413-21.
21. Matos HJ, Duppre N, Alvim MFS, Vieira LMM. Epidemiologia da hanseníase em coorte de contatos intradomiciliares no Rio de Janeiro (1987-1991). *Cad. Saúde Pública.* 1999; 15: 533-542.
22. Neves RG, Hahn MD, Bechelli LM, Melchior JRE, Pagnan PMG, Haddad N. Análise comparativa entre o diagnóstico clínico da hanseníase e os exames histopatológicos realizados segundo os critérios da classificação de Madrid e a de Ridley-Jopling. *Hansen Int.* 1982; 7(1):8-24.
23. Maeda Y, Gidoh M, Ishii N, Mukai C, Makino M. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. *Cell Immunol.* 2003; 222:69-77.
24. Sampaio SAP, Rivitti EA. Hanseníase. *Dermatologia.* São Paulo ed: Artes médicas, 2007. cap 41, p.625-51.
25. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35:365-75.
26. Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999; 67:270-8.
27. Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Faber WR. Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. *Int J of Epid.* 2004; 33:1-8.
28. Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(1):69-76.
29. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JAC - Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1b during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol.* 1991; 84: 103-8.
30. Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Simpósio: Hanseníase.* cap II. Ribeirão Preto 1997; 30: 335-9.
31. Mendonça VA, Costa RD, de Melo GEBA, Antunes CM, Teixeira AL. Imunologia da hanseníase. *An Bras Dermatol.* 2008; 83(4) 343-350.
32. Mehra V, Modlin RL. T- lymphocytes in leprosy lesions. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;155:97-109.
33. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, *et al.* Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol.* 1992;149(4):1470-5.
34. Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2001;32:76-102.

35. Andrade ARC, Lehman LF, Schreuder PAM. Como reconhecer e tratar reações hansênicas. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005.
36. Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol.* 2008; 83:75-82.
37. Becx-Bleumink M, Berhe D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1992;60(2):173-84.
38. Assefa A, Paul S, Ketsela D, Peter B. The pattern of decline in bacillary index after 2 years of WHO recommended multiple drug therapy: the AMFES cohort. *Leprosy Review* 2000; 71: 332-337.
39. Rodriguez ALP, Almeida AP, Rodriguez BF, Pinheiro CA, Borges DS, Mendonça MLH, Silva VEF, Goulart IMB. Occurrence of late lepra reaction in leprosy patients: subsidies for implementation of a specific care program. *Hansenologia Internationalis* 2000; 25:7-16.
40. Scollard DM, Smith T, Bhoopat L, Theetranont C, Rangdaeng S, Morens DM. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1994; 62(4):559-67.
41. Nery JAC, Sales AM, Illarramendi X, Duppre NC, Jardim MC, Machado AM. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais. Uma abordagem prática. *An Bras Dermatol.* 2006; 81(4): 367-75.
42. Clezy JKA. Simultaneous Type 1 and 2 reactions. *Int. J. Lepr.* 1984; 51: 413.
43. Barreto JA, Belone AFF, Fleury RN, Soares CT, Lauris JRP. Manifestações de padrão tuberculóide reacional na hanseníase dimorfa: estudo histoquímico e imuno-histoquímico comparativo em biópsias cutâneas entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia. *An Bras Dermatol.* 2005; 80(3): 3268-74.
44. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborgh PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* 2006;77:189-202.
45. Faber WR, Iyer AM, Fajardo TT, Dekker T, Villahermosa LG, Abalos M. Serial measurement of serum cytokines, cytokine receptors and neopterin in leprosy patients with reversal reactions. *Lepr Rev.* 2004;75:274-81.
46. Foss NT. Episódios reacionais na hanseníase. Simpósio: Urgências e emergências dermatológicas e toxicológicas. 2003. p: 453-459.
47. Waters MFR. Distinguishing between relapse and late reversal reaction in multidrug (MDT) - treated BT leprosy. *Lepr Rev.* 2001; 72 (3): 337-344.
48. Costa APM, Leal JV, Ozório MAR, Motta RL, Hosken RA, Silva RC, *et al.* Surto Reacional tipo maculoso em hanseníase dimorfa. In: Internacional Leprosy Congress. Salvador. 2002; p.178.
49. Pereira GA, Stefani MMA, Araújo Filho JA. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am J of Trop Med and Hyg.* 2004; 71 (5): 679-684.
50. Nery JAC, Garcia CC, Wanzeller SHO, Sales AM, Gallo MEN, Vieira LMM. Características clínico-histopatológicas dos estados reacionais na hanseníase em pacientes submetidos à poliquimioterapia (PQT). *An Bras Dermatol.* 1999; 74(1):27-33.

51. Secretaria do Estado de Saúde de Minas Gerais. Como reconhecer e tratar as reações hansênicas. 2005; Belo Horizonte: SES, 85p.
52. Naafs B. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Treatment of reactions and Nerve damage. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1996; 64(4): 21-8.
53. Gallo MEN, Oliveira MLW. Recidivas e reinfecção em Hanseníase. Medicina, Ribeirão Preto 1997; 30: 351-57.
54. Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. Br Med Bull. 2006; 77: 103-21.
55. Guerra JG, Penna GO, de Castro LCM, Martelli CMT. Avaliação de série de casos de eritema nodoso hansênico: perfil clínico, base imunológica e tratamento instituído nos serviços de saúde. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37(5): 384-390.
56. Rotberg, A. Fator "N" de resistência à lepra e relações com a reatividade lepromínica e tuberculínica. Valor duvidoso do BCG na imunização antileprosa. Rev bras Leprol. 1957;25: 85-106.
57. Beiguelman B. Genética e hanseníase. Ciência & Saúde Coletiva 2002;7:117-128.
58. Durães SMB, Guedes SL, Cunha MD, Cavaliere FAM, Oliveira ML. Estudo de 20 focos familiares de hanseníase no município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro. An Bras Dermatol. 2005; 80(3):295-300.
59. Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? An Bras Dermatol. 2007;82:451-459.
60. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, *et al*. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. Nature. 2004; 427:636-40.
61. Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC, *et al*. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. Am J Trop Med Hyg. 2004; 71:330-40.
62. Alcais A, Sanchez FO, Thuc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, Schurr E, Abel L. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. J infect Dis. 2000; 181(1): 302-308.
63. Buschman E, Skamene E. From Bcg/Lsh/Ity to Nramp1: Three Decades of Search and Research. Drug Met and Disp. 2001; 29 (4): 471-473.
64. Blackwell JM, Searle S. Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (= Ity/Lsh/Bcg). Immunol Lett. 1999; 65:73- 80.
65. Skamene E, Schurr E, Gros P. Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. Annu Rev Med. 1998; 49: 275-87.
66. Searle SM, Blackwell J. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. J Med Genet. 1999; 36:295-299.
67. Chociay-Gatti MF. Polimorfismos do gene SLC11A1 (NRAMP1) na leishmaniose tegumentar Americana em população de uma região do sudeste do Brasil [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2007. 122 p

68. Marquet S, Lepage P, Hudson TJ, Musser JM, Schurr E. Complete nucleotide sequence and genomic structure of the human NRAMP1 gene region on Chromosome region 2q35. *Mamm Genome*. 2000; 11(9):755-62.
69. **Brown DH, Lafuse WP, Zwilling BS.** Stabilized expression of mRNA is associated with mycobacterial resistance controlled by Nramp1 *Infect Immun*. 1997; 65 (2): 597-603.
70. Roupie V, Rosseels V, Piersoel V, Zinniel DK, Barletta RG, Huygen K. Genetic Resistance of Mice to *Mycobacterium paratuberculosis* Is Influenced by *Slc11a1* at the Early but Not at the Late Stage of Infection. *The J of Immun*. 1996; 157(8): 3559-3568.
71. Canonne - Hergaux F, Gruenheid S, Govoni G, Gros P. The Nramp1 Protein and Its Role in Resistance to Infection and Macrophage Function. *Proc of the Ass of Am Phy*. 1999; 111 (4): 283–289.
72. Canonne-Hergaux F, Calafat J, Richer E, Cellier M. Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules. *Blood*. 2002; 100(1): 268-275.
73. **Carmel S, Brode S, White JK, Popoff JF, Blackwell JM.** Slc11a1, Formerly Nramp1, Is Expressed in Dendritic Cells and Influences Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Antigen-Presenting Cell Function. *Infection and Immunity*. 2007; 75 (10): 5059-5067.
74. Biggs TE, Baker ST, Botham MS, Dhital A, Barton CH. Nramp1 modulates iron homeostasis in vivo and in vitro: evidence for a role in cellular iron release involving de-acidification of intracellular vesicles. *Eur J Immunol*. 2001; 31(7):2060-70.
75. Lam-Yuk-Tseung S, Picard V, Gros P. Identification of a Tyrosine-based Motif (YGSI) in the Amino Terminus of Nramp1 (Slc11a1) That Is Important for Lysosomal Targeting. *J Biol. Chem*. 2006; 281: 31677-31688.
76. Frehel C, Canonne-Hergaux F, Gros P, Chastellier C. Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages. *Cel. Microb*. 2002; 8: 541-556.
77. Nevo Y, Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Mol Cell Res*. 2006; 1763 (7): 609-620.
78. Liu Jing T, Fujiwara M, Buu NT, Sánchez FO, Cellier M, Paradis AJ, Frappier D, Skamene E, Gros P, Morgan K, and Schurr E. Identification of Polymorphisms and Sequence Variants in the Human Homologue of the Mouse Natural Resistance –Associated Macrophage Protein Gene. *Am J Hum.Genet*. 1995; 56: 845-853.
79. Hatagima A, Oromolla DVA, Ura S, Feitosa MF, Beiguelman B, Krieger H. No Evidence of Linkage Between Mitsuda Reaction and the NRAMP1 Locus. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2001; 69: 99–103.
80. Roger M, Levee G, Chanteau S, Gicquel B, Schurr E. No evidence for linkage between leprosy susceptibility and the human natural resistance –associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene in French Polynesia. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1997; 65(2):197-202.
81. Alcais A, Sanchez FO, Thunc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, Schurr E, Abel I. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *J infect Dis* 2000; 181: 302-308.
82. Ferreira FR, Goulart LR, Silva H D, Goulart IMB. Susceptibility to Leprosy May Be Conditioned by an Interaction between the NRAMP1 Promoter Polymorphisms and the Lepromin Response 1, 3. *Int J Lepr*. 2004; 72(4):457- 467.

83. Kishi F. Isolation and characterization of human NRAMP1 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 204(3):1074-80.
84. Brasil. Ministério da Saúde. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Hanseníase – Atividades de Controle e Manual de Procedimentos. Brasília, 2001.
85. Fitzpatrick, TB. Soleil et peau. *J Med Esthet.* 1975; 2: 330-34.
86. Lahiri DK, Nurnberger JRJl. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:5444.

ARTIGO I

Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência para hanseníase na cidade de Recife - PE

Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência para hanseníase na cidade de Recife - PE

Márcia Almeida Galvão Teixeira¹

Vera Magalhães da Silveira²

Emmanuel Rodrigues de França³

¹ Professora assistente do Departamento de Dermatologia da Universidade de Pernambuco (UPE) – Recife (PE), Brasil

² Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias pela Universidade Federal de São Paulo, Unifesp. Professora titular do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Recife (PE), Brasil

³ Doutor e Livre-Docente em Dermatologia. Professor Adjunto e Chefe do Serviço de Dermatologia da Faculdade de Ciências Médicas de Pernambuco, Universidade de Pernambuco (UPE) – Recife (PE), Brasil

Endereço para correspondência: Rua Jornalista Guerra de Holanda, 158, apto 1102 Casa Forte. CEP 52061010 Recife, PE, Brasil Fone: (81) 34272268/92454349. e-mail: marciateixeira@folha.rec.br

Locais do estudo: Centro de Saúde Amaury de Medeiros da Universidade de Pernambuco e Policlínica Lessa de Andrade - Recife, PE.

Os autores do trabalho não receberam apoio financeiro e não têm conflito de interesse.

Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência para hanseníase na cidade de Recife - PE

Resumo

Introdução: As reações são frequentes e importantes no contexto da hanseníase, representando uma significativa parcela de pacientes com incapacidades e submetidos ao retratamento. A caracterização clínico-epidemiológica dos padrões reacionais é primordial para o manejo desses pacientes. O objetivo desse trabalho é descrever as características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares.

Métodos: Estudo transversal onde foram avaliados 201 pacientes com história de quadro reacional, atendidos em dois centros de referência para tratamento da hanseníase. Variáveis como baciloscopia inicial, sexo, idade, fototipo, procedência, forma clínica, tipo de tratamento e de reação, índice baciloscópico final e período de surgimento da reação em relação ao tratamento foram avaliados. A análise estatística foi realizada usando-se frequências simples. Para cálculo dos fatores de risco para as formas multibacilares, foram realizadas análises univariada e multivariada.

Resultados: Sexo masculino, idade entre 30-44 anos, fototipo V, a forma clínica borderline, tratamento regular, reação tipo I, neurite, presença de 10 a 20 nódulos e surgimento da reação hansênica durante o tratamento foram os achados mais frequentes. Os indivíduos do sexo masculino apresentaram associação estatisticamente significativa com a forma multibacilar.

Conclusões: Predominaram os indivíduos do sexo masculino que se associaram a um maior risco de desenvolvimento da forma multibacilar. A forma clínica borderline prevaleceu entre os pacientes reacionais e as reações hansênicas foram mais frequentes durante o tratamento. Os pacientes multibacilares foram mais propensos ao retratamento, e aqueles com reações tipo I e II, apresentaram maior frequência de neurite, linfadenopatia, artrite e irite do que aqueles com reação isolada.

Palavras-chave: Hanseníase; Reações hansênicas; Epidemiologia; Sinais e Sintomas.

Abstract

Background: The reactional onsets are frequent in cases of leprosy and important in the context of the disease, representing a significant portion of patients undergoing retreatment and disabilities. The characterization of clinical and epidemiological patterns of reactional onsets is essential for the management of these patients.

Objectives: To describe the epidemiological and clinical characteristics of reactions in paucibacillary and multibacillary individuals in a population sample in the city of Recife in order to assist the management of reactional onsets.

Methods: Cross-sectional study evaluated 201 patients with history of the reactional onsets, seen at two referral centers for treatment of leprosy. Variables such as initial bacilloscopy, sex, age, skin type, origin, clinical presentation, retreatment and type of reaction, final bacilloscopy index and period of reaction onset in relation to the treatment were evaluated. Statistical analysis were performed using simple frequencies. Risk factors for multibacillary were analyzed with univariate and multivariate analysis.

Results: Male, age between 30 – 44, phototype V, borderline clinical form, regular treatment, type I reaction, neuritis, presence of 10 to 20 nodules and sprouting of the leprosy reaction during the treatment had been the most frequent findings. Male patients showed significant statistical association with the multibacillary form.

Conclusions: Prevailed male patients that showed significant statistical association with the multibacillary form. The borderline form prevailed among reactional patients and the leprosy reactions were more frequent during the treatment. Multibacillary patients were more susceptible to the retreatment and those with type I and type II reactions had neuritis, Lymphadenopathy, arthritis and iritis more frequently than those with isolate forms.

Keywords: Leprosy; Leprosy reactions; Epidemiology, Signs and Symptoms.

Introdução

Os indivíduos hansenianos podem ser surpreendidos por quadros ou estados reacionais, intercorrências no curso da doença, que estão presentes em cerca de 10% a 50% dos casos, principalmente nas formas multibacilares e constituem importantes fatores de risco para retratamento, além de responsáveis por abandono de tratamento e incapacidades^{1,5}.

Brito⁴, em 2004, estudando 310 pacientes hansenianos, observou que aqueles que sofriam com episódios reacionais após alta, apresentavam três vezes mais possibilidades de retratamento por recidiva que o grupo controle.

As reações hansênicas refletem fenômeno de hipersensibilidade aguda diante dos antígenos do *Mycobacterium leprae*¹⁵ e decorrem de processo imunológico acompanhado de aumento de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ , entre outras^{8,13}, além de imunocomplexos¹⁹.

Os quadros reacionais podem surgir antes ou, mais frequentemente, durante ou após o tratamento. A duração e o número desses surtos reacionais dependem muitas vezes da forma clínica, bem como do índice baciloscópio inicial^{2,11}.

As reações hansênicas são classificadas em dois tipos de acordo com Ridley e Jopling²⁰: reação hansênica tipo I ou reversa (RR), que acomete indivíduos paucibacilares e multibacilares e envolve a imunidade celular, e a reação hansênica tipo II com os tipos Eritema Nodoso Hansênico (ENH), Eritema Polimorfo (EP) e Eritema Nodoso Necrotizante (ENN), com participação mais efetiva da imunidade humoral e acomete os indivíduos multibacilares. A neurite pura ou isolada pode ser classificada como reação tipo I ou um terceiro tipo de

reação hansênica. A reação tipo I pode ser ascendente, quando há aumento da imunidade específica ou descendente quando há uma queda da imunidade, sendo a expressão clínica das reações ascendentes e descendentes, semelhantes²⁴.

Episódios de reação tipo I ou reversa acometem entre 10% e 33% dos pacientes com hanseníase e surgem geralmente, durante o tratamento ou após o primeiro ano da alta e apresentam as seguintes características clínicas: infiltração de lesões antigas associada ao surgimento de novas lesões em forma de manchas ou placas infiltradas, eritema, dor, lesões vésico-bolhosas, ulcerações, hiperestesia, parestesia, mal-estar, dor ou espessamento de nervos periféricos com perda da função sensitivo-motora e, mais raramente, febre, déficit da função neural na ausência de sintomas (neuropatia silenciosa), acometendo principalmente os nervos ulnar e tibial posterior^{1,16}.

As reações tipo II são caracterizadas pelo surgimento abrupto de nódulos que podem variar de poucos a inúmeros, de coloração rósea, que podem evoluir para necrose, nas formas mais graves do ENH (eritema nodoso necrotizante). Também vem acompanhadas de sintomatologia relacionada ao acometimento ocular, hepático, esplênico, de linfonodos, peritônio, testículos, articulações, tendões, músculos, ossos e rins. Pode haver febre e leucocitose ¹⁷. Geralmente apresentam-se em múltiplos episódios¹⁸.

O uso de corticóides no tratamento da reação reversa e da talidomida para o tratamento do eritema nodoso é recomendado pela organização mundial de saúde^{9,26}.

As reações hansênicas constituem intercorrências na doença, com sinais e sintomas que levam o paciente ao sofrimento e sequelas neurológicas, muitas vezes mais expressivas que as esperadas na hanseníase sem quadro reacional. Elas representam fenômenos imunológicos, frequentemente pouco entendidos que se refletem em quadro clínico peculiar exigindo a atenção do dermatologista.

Este trabalho objetivou a descrição das características clínicas de pacientes com hanseníase reacional atendidos em dois centros de referência na cidade de Recife, Nordeste do Brasil.

Métodos

Por meio de um estudo transversal foram investigados 201 pacientes com história de quadro reacional hansênico, atendidos nos ambulatórios de hanseníase em duas unidades de referência (Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros e Policlínica Lessa de Andrade) da cidade do Recife–PE, no período de março de 2007 a dezembro de 2008.

Para classificação dos pacientes segundo forma baciloscópica, adotaram-se os critérios da OMS, que consistem na pesquisa de BAAR em material linfocutâneo e na apresentação clínica. Foram classificados como paucibacilares, os pacientes hansenianos com: baciloscopia inicial negativa, menos de cinco lesões e de um tronco nervoso afetado. Os pacientes multibacilares foram selecionados entre os que apresentavam baciloscopia inicial positiva. Indivíduos com a forma neurítica pura de hanseníase não participaram do estudo.

Considerou-se reação reversa, ou tipo I, a que apresentasse pelo menos uma das seguintes características: infiltração em lesões prévias de hanseníase acompanhadas de edema e dor, surgimento de novas lesões em forma de placas eritemato-infiltradas, tricofitóides com distúrbios de sensibilidade, ou espessamento em um ou mais nervos periféricos associado a quadro doloroso. Essas características poderiam estar associadas a outros achados, como febre, mal-estar, hipersensibilidade palmar e plantar, lesões vésico-bolhosas, ulceração e edema em mãos e pés¹⁶.

Foi caracterizada como reação tipo II, ou eritema nodoso hansênico, aquela que apresentasse nódulos eritematosos, dolorosos espontaneamente ou à palpação, isolados ou associados a qualquer uma das manifestações: febre, mal-estar, astenia, vesículas/bolhas ou úlceras, espessamento doloroso em um ou mais nervos periféricos, linfadenopatia, irite, artrite ou artralgia e edema ou dor em mãos e pés¹⁶.

A reação tipo II foi quantificada pela contagem do número de nódulos nos seguimentos corporais afetados: membros inferiores e abdome ou membros superiores, tórax e face e foi considerada leve, na presença de menos de 10 nódulos, moderada quando havia 10 a 20 nódulos e severa, em presença de mais de 20 nódulos por seguimento corporal afetado.

Considerou-se tratamento regular aquele no qual não houve abandono por mais de três meses consecutivos e tratamento irregular quando houve abandono de tratamento por mais de três meses.

O esquema terapêutico de hanseníase foi considerado padrão, quando do uso das drogas preconizadas pela OMS durante um ano para as formas

multibacilares e seis meses para as formas paucibacilares. Classificou-se o esquema como alternativo na ocorrência do uso de outras drogas ou de tempo de tratamento diferente.

A coleta de dados constou de entrevista, anamnese, exame físico, consulta ao prontuário e preenchimento de protocolo específico. Descreveram-se as variáveis relativas a fototipo segundo Fitzpatrick⁶ (tipo I, II, III, IV, V e VI), procedência e forma clínica (tuberculóide (TT), borderline (BT, BB e BL) e lepromatosa (LL)). Compararam-se as características clínicas entre os pacientes reacionais avaliando: idade, sexo, baciloscopia inicial e final, tipo de tratamento (convencional ou alternativo), tipo de reação (I ou II), aspectos clínicos da reação, tempo de surgimento da reação em relação ao início do tratamento e drogas utilizadas.

Com o objetivo de identificar os principais fatores de risco para o indivíduo ser multibacilar, fez-se uma análise univariada, comparando a proporção dessa forma baciloscópica nas diferentes categorias pelo teste Qui-Quadrado de Pearson^{10,27}.

Para análise multivariada, optou-se pela técnica de regressão logística¹⁰, incluindo as variáveis que apresentaram nível de significância menor que 0,20, na análise univariada. A seleção das variáveis foi feita através do método *stepwise forward*, estabelecendo-se nível de significância de 0,05 para entrada de variáveis e de 0,10 para saída. As variáveis selecionadas tiveram suas interações analisadas em uma matriz de correlação, sendo incorporadas ao modelo todas as interações com coeficiente de correlação $\geq 0,5$.

O gerenciamento do banco de dados foi realizado com o programa *MS Office Excel*® versão 2003; a análise estatística, com o programa *Statistical Package for Social Sciences (SPSS)*® for Windows versão 12.0, e a confecção de gráficos e tabelas com o *MS Office Word*® versão 2003.

O projeto teve a aprovação do Comitê de Ética, cujo registro no CAAE foi 0009.0.250.250-07.

Resultados

Quanto às variáveis de caracterização dos pacientes, foi possível identificar um predomínio do sexo masculino (65,2%), da faixa etária entre 30 e 44 anos (34,3% - Tabela 1). Houve maior frequência de pacientes com fototipo V (74; 36,8%) e procedência da cidade do Recife (129; 64,2%).

Do total de indivíduos estudados, 100(49,8%) foram classificados como paucibacilares e 101(50,2%) como multibacilares, dentre os quais se constatou um predomínio de baciloscopia menor que três (73; 72,3%)(Tabela 1).

Dentre os 28(27,7%) pacientes com baciloscopia inicial $\geq 3,00$, cerca de 17% (5/28) foram tratados por 24 meses e 10% (3/28) foram retratados. Um total de 80 (39,8%) pacientes foram submetidos a nova baciloscopia após tratamento, havendo predomínio de baciloscopia negativa nesses indivíduos.

A reação hansênica de 151(75,1%) pacientes foi classificada como tipo I; enquanto que 31(15,4%) tiveram-na do tipo II e 19(9,5%) tiveram reação tipo I e tipo II. Em todos os casos, o início da reação hansênica foi mais frequente durante o tratamento (67,7%) ou num período menor que seis meses após a alta

medicamentosa. Para esses pacientes, a droga de escolha foi a prednisona, administrada a 95% deles, isolada (75,6%) ou associada à talidomida (19,4%) (Tabela 1). Dos pacientes estudados, 87% (175/201), foram submetidos ao tratamento padrão e 90% (180/201), ao tratamento regular.

Quanto à distribuição dos pacientes segundo a reação hansênica, expressa na Tabela 1, identificou-se que as do tipo I ocorreram mais frequentemente nos pacientes na faixa etária de 30 a 59 anos, paucibacilares ou multibacilares com baciloscopia $<3,00$ e com início durante o tratamento da hanseníase ou após um ano do término da alta medicamentosa. As reações do tipo II se caracterizaram por predominarem em pacientes na faixa etária de 30 a 44 anos, multibacilares e com baciloscopia $\geq 3,00$.

Houve associação significativa entre baciloscopia menor que 3,00 e reação tipo I e baciloscopia $\geq 3,00$ e a reação tipo II ($p < 0,001$).

Tabela 1 - Distribuição das características demográficas e clínicas dos 201 pacientes reacionais atendidos no CISAM e Centro de Saúde Lessa de Andrade

Variáveis	Número de pacientes (n; %)	Tipo I (n; %)	Reação Tipo II (n; %)	Tipo I e II (n; %)
Sexo				
Masculino	131 (65,2)	99 (65,6)	21 (67,7)	11 (57,9)
Feminino	70 (34,8)	52 (34,4)	10 (32,3)	8 (42,1)
Idade (anos)				
0 – 14 anos	8 (4,0)	6 (4,0)	0 (0,0)	2 (10,5)
15 – 29 anos	40 (19,9)	31 (20,5)	9 (29,0)	0 (0,0)
30 – 44 anos	69 (34,3)	46 (30,5)	14 (45,2)	9 (47,4)
45 – 59 anos	61 (30,4)	46 (30,5)	7 (22,6)	8 (42,1)
≥ 60 anos	23 (11,4)	22 (14,5)	1 (3,2)	0 (0,0)
Tipo Baciloscopia				
Paucibacilar	100 (49,8)	100 (66,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
Multibacilar	101 (50,2)	51 (33,8)	31 (91,2)	19 (100,0)
0,09 – 2,99 ¹	73 (72,3)	49 (96,7)	11 (32,4)	13 (68,4)
≥ 3,00	28 (27,7)	2 (3,9)	20 (58,8)	6 (31,6)
Baciloscopia Final				
Negativa	56 (27,9)	52 (34,4)	2 (6,5)	2 (10,5)
Positiva	24 (11,9)	7 (4,7)	11 (35,5)	6 (31,6)
Não realizada	121 (60,2)	92 (60,9)	18 (58,1)	11 (57,9)
Início da reação hansênica				
No tratamento	136 (67,7)	99 (65,6)	21 (67,7)	16 (84,2)
< 6 meses da alta	38 (18,9)	28 (18,5)	8 (25,8)	2 (10,5)
6 – 12 meses da alta	9 (4,5)	6 (4,0)	2 (6,5)	1 (5,3)
> 1 ano da alta	18 (8,9)	18 (11,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
Drogas usadas no tratamento				
Prednisona	152 (75,6)	140 (92,7)	7 (22,6)	5 (26,3)
Talidomida	6 (3,0)	0 (0,0)	6 (19,4)	0 (0,0)
Ambas	39 (19,4)	7 (4,6)	18 (58,1)	14 (73,7)
Outras ²	4 (2,0)	4 (2,7)	0 (0,0)	0 (0,0)

NOTAS:¹ – Número de bacilos identificados em pacientes multibacilares - Teste Qui Quadrado de Pearson
p<0,001

² – Outras drogas para tratamento de quadros reacionais incluíram carbamazepina, clofazimina e pentoxifilina

Em relação às formas clínicas dos indivíduos estudados, 19,9% (40/201) foram tuberculóides, 58,7% (118/201) foram borderline, e 21,4% (43/201) Virchowiana.

As características clínicas dos quadros reacionais encontram-se nas Figuras 1 e 2. Quanto às características comuns às reações tipo I e II, constatou-se que a neurite foi o comprometimento mais frequente entre os tipos reacionais (Figura 1). Dentre os pacientes com reação tipo I, a neurite ocorreu de forma isolada em

22,5% (34/151) deles e as lesões em placa, exclusivas desse grupo, apresentaram-se como comprometimento unicamente cutâneo em 30,5% (46/151).

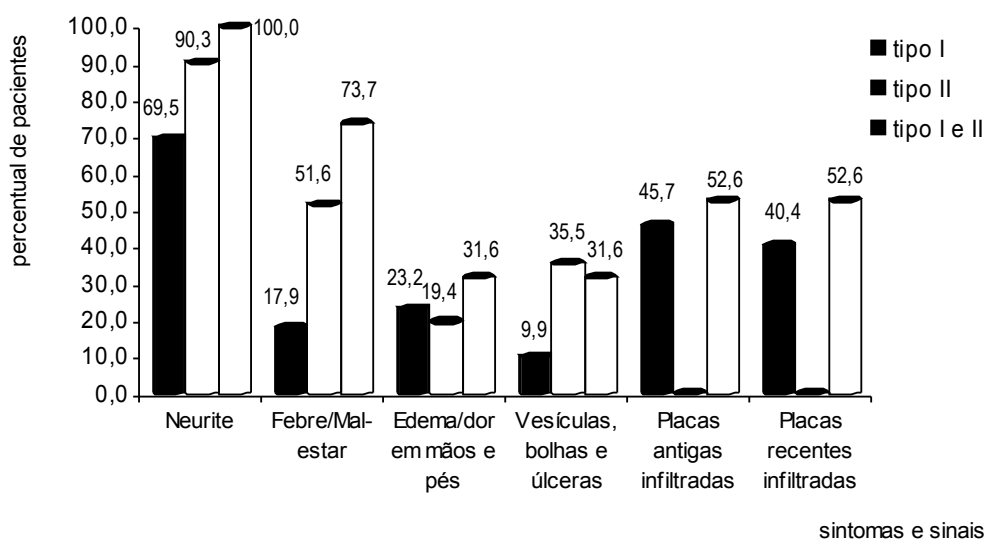


Figura 1 - Distribuição dos achados clínicos comuns às reações tipo I e II, diagnosticadas em 201 pacientes segundo reação hansênica acompanhados em dois Centros de Referência em Recife – PE

Na Figura 2, apresentam-se as manifestações clínicas de 50 pacientes com reação hansênica tipo II, observando-se que no grupo com ambas as reações, a presença de menos de 10 nódulos por segmento corporal afetado, linfadenopatia, artrite e irite foram mais frequentes do que no grupo com reação tipo II isolada.

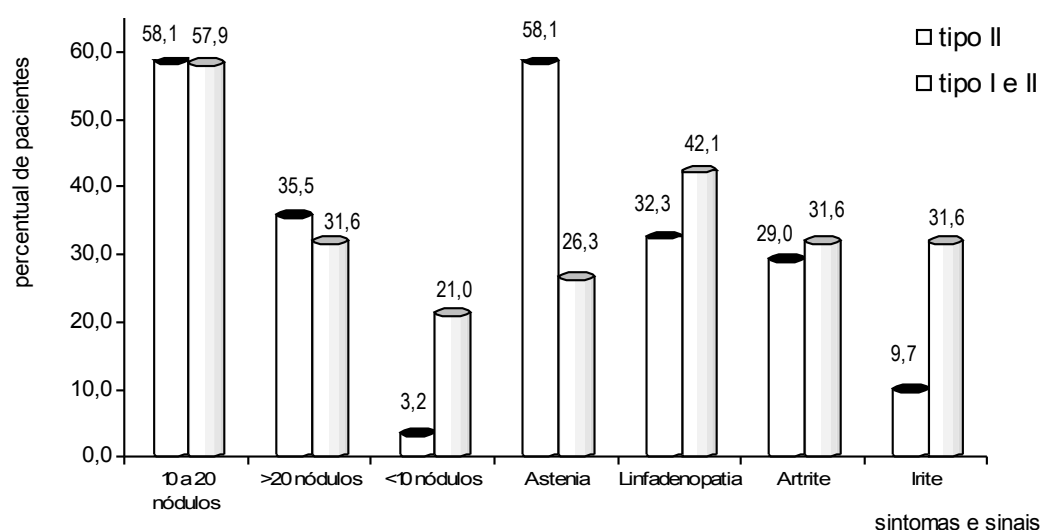


Figura 2 - Distribuição dos achados clínicos dos pacientes com reação hansênica tipo II, isolada ou associada à reação tipo I, acompanhados em dois centros de referência em Recife – PE

Para determinar a associação entre as variáveis idade, sexo, início da reação hansênica, acometimento neural e retratamento da hanseníase com a forma multibacilar, procedeu-se à análise univariada (Tabela 2). Determinou-se que pacientes submetidos ao retratamento tinham chance aproximadamente uma vez maior de serem multibacilares. A idade, sexo, época de início da reação e acometimento neural não se associaram à forma baciloscópica inicial.

Tabela 2: Análise univariada da associação entre variáveis de risco e a forma multibacilar em 201 indivíduos com quadro reacional

Variáveis	N ¹	Multibacilar n (%)	OR (I.C.95%)	p
Idade				
≤ 44 anos	117	62 (53,0)	1,0	
> 44 anos	84	39 (46,4)	0,77 (0,44 - 1,35)	0,359
Sexo				
Feminino	70	29 (41,4)	1,0	
Masculino	131	72 (55,0)	1,73 (0,96 - 3,10)	0,068
Início da reação				
No tratamento ou <6 meses da alta	174	91 (52,3)	1,0	
≥ 6 meses da alta	27	10 (37,0)	0,54 (0,23 - 1,24)	0,140
Acometimento neural				
Não	61	28 (45,9)	1,0	
Sim	140	73 (52,1)	1,28 (0,70; 2,35)	0,416
Retratamento				
Não	152	70 (46,1)	1,0	
Sim	49	31 (63,3)	2,02 (1,04 ; 3,91)	0,036 ²

NOTAS: ¹ – base de cálculo percentual - 201 pacientes. ² – valor de p significante

Constatou-se também que a distribuição das reações hansênicas, associou-se à forma bacilosscópica, sendo mais frequente a reação tipo I em paucibacilares e tipo II em multibacilares ($p < 0,001$).

As variáveis sexo, início da reação e retratamento foram incluídas na análise multivariada e submetidas à regressão logística, por apresentarem valor de p menor que 0,20, cujos resultados estão apresentados nas Tabela 2 e 3. Observou-se que pacientes do sexo masculino tinham chance aproximadamente uma vez maior de serem multibacilares quando comparados às mulheres (Tabela 3).

Tabela 3 - Regressão logística da variável sexo com a forma multibacilar em 201 indivíduos reacionais

Variável independente	Coeficiente	<i>p</i>	Odds Ratio	IC 95%
Sexo (Masculino x Feminino)	0,59	0,049	1,81	1,01 - 3,43
Constante	-0,72	0,008		

Discussão

A identificação e o manejo dos pacientes com episódios reacionais hansênicos constituem um desafio para o clínico, porque esses episódios requerem diagnóstico precoce, já que as sequelas são graves. Quando os quadros reacionais são tardios, após a alta medicamentosa, aumenta a dificuldade em diagnosticar devido à necessidade de diferenciação com os quadros de recidiva. O retardo no diagnóstico diferencial entre recidiva e reação hansênica acarretará atraso também na conduta terapêutica, o que contraria o atendimento das necessidades dos pacientes por intervenções rápidas.

A caracterização clínica dos pacientes reacionais pode contribuir positivamente nesse sentido, do que deriva a importância dos resultados aqui apresentados, já que os estudos sobre reação hansênica em população nordestina são escassos.

Em relação ao sexo dos pacientes, observou-se maior frequência de quadros reacionais em homens, numa proporção de 1,87:1,00 homens:mulheres, contrariando a distribuição populacional da cidade do Recife, que se igualava a

0,8:1,00, estatísticas de 2007. Considerando que a expectativa de vida da mulher, desde a adolescência, é maior que a do homem, a maior proporção de homens reacionais hansênicos pode ser uma característica da doença³.

A proporção do presente estudo foi menor que a de 3,75:1,00, identificada em pesquisa de reações hansênicas entre pacientes tailandeses²⁴, porém maior que a de 1,18:1,00, constatada entre 290 pacientes, no Rio de Janeiro²⁵, e de 1,32:1,00, na cidade de Uberaba, entre 149 pacientes²¹.

No presente estudo, ao incluir a variável sexo na análise multivariada (Tabelas 2 e 3), para determinação dos fatores de risco para formas multibacilares, e conseqüentemente, para predisposição aos quadros reacionais mais graves, comprovou-se que indivíduos do sexo masculino tinham chance 0,81 vezes maior de serem multibacilares. Esse fato aponta para a necessidade de um acompanhamento mais cuidadoso dos pacientes do sexo masculino, por apresentarem maior propensão às formas mais graves de reação.

Quanto à distribuição etária, apesar da maior frequência da reação tipo I numa faixa mais ampla (entre 30 e 59 anos) que aquela de pacientes com reação tipo II (entre 30 e 44 anos) (Tabela 1), essa variável não se associou a maior risco de desenvolvimento da forma multibacilar (Tabela 2). Mesmo assim, dois aspectos dessa distribuição etária são relevantes. Em primeiro lugar, deve-se considerar que o adoecimento de homem na idade entre 30 e 49 anos exerce impacto psicossocial, devido à maior atividade laborativa nessa faixa etária. Em segundo lugar, é preocupante o achado de crianças menores de quinze anos de idade com reação hansênica, principalmente pela consideração de que, nessa

faixa etária, devem ter maior convívio com membros familiares, indicando que sua contaminação foi domiciliar.

O predomínio do fototipo V e da procedência da cidade do Recife entre os pacientes (Tabela 1) pareceu refletir tão somente a cor da pele de habitantes da cidade e a situação geográfica dos centros de referência, que foram escolhidos por locais da presente pesquisa.

Do ponto de vista clínico, a associação da forma multibacilar com contagem de BAAR igual ou maior que 3,00 e desenvolvimento de reação tipo II isolada (58,8%) esteve em consonância com os achados de Saunderson *et al.* e com a OMS^{22,26}.

O predomínio de pacientes multibacilares com baciloscopia menor que 3,00 (72,3%; Tabela 1) pode induzir ao raciocínio de que essa associação indicaria melhor prognóstico, pela menor carga bacilar. No entanto, quando se observa a frequência de ambos os quadros reacionais nos multibacilares, este foi mais frequente (21,4% - 6/28), nos multibacilares com baciloscopia igual ou maior que 3,00. Tais pacientes apresentam um quadro clínico mais grave com sinais e sintomas incapacitantes como neurite, edema e dor em mãos e pés, bolhas e úlceras, linfadenopatia e artrite (Figuras 1 e 2).

A baciloscopia, tanto inicial, quanto final, é um exame que integra o arsenal diagnóstico da hanseníase e não se encontra limitado, mesmo em países de baixa renda e em desenvolvimento. A pesquisa de BAAR pode auxiliar no direcionamento do diagnóstico diferencial entre recidivas e desencadeamento de reação hansênica.

A não realização da baciloscopia após tratamento na maioria dos pacientes deste estudo pareceu um reflexo negativo das recomendações do Ministério da Saúde quanto ao manejo do paciente hansênico. Se, ao diagnóstico, a baciloscopia é um critério essencial e as reações hansênicas são reconhecidas como eventos graves e como desafio para serem diferenciadas de recidiva, principalmente em longo prazo após alta medicamentosa, deveria haver obrigatoriedade da baciloscopia de controle para agilizar esse diagnóstico. A falta de obrigatoriedade para tal procedimento pode contribuir para que o exame de pacientes em controle seja preterido, em benefício daqueles em primeiro episódio, principalmente quando se considera a carência de recursos humanos nos serviços de saúde.

Guerra *et al.*⁹ ressaltam que a redução do índice baciloscópico diminui as chances de reação. Ainda que se lançasse mão do exame histopatológico, uma importante ferramenta para diferenciar a reação tipo I da recidiva, seus resultados não substituem a baciloscopia para estimativa de risco de desenvolvimento da reação hansênica. Ele comprova o tipo de reação e a distingue da recidiva, além do que não está disponível para rotina, mesmo nos centros de referência para hanseníase⁷.

Um fato relevante, neste trabalho, é que o primeiro episódio de reação hansênica, tanto tipo I como tipo II, surgiu na maioria (86,6%) dos indivíduos ainda durante o tratamento ou após seis meses da alta. A presença de estados reacionais durante o tratamento parece ser reflexo do comportamento imunológico do indivíduo e reforça a teoria de que o próprio tratamento (persistência de bacilos ainda viáveis) pode ser um fator precipitante para o

surgimento do quadro reacional. Em pacientes com grande carga bacilar, a presença contínua de antígenos de bacilos mortos aumenta o risco de reações hansênicas já que esta eliminação bacilar é lenta e depende do sistema fagocitário do indivíduo na ordem de 0,6 a 1,0 log/ano. Esse mecanismo também explica porque as reações podem ocorrer logo após alta medicamentosa^{14,23}.

No presente estudo, o surgimento do eritema nodoso ainda durante o tratamento contrariou os achados de Kumar *et al.*¹², que avaliando as características epidemiológicas de uma grande coorte na Índia, observaram que essa reação é mais frequente no primeiro ou segundo ano após alta da terapia multidroga. O fato de a clofazimina ser utilizada durante o tratamento da hanseníase e ter efeito antiinflamatório poderia justificar o surgimento tardio do quadro reacional na forma lepromatosa.

O uso de talidomida em sete pacientes com a reação Tipo I (Tabela I), pode refletir as dificuldades de condução diagnóstica e terapêutica que as reações hansênicas demandam, como por exemplo, a alternância dos tipos reacionais em multibacilares.

A constatação de que os pacientes multibacilares tiveram maior chance de necessitar retratamento (Tabela 2) trouxe informação adicional aos achados de um estudo tipo caso-controle, também realizado em população recifense⁴, no qual o retratamento foi três vezes mais frequente nos indivíduos reacionais.

No presente estudo, o predomínio da forma borderline foi um achado coerente com o critério de inclusão de pacientes reacionais, já que a característica dessa forma clínica é a instabilidade clínica e imunológica com a maior susceptibilidade aos quadros reacionais¹⁶.

Comparativamente, a reação tipo II é mais agressiva que a reação tipo I, mas essa observação só está adequada aos pacientes multibacilares, porque podem desenvolver ambas, isolada ou alternadamente¹⁷. Assim os pacientes paucibacilares, não sujeitos à reação tipo II, estiveram menos expostos a complicações, mas é importante ressaltar que tal achado não é tranquilizador, pois essas reações são acompanhadas de neurite que é responsável por danos e sequelas importantes^{1,11,17}.

Conclusões

A partir das observações epidemiológicas e clínicas, os achados do presente estudo, sugeriram que os pacientes reacionais do sexo masculino associaram-se ao maior risco de desenvolvimento da forma multibacilar. A forma clínica predominante foi a borderline, com desenvolvimento de reações hansênicas mais frequentemente durante o tratamento. Os pacientes multibacilares foram mais propensos ao retratamento e aqueles com reações tipo I e II, apresentaram maior frequência de neurite, linfadenopatia, artrite e irite do que aqueles com reação isolada.

Agradecimentos

Aos pacientes que, num gesto de desprendimento, concordaram em participar do estudo e aos colegas dermatologistas e demais funcionários do CISAM e da Policlínica Lessa de Andrade.

Referências

1. Andrade ARC, Lehman LF, Schreuder PAM. Como reconhecer e tratar reações hansênicas. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005.
2. Becx-Bleumink M, Berhe D. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and rehabilitation training center (ALERT) in Ethiopia. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1992; 60:173-84.
3. Blatt JM. Considerações a cerca dos estados reacionais do portador de hanseníase no município de Itajaí. *Saúde e Sociedade.* 2001;1.
4. Brito MFM. O retratamento em hanseníase: Identificação dos fatores de risco - Um estudo caso-controle [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 2004. 68p.
5. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. *Rook's Textbook. of Dermatology.* 2004, 7 ed, Blackwell Sciences Ltd, Massachusetts, p.29.1- 29.2.
6. Fitzpatrick, TB. Soleil et peau. *J Med Esthet* 1975; 2: 330-34.
7. Gallo MEN, Oliveira MLW. Recidivas e reinfecção em Hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto* 1997; 30: 351-57.
8. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35:365-75.
9. Guerra JG, Penna GO, de Castro LCM, Martelli CMT. Avaliação de série de casos de eritema nodoso hansênico: perfil clínico, base imunológica e tratamento instituído nos serviços de saúde. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Sept./Oct. 2004; 37: 384-390.
10. Hosmer, D.W. and Lemeshow, S. *Applied Logistic Regression.* New York: John Wiley & Sons, 1989.
11. Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol.* 2008; 83:75-82.
12. Kumar B, Dogra S, Kaur I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. *Int J Lepr Other Mycobact.* 2004; 72:125-33.
13. Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect Immun.* 2001; 69:3413-7.
14. Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999; 67:270-8.
15. Mendonça VA, Costa RD, de Melo GEBA, Antunes CM, Teixeira AL. Imunologia da hanseníase. *An Bras Dermatol.* 2008; 83(4) 343-350.
16. Nery JAC, Sales AM, Illarramendi X, Duppre NC, Jardim MC, Machado AM. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais. Uma abordagem prática. *An. Bras. Dermatol.* 2006; 81(4): 367-75.

17. Pfaltzgraff RE, Ramu G. Clinical leprosy. In: Hastings RC, editor. *Leprosy*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p. 237-90.
18. Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, *et al*. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74: 868-79.
19. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966; 34:255-73.
20. Ridley MJ, Ridley DS. The immunopathology of erythema nodosum leprosum: the role of extravascular complexes. *Lepr Rev*. 1983;54:95-107.
21. Rodrigues ALP, de Almeida AP, Rodrigues BF, Pinheiro CA, Borges DS, de Mendonça MLH *et al*. Occurrence of late lepra reaction in leprosy patients: subsidies for implementation of a specific care program. *Hans Intern* 25(1): 17-25, 2000.
22. Saunderson P, Gebre S, Byass P. ENL reactions in the multibacillary cases of the AMFES cohort in central Ethiopia: incidence and risk factors. *Lepr Rev* 2000; 71: 318-324.
23. Schreuder PAM. The occurrence of reactions and impairments in leprosy: experience in the leprosy control program of three provinces in northeastern Thailand, 1978-1995. II. Reactions. *Int J of Lepr* 1998; 66:159-169.
24. Scollard DM. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *Int J Lepr Other Mycobact*. 1994; 62: 559-69.
25. Silva SF, Griep RH. Reação hansênica em pacientes portadores de hanseníase em centros de saúde da área de planejamento 3.2 do município do Rio de Janeiro. *Han Intern* 32(2):155-162, 2007
26. World Health Organization [homepage on the Internet]. Global strategy for further reducing leprosy burden and sustaining leprosy control activities (2006-2010): Operational guidelines. [cited 2007 Dec 12]. Available from: <http://www.who.int/lep/resources/SEAGLP20062.pdf> < .
27. Vieira, S. *Introdução à Bioestatística* . 3ª ed. Rio de Janeiro: Campus, 1998.

ARTIGO II

**Polimorfismos do gene *NRAMP1* em indivíduos com reações
hansênicas atendidos em dois Centros de Referência no Recife,
Nordeste do Brasil**

Polimorfismos do gene *NRAMP1* em indivíduos com reações hansênicas atendidos em dois Centros de Referência no Recife, Nordeste do Brasil

Márcia Almeida Galvão Teixeira¹

Norma Lucena-Silva²

Alessandra de Luna Ramo³

Ana Hatagima⁴

Vera Magalhães⁵

¹Professora Assistente da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco; Policlínica Lessa de Andrade, Recife-PE, Brasil. Endereço para correspondência: Rua Jornalista Guerra de Holanda, 158, apto 1102 Casa Forte. CEP 52061010 Recife, PE, Brasil Fone: 55(81) 34272268 e-mail: marciateixeira@folha.rec.br

²Doutora em biologia molecular. Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Medicina Integrada Prof. Fernando Figueira de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

³Biomédica. Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Medicina Integrada Prof. Fernando Figueira de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

⁴Doutora. Laboratório de Genética Humana do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁵Professora titular da disciplina de doenças infecciosas e parasitárias do curso de medicina da Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil

Locais do estudo: Centro de Saúde Amaury de Medeiros da Universidade de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, Instituto de Medicina Integrada Prof. Fernando Figueira, Recife, PE, Brasil e Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Para investigar susceptibilidade às reações hansênicas, três polimorfismos do gene *natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP1)*, foram determinados em 201 pacientes, atendidos em dois centros de referência no Recife, entre 2007 e 2008, sendo 100 paucibacilares e 101 multibacilares. A determinação dos polimorfismos 274C/T, D543N e 1729+55del4 do gene *NRAMP1* foi realizada utilizando a técnica do polimorfismo de fragmento de restrição em DNA extraído de leucócitos de sangue periférico e as estimativas das frequências alélicas e genotípicas foram feitas por contagem direta. Os genótipos predominantes foram: CC (51,8%) para 274C/T, GG (86,6%) para D543N e +-TGTG (59,9%) para 1729+55del4. O genótipo mutante 274 TT predominou na negatividade da reação reversa ($p=0,03$) e na positividade do eritema nodoso ($p=0,04$). Nossos resultados sugerem que o polimorfismo 274 C/T do gene *NRAMP1* pode auxiliar na determinação da susceptibilidade à reação tipo II em indivíduos com hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase, polimorfismo de fragmento de restrição.

ABSTRACT

To investigate susceptibility to leprosy reactions, according three natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP1) gene polymorphisms, sample blood from 201 patients of two different reference hospitals in Recife, between 2007 and 2008, were examined. The individuals were divided in two groups: paucibacillary (100) and multibacillary (101). 274C/T, D543N and 1729+55del4 polymorphisms typed by restriction fragment length polymorphism, allelic and genotypic frequencies were calculated by direct genic count. The main genotype found were: CC (51, 8%) to 274C/T, GG (86,6%) to D543N and +-TGTG (59,9%) to 1729+55del4. The wild genotype 274 TT prevailed on the negativity of the reversal reaction ($p=0,03$) and in the positivity of erythema nodosum leprosum ($p=0,04$). The 274 C/T NRAMP1 polymorphism aids in the determination to the susceptibility to type II reaction in Leprosy patients.

Key- words: leprosy, restriction fragment length polymorphism.

Introdução

A hanseníase é uma doença complexa, cujo desfecho resulta de uma combinação entre a ação do *Mycobacterium leprae*, fatores ambientais, socioeconômicos e a predisposição individual²¹.

O número global de casos de hanseníase tem mostrado tendência de declínio desde o ano de 2001, exceto em regiões da África e no Brasil, que mantêm alta endemicidade. Nas regiões Norte e Nordeste estão presentes 40% dos novos casos de hanseníase do Brasil²⁸.

As reações hansênicas são fenômenos de hipersensibilidade a antígenos do *M. leprae*²⁵. Os principais tipos de reação são: a reação reversa (tipo I) e o eritema nodoso hansênico (tipo II). A reação tipo I pode estar presente em indivíduos com as formas clínicas paucibacilares ou multibacilares, enquanto que a reação tipo II acomete pacientes multibacilares⁴.

Os episódios reacionais estão presentes em cerca de 10% a 50% dos pacientes, predominando nas formas clínicas multibacilares. Podem surgir em até cinco anos após o aparecimento da doença e são responsáveis por sequelas importantes e dificultam o diagnóstico diferencial com a recidiva da doença, e, portanto, a conduta terapêutica^{11,26}.

A teoria que admite que a incapacidade de destruição dos bacilos de Hansen pelos macrófagos pode ser influenciada por polimorfismos gênicos tende a ganhar força nos últimos anos^{1,6}. Tem-se postulado que um conjunto de genes pode modificar a susceptibilidade à hanseníase e às diferentes formas clínicas^{3,6,13,21,23}.

O gene da proteína 1 associada à resistência natural do macrófago (*natural resistance associated macrophage protein 1 - NRAMP1*) tem sido relacionado à defesa inata, bem como à adquirida, que confere resistência a parasitas intracelulares, por sua atividade estar diretamente ligada ao processamento dos antígenos bacterianos pelas células fagocitárias^{8,12}.

Ferreira *et al.*¹³, estudando o polimorfismo $(GT)_n$ do *NRAMP1*, observaram que os indivíduos com resposta negativa à lepromina, ou seja, Mitsuda negativos, que expressavam um determinado tipo de alelo desse polimorfismo, apresentavam sete a oito vezes mais chances de desenvolver a hanseníase, concluindo haver relação entre variações polimórficas e susceptibilidade à doença.

O gene da *NRAMP1* localiza-se na região 2q35 do cromossoma 2 e a proteína codificada por ele é detectada no compartimento lisossomal de macrófagos, monócitos e leucócitos periféricos, como também no fígado, baço e pulmões, após indução por linfocinas e produtos bacterianos^{18,20}, exercendo a função de uma bomba de efluxo de cátions divalentes, como Fe^{++} e $Mn^{++9,22}$. A remoção destes íons, essenciais para a sobrevivência do microorganismo no macrófago, resulta em restrição da multiplicação e propagação intracelular do patógeno, além de privar a bactéria da produção de enzimas protetoras (catalase e superóxido dismutase), que neutralizam a ação de componentes oxigênio reativos produzidos pelo macrófago^{7, 16, 22}.

A codificação da proteína nos indivíduos *NRAMP1* leva a uma atividade macrofágica adequada, um padrão de resposta Th1 e tendência ao indivíduo ser paucibacilar. Especula-se que isto ocorra quando há a expressão dos alelos

selvagens, C para 274 C/T, G para D543N e +TGTG para o polimorfismo 1729+55del4¹².

Algumas mutações no gene *NRAMP1* anulam a resistência natural a infecções pelo *Mycobacterium*. Liu *et al.*¹⁷, investigando 80 pacientes com tuberculose, descreveram nove polimorfismos, dentre eles o 274C/T, que decorre de uma troca de bases citosina (C) por timina (T) na posição 274 do éxon 3, o polimorfismo D543N, no qual há troca de bases guanina (G) por adenina (A) na posição 1703 do éxon 15, e o terceiro polimorfismo 1729+55del4, no qual há deleção das bases TGTG na região 3' não traduzida (3'UTR). Concluíram que as variantes *NRAMP1* podem ser úteis para análise genética da susceptibilidade humana à hanseníase, em analogia à verificada para parasitoses intracelulares, porque esses polimorfismos são importantes reguladores das vias de ativação de macrófagos.

Meisner *et al.*¹⁹, tomando como base a associação entre polimorfismo da *NRAMP1* e susceptibilidade à tuberculose, compararam a distribuição do polimorfismo 1729+55del4 na hanseníase e observaram maior frequência de heterozigose entre multibacilares.

O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre três polimorfismos do gene *NRAMP1* e as reações hansênicas em pacientes multibacilares e paucibacilares.

Métodos

Amostra. Realizou-se um estudo comparativo, observacional envolvendo 201 indivíduos hansenianos com quadro reacional, excluída a forma neurítica

pura de hanseníase, oriundos da demanda espontânea ou encaminhados por outros serviços da rede pública e acompanhados nos ambulatórios de hanseníase do Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM)/Universidade de Pernambuco e da Policlínica Lessa de Andrade, em Recife, nos anos de 2007 e 2008.

As reações hansênicas foram classificadas de acordo com os critérios de Ridley e Joppling²⁴, em tipo I ou tipo II. O paciente com reação tipo I ou reversa caracterizava-se clinicamente por: infiltração de lesões antigas associadas ao surgimento de novas lesões em forma de manchas ou placas infiltradas, eritema, dor, lesões vésico-bolhosas, ulcerações, parestesia, mal-estar, febre, dor ou espessamento de nervos periféricos. Como reação tipo II ou eritema nodoso considerou-se o quadro caracterizado pelo surgimento de nódulos disseminados, febre e neurite⁴.

Cem pacientes (49,8%) foram paucibacilares, pois apresentavam baciloscopia inicial negativa antes do tratamento, menos de cinco lesões cutâneas e até um tronco nervoso afetado, enquanto que 101 (50,2%) foram multibacilares, ou seja, tinham baciloscopia inicial positiva.

O tipo de pele foi baseado na classificação de Fitzpatrick¹⁴ que contempla a cor dos olhos, cabelos e da pele. Os tipos I, II e III corresponderam à pele branca, os tipos IV e V, à parda, e o tipo VI, à negra.

O protocolo constou de exame clínico dermatológico e realização de coleta de 7,5mL de sangue venoso periférico para análises genética e molecular.

Determinação dos polimorfismos. A determinação dos polimorfismos foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pela técnica

do polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) proposto por Lui *et al.*¹⁷. A reação foi realizada em um total de 25µL contendo 50 ng a 100 ng de DNA, Tris-HCL 10 mM (pH 9.0), KCl 50 mM, MgCl 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada iniciador e uma unidade de *Taq* DNA polymerase (Biotools, USA).

Os iniciadores utilizados na PCR foram: 5'-TCGCACCATCCCTATACCCAG-3' e 5'-TCTCGAAAGTGTCCCACTCAG-3' para o polimorfismo 274 C/T e 5'-GCATCTCCCCAATTCATGGT-3' e 5'-AACTGTCCCACTCTATCCTG-3' para os polimorfismos D543N e 1729 + 55 del 4. As condições da reação foram: um ciclo inicial de 94°C por 3 min, seguido de um protocolo com 35 ciclos a 94°C por 1 min para desnaturação, 60°C por 1 min para anelamento e 72°C por 1 min para extensão e um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min no termociclador *Gradient* da *Eppendorf*. As amostras foram submetidas à amplificação do gene humano constitutivo *gapdH* como controle positivo de reação e verificação da qualidade do DNA extraído. Como controle negativo da reação, foram usados os reagentes da PCR, em ausência de DNA. O produto da amplificação foi visualizado em gel de agarose a 2% corado pelo brometo de etídeo (0,5µg/mL), sob luz ultravioleta e fotografado com filme *Polaroid* 667.

A segunda etapa do ensaio constou de digestão enzimática de 5 µL do produto da PCR, adicionados a uma solução preparada com tampão (1x) de reação NEBuffer4 (*BioLabs*®, *United Kingdom*). Para o polimorfismo 274 C/T a PCR produziu fragmentos de 216 pares de bases (bp), os quais tratados pela enzima de restrição *Mnl I* a 37°C durante 18 horas, definiram o alelo mutante (T) correspondente aos fragmentos 167, 37 e 12 bp e o alelo selvagem (C),

correspondente aos fragmentos 102, 65, 37 e 12 bp. Para o polimorfismo D543N, os fragmentos com 240 ou 244bp foram submetidos à enzima de restrição *Ava II*, definindo o alelo mutante (A) correspondente aos fragmentos 201 e 39bp e o selvagem (G) correspondente aos fragmentos 126, 79 e 39bp. Os fragmentos do polimorfismo 1729 + 55del4, com 240p ou 244bp, foram submetidos à enzima de restrição *Fok I* definindo o alelo mutante (-TGTG), correspondente ao fragmento 240 bp, e o alelo selvagem (+TGTG), com os fragmentos 211 e 33bp.

O produto da digestão foi visualizado em gel de poliacrilamida a 10% e corado pela prata. O gel foi secado em filme celofane e arquivado para determinação dos genótipos segundo o protocolo de Liu *et al.*¹⁷.

Devido a dificuldades técnicas, a determinação dos polimorfismos 274 C/T e D543N foi possível nas amostras de DNA de 197 indivíduos (100 multibacilares e 97 paucibacilares), enquanto o polimorfismo 1729 + 55del4 foi determinado nas amostras de 172 indivíduos (85 multibacilares e 87 paucibacilares).

A análise estatística foi realizada pelos programas *MSOffice Excel* versão 2003 para o gerenciamento do banco de dados; *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) for Windows versão 12.0, para a execução dos cálculos estatísticos, elaboração e edição de gráficos e *MSOffice Word* versão 2003, para elaboração das tabelas. Foram empregados o teste Qui-quadrado (Mantel-Haenszel), para testar associação entre variáveis qualitativas, e o teste exato de Fisher, nos casos em que o valor esperado foi menor que cinco, ambos em nível de significância de 0,05.

O projeto teve a aprovação do Comitê de Ética, cujo registro no CAAE foi 0009.0.250.250-07.

Resultados

A amostra foi constituída em sua maioria por homens, indivíduos fototipo V, com idade entre 30-44 anos e procedentes de Recife (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das variáveis de caracterização dos 201 pacientes reacionais atendidos no CISAM e Policlínica Lessa de Andrade, 2007-2008

Variáveis	n (%)
Sexo	
Masculino	131 (65,2)
Feminino	70 (34,8)
Cor da pele	
Fototipo III	42 (20,9)
Fototipo IV	60 (29,9)
Fototipo V	74 (36,8)
Outros	25 (12,4)
Idade	
0 – 14 anos	8 (4,0)
15 – 29 anos	40 (19,9)
30 – 44 anos	69 (34,3)
45 – 59 anos	61 (30,4)
≥ 60 anos	23 (11,4)
Procedência	
Recife	129 (64,2)
Interior	39 (19,4)
Região Metropolitana	33 (16,4)

As distribuições das frequências alélicas e genóticas de cada polimorfismo nos indivíduos reacionais multibacilares e paucibacilares foram verificadas. Os alelos C, G e +TGTG foram os mais frequentes para os polimorfismos 274 C/T, D543N e 1729+ 55del4, respectivamente, independente da classe bacilar. Quanto aos genótipos, as maiores frequências foram observadas para CC, GG e +-TGTG. Não se observaram diferenças significantes na distribuição genotípica entre pacientes multibacilares, quando comparados aos paucibacilares (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos 274 C/T, D543N e 1729+55del4 do gene *NRAMP1* dos pacientes multibacilares e paucibacilares com reação hansênica

POLIMORFISMO	ALELO/ GENÓTIPO	MULTIBACILARES ES (n, %)	PAUCIBACILARES RES (n, %)	TOTAL (n, %)	p
274C/T	C	138 (69,0)	144 (74,2)	282 (71,6)	0,25
	T	62 (31,0)	50 (25,8)	112 (28,4)	
	CC	49 (49,0)	53 (55,0)	102 (51,8)	0,43
	CT	40 (40,0)	38 (39,0)	78 (39,6)	0,91
	TT	11 (11,0)	6 (6,0)	17 (8,6)	0,23
D543N	G	190 (95,0)	178 (91,8)	368 (93,4)	0,19
	A	10 (5,0)	16 (8,2)	26 (6,6)	
	GG	90 (90,0)	81 (83,5)	171 (86,8)	0,18
	GA	10 (10,0)	16 (16,5)	26 (13,2)	
1729+55del4	+TGTG	99 (58,2)	104 (59,8)	203 (59,0)	0,77
	-TGTG	71 (41,8)	70 (40,2)	141 (41,0)	
	++TGTG	24 (28,2)	26 (29,9)	50 (29,1)	0,81
	+ -TGTG	51 (60,0)	52 (59,8)	103 (59,9)	0,98
	--TGTG	10 (11,8)	9 (10,3)	19 (11,0)	0,77

Genótipos: cálculo do Qui-quadrado comparativo de cada genótipo com a soma dos outros do mesmo polimorfismo

Na Tabela 3, estão apresentadas as distribuições das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos segundo sexo dos pacientes.

Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de cada polimorfismo segundo baciloscopia e sexo dos pacientes

POLIMORFISMO	ALELO / GENÓTIPO	MULTIBACILARES		p	PAUCIBACILARES		p
		MASC (n, %)	FEM (n, %)		MASC (n, %)	FEM (n, %)	
274C/T	C	95 (66,9)	43 (74,1)	0,32	89 (75,4)	55 (72,4)	0,64
	T	47 (33,1)	15 (25,9)	0,22	29 (24,6)	21 (27,6)	0,75
	CC	32 (45,0)	17 (58,6)	0,24	33 (55,9)	20 (52,6)	0,96
	CT	31 (43,7)	9 (31,0)	1,00*	23 (39,0)	15 (39,5)	0,68*
	TT	8 (11,3)	3 (10,4)		3 (5,1)	3 (7,9)	
D543N	G	136 (95,8)	54 (93,1)	0,48*	106 (89,8)	72 (94,7)	0,23
	A	6 (4,2)	4 (6,9)	0,47*	12 (10,2)	4 (5,3)	0,21
	GG	65 (91,5)	25 (86,2)		47 (79,7)	34 (89,5)	
	GA	6 (8,5)	4 (13,8)		12 (20,3)	4 (10,5)	
1729+55del4	+TGTG	72 (58,0)	27 (58,7)	0,94	64 (60,4)	40 (58,8)	0,84
	-TGTG	52 (41,0)	19 (41,3)	0,42	42 (39,6)	28 (41,2)	0,58
	++TGTG	16 (25,8)	8 (34,8)	0,17	17 (32,1)	9 (26,5)	0,45
	+ -TGTG	40 (64,5)	11 (47,8)	0,45*	30 (56,6)	22 (64,7)	0,73
	--TGTG	6 (9,7)	4 (17,4)		6 (11,3)	3 (8,8)	

* Teste exato de Fischer. Genótipos: cálculo do Qui-quadrado comparativo de cada genótipo com soma dos outros do mesmo polimorfismo

A distribuição dos polimorfismos segundo cor da pele, entre multibacilares e paucibacilares, encontra-se na Tabela 4, na qual não foram identificadas diferenças significantes. Os fototipos I, II e III formaram o grupo A e os fototipos IV, V e VI o grupo B.

Tabela 4 - Distribuição das frequências alélicas e genóticas de cada polimorfismo segundo baciloscopia e fototipo dos pacientes

POLIMORFISMO	ALELO / GENÓTIPO	MULTIBACILARES			PAUCIBACILARES		
		A* (n,%)	B* (n,%)	p	A* (n,%)	B* (n,%)	p
274C/T	C	27 (79,4)	111 (66,9)	0,15	46 (74,2)	98 (74,2)	0,99
	T	7 (20,6)	55 (33,1)	0,38	16 (25,8)	34 (25,8)	0,64
	CC	10 (58,8)	39 (47,0)	0,91	18 (58,1)	35 (53,0)	0,34
	CT	7 (41,2)	33 (39,8)	0,20*	10 (32,2)	28 (42,4)	0,38*
	TT	0 (0)	11 (13,2)		3 (9,7)	3 (4,6)	
D543N	G	31 (91,2)	159 (95,8)	0,23	60 (96,8)	118 (89,4)	0,08
	A	3 (8,8)	7 (4,2)	0,38*	2 (3,2)	14 (10,6)	0,07
	GG	14 (82,4)	76 (91,6)		29 (93,5)	52 (78,8)	
	GA	3 (17,6)	7 (8,4)		2 (6,5)	14 (21,2)	
1729+55del4	+TGTG	20 (58,8)	79 (58,1)	0,94	37 (63,8)	67 (57,8)	0,45
	-TGTG	14 (41,2)	57 (41,9)	0,77*	21 (36,2)	49 (42,2)	0,51
	++TGTG	4 (23,5)	20 (29,4)	0,32	10 (34,5)	16 (27,6)	0,88
	+TGTG	12 (70,6)	39 (57,4)	0,68*	17 (58,6)	35 (60,3)	0,71*
	-TGTG	1 (5,9)	9 (13,2)		2 (6,9)	7 (12,1)	

*Teste de Fisher. Genótipos: cálculo do Qui-quadrado comparativo de cada genótipo com soma dos outros do mesmo polimorfismo.

Na Tabela 5 está apresentada a distribuição dos genótipos segundo tipos reacionais. Foi possível identificar diferenças significantes relacionadas ao genótipo mutante 274 TT. Em pacientes com genótipo TT, a reação tipo I foi menos frequente, diferindo dos pacientes com reação tipo II, nos quais foi mais frequente.

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes reacionais estudados quanto às frequências genotípicas de cada polimorfismo e o tipo reacional

Polimorfismo	Genótipo	Reação tipo I			Reação tipo II		
		SIM n (%)	NÃO n (%)	<i>p</i>	SIM n (%)	NÃO n (%)	<i>p</i>
274C/T	CC	87 (523,4)	15 (48,4)	0,68	25 (50,0)	77 (52,4)	0,77
	CT	68 (41,0)	10 (32,2)	0,36	17 (34,0)	61 (41,5)	0,35
	TT	11 (6,6)	6 (19,4)	0,03*	8 (16,0)	9 (6,1)	0,04
D543N	GG	144 (86,7)	27 (87,1)	0,61*	44 (88,0)	127 (86,4)	0,77
	GA	22 (13,3)	4 (12,9)		6 (12,0)	20 (13,6)	
1729+55del4	++TGTG	44 (30,1)	6 (23,1)	0,46	12 (28,6)	38 (29,2)	0,93
	+TGTG	85 (58,2)	18 (69,2)	0,29	24 (57,1)	79 (60,8)	0,68
	--TGTG	17 (11,7)	2 (7,7)	0,42	6 (14,3)	13 (10,0)	0,30*

*Teste de Fisher.

Genótipos: cálculo do Qui-quadrado comparativo de cada genótipo com soma dos outros do mesmo polimorfismo.

Discussão

O estudo da associação entre três polimorfismos do gene *NRAMP1* e as reações hansênicas em pacientes multibacilares e paucibacilares baseou-se nas evidências de que a susceptibilidade, resistência e apresentações clínicas da hanseníase podem ser atribuídas aos polimorfismos genéticos^{1,13,19,20}. No entanto não se localizou qualquer publicação dessa associação com as reações hansênicas, daí a importância desta pesquisa.

No presente estudo, ao relacionar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da *NRAMP1* com os resultados da baciloscopia inicial dos pacientes, que espelha a multiplicação do *M. leprae*, não se encontrou associação significativa. O mesmo foi observado também em relação ao sexo e ao fototipo.

Uma resposta imune inata efetiva em combinação com a baixa virulência do *M. leprae* está associada à resistência para o desenvolvimento da hanseníase²⁵. Desse processo, participam os receptores de reconhecimento de padrões, como os *Toll-like* (TLRs), que são essenciais para a identificação de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas, os quais induzem à resposta imune Th1 ou Th2, que pode ser influenciada pela expressão de determinados alelos do gene *NRAMP1*¹⁰.

A proteína NRAMP1 está localizada no compartimento endossômico ou lisossômico maduro de macrófagos ativados pela presença da *M. leprae* e determina a liberação do sinal intracelular para a migração de endossomos ou lisossomos e fusão destes no mecanismo de regulação da multiplicação bacteriana. Genótipos selvagens da *NRAMP1* promovem migração rápida dessas vesículas do sistema de Golgi para a região celular contendo fagossomos com *M. leprae*, diferente do que ocorre nos genótipos mutantes⁸. Essa ação dos genótipos da *NRAMP1* depende também do equilíbrio iônico e do transporte de cátions divalentes (Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}), para manutenção do pH intracelular que assegura a ação da peptidase para processamento antigênico endossomal, impedindo o desenvolvimento e a multiplicação do *Mycobacterium leprae* no macrófago^{8,9,15,27}.

Defeitos na produção da proteína codificada pelo *NRAMP1*, decorrentes da ação de determinados alelos mutantes, podem levar a uma síntese protéica inadequada e, conseqüentemente, à replicação bacteriana por falha da atividade macrofágica. Esses achados foram confirmados por Abel¹ e Meisner¹⁹ ao

identificarem, em população vietnamita, africana e chinesa, polimorfismos envolvidos na hanseníase, dentre eles o 274C/T, o D543N e o 1729+55del4.

Pode-se afirmar que o gene mutante suprime a ativação macrofágica, facilitando a multiplicação bacteriana e, conseqüentemente, favorecendo a forma multibacilar⁵. Analogamente, indivíduos com composição gênica selvagem teriam maior atividade dos macrófagos, o que dificultaria a reprodução bacteriana, levando à forma paucibacilar.

No entanto essa lógica parte da premissa de que a multiplicação bacteriana estaria relacionada à composição gênica da *NRAMP1*, independente da ação de outros fatores, o que não tem sido corroborado por Abel *et al*¹ ao alertarem que a composição gênica interfere sobre a susceptibilidade à infecção bacteriana, mas não a sua progressão.

Na presente pesquisa, o genótipo heterozigótico +TGTG/-TGTG do polimorfismo 1729+55del4 foi semelhante entre paucibacilares e multibacilares, diferindo do observado por Meisner *et al*¹⁹, que ao estudarem hanseníase na população africana, verificaram predomínio de heterozigose entre multibacilares.

Quando se analisou a associação entre a composição genotípica dos polimorfismos 274C/T, D543N e 1729+55del4e da *NRAMP1* com as reações hansênicas tipo I e tipo II, independente das formas multibacilar ou paucibacilar, foi possível identificar diferença significativa. O genótipo mutante TT do polimorfismo 274C/T associou-se à presença da reação tipo II, restrita à forma multibacilar, e ausência da reação tipo I.

Soo *et al*.²⁷ testaram a hipótese de que a *NRAMP1* influencia o padrão de resposta imunológica, estudando cobaias com leishmaniose, e concluíram que os

alelos selvagens da *NRAMP1* elicítavam predominantemente linfócitos T helper I, ou seja, reação Th1, enquanto que os alelos mutantes induziam reações Th2.

Para investigar a influência da *NRAMP1* na resposta imunológica adquirida contra a *M. leprae*, Alcais *et al*² realizaram análise de ligação entre a região genômica *NRAMP1* e a intensidade da reação de Mitsuda em 118 componentes de 20 famílias nucleares com hanseníase, no Vietnã, ao identificarem essa associação, concluíram que a expressão da *NRAMP1* influencia na diferenciação das reações imunológicas Th1/Th2.

Scollard *et al*²⁵, em extensa revisão de artigos publicados entre 1990 e 2006, sobre os diversos aspectos da hanseníase, consideraram importante a associação entre as formas mais graves e o padrão de citocinas Th2, ficando as formas leves relacionadas ao padrão Th1.

Essas comprovações parecem reforçar os resultados da presente pesquisa, os quais acrescentaram ao conhecimento da hanseníase a associação entre a resposta imune e o genótipo TT do polimorfismo 274C/T. Esse resultado permitiu especular que o padrão genotípico do *NRAMP1* mantém uma relação mais estreita com a reação imunológica do que com a multiplicação bacteriana, representada pela baciloscopia.

Conclusão

Os resultados deste presente estudo sugerem que o polimorfismo 274 C/T do gene *NRAMP1* pode auxiliar na determinação da susceptibilidade à reação tipo II em indivíduos com hanseníase.

Agradecimentos

Aos colegas dermatologistas e demais funcionários do CISAM e da policlínica Lessa de Andrade e aos pacientes que, num gesto de desprendimento, concordaram em participar do estudo.

Referências

1. Abel L, Sanchez F, Obert J, Thuc LV, Skamene E, Lagrange PH, [Schurr EJ](#). [Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene](#). Infect Dis 1998; 177:133-45.
2. Alcais A, Sanchez FO, Thunc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, Schurr E, Abel I. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. J. infect. Dis 2000; 181: 302-308.
3. Alcaïs A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. Curr Opin Immunol. 2005;17:44-8.
4. Andrade ARC, Lehman LF, Schureuder PAM. Como reconhecer e tratar reações hansênicas. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005.
5. [Bellamy R](#), [Ruwende C](#), [Corrah T](#), [McAdam KP](#), [Whittle HC](#), [Hill AV](#). Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. N Engl J Med. 1998;338:640-644.
6. Beiguelman B. Genética e hanseníase - Ciência & Saúde Coletiva 2002; 7:117-128.
7. Blackwell JM, Searle S. [Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 \(= Ity/Lsh/Bcg\)](#). Immunol Lett 1999; 65: 73- 80.
8. Blackwell JM, Searle S, Goswami T, Miller EN. Understanding the multiple functions of Nramp1. Microbes and Infect 2000; 2: 317-321.
9. Biggs TE, Baker ST, Botham MS, Dhital A, Barton CH. Nramp1 modulates iron homoeostasis in vivo and in vitro: evidence for a role in cellular iron release involving de-acidification of intracellular vesicles. Eur J Immunol. 2001;31:2060-70.
10. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, *et al*. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 1999;285:732-6.
11. Brito MFM. O retratamento em hanseníase: Identificação dos fatores de risco – Um estudo caso-controle. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, 2004.
12. **Carmel S, Brode S, White JK, Popoff JF, Blackwell JM.** Slc11a1, Formerly Nramp1, Is Expressed in Dendritic Cells and Influences Major Histocompatibility Complex Class II Expression and Antigen-Presenting Cell Function. Infection and Immunity. 2007; 75 (10): 5059-5067.
13. Ferreira FR, Goulart LR, Silva HD, Goulart IMB. Susceptibility to Leprosy May Be Conditioned by an Interaction between the NRAMP1 Promoter Polymorphisms and the Lepromin Response. Int J Lepr Other Mycobact Dis 2004; 72: 457–467.
14. Fitzpatrick, TB. Soleil et peau. J Med Esthet 1975;2:330-34.
15. Kishi F. Isolation and characterization of human NRAMP1 cDNA. Biochem Biophys Res Commun 1994; 204:1074-80.

16. Lam-Yuk-Tseung S, Picard V, Gros P. Identification of a Tyrosine-based Motif (YGSI) in the Amino Terminus of Nramp1 (Slc11a1) That Is Important for Lysosomal Targeting J. Biol. Chem 2006; 281: 31677-31688.
17. Liu Jing T, Fujiwara M, Buu NT, Sánchez FO, Cellier M, Paradis AJ, Frappier D, Skamene E, Gros P, Morgan K, and Schurr E. Identification of Polymorphisms and Sequence Variants in the Human Homologue of the Mouse Natural Resistance–Associated Macrophage Protein Gene. Am. J. Hum. Genet 1995; 56: 845-853.
18. Marquet S, Lepage P, Hudson TJ, Musser JM, Schurr E. Complete nucleotide sequence and genomic structure of the human NRAMP1 gene region on Chromosome region 2q35. Mamm Genome 2000; 11(9):755-62.
19. Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AVS. Association of NRAMP1 Polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2001; 65: 733–735.
20. Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Verner A, Hudson TJ, Abel L, Schurr E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. Nat Genet. 2003;33:412-5.
21. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. Lepr Rev. 2006;77:189-202.
22. Nevo Y, Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research 2006; 1763 (7): 609-620.
23. Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética?. An. Bras Dermatol. 2007; 82:451-459.
24. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1966; 34:255-73.
25. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin Microbiol Rev. 2006;19:338-81.
26. Soares CGMS. Hanseníase no estado do Pará: perfil epidemiológico da população que demanda internação por reações hansênicas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2001.
27. Soo SS, Villarreal-Ramos B, Anjam Khan CM, Hormaeche CE, Blackwell J M. Genetic Control of Immune Response to Recombinant Antigens Carried by an Attenuated *Salmonella typhimurium* Vaccine Strain: *Nramp1* Influences T-Helper Subset Responses and Protection against Leishmanial Challenge Infect Immun, 1998; 66:1910-1917.
28. WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. No. 25, 2007, 82, 225–232 Geneva, 2007.

Conclusões

As reações hansênicas são quadros frequentes e constituem importantes episódios no contexto da hanseníase, porque são responsáveis por retratamento e incapacidades.

O estudo de fatores que podem predispor ao surgimento das reações como o fator genético, inclusive o polimorfismo de gene *NRAMP1*, se reveste de importância.

Neste estudo avaliaram-se as características clínicas de 201 pacientes reacionais paucibacilares e multibacilares, cujas conclusões foram que as reações hansênicas predominaram os indivíduos do sexo masculino que se associaram a um maior risco de desenvolvimento da forma multibacilar. A forma clínica borderline prevaleceu entre os pacientes reacionais e as reações hansênicas foram mais frequentes durante o tratamento. Os pacientes multibacilares foram mais propensos ao retratamento, e aqueles com reações tipo I e II, apresentaram maior frequência de neurite, linfadenopatia, artrite e irite do que aqueles com reação isolada.

Quanto aos polimorfismos estudados entre os pacientes reacionais concluiu-se que as variações alélicas e genotípicas do polimorfismo 274 C/T do gene *NRAMP1* parecem estar mais relacionadas ao tipo de reação do que à baciloscopia.

Apêndice A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: Reação hansênica e imunidade: polimorfismos do gene *NRAMP1*(SLC11A1) em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência no Recife, nordeste do Brasil

Pesquisadora responsável: Márcia Almeida Galvão Teixeira
Endereço: Rua Arnóbio Marques S/N – Hospital Oswaldo Cruz
ambulatório de Dermatologia Recife –PE- Fone: 81 34215003

Eu,.....
aceito participar de forma voluntária desta pesquisa na qual procurarei contribuir respondendo a perguntas sobre a minha doença através de um questionário e doação única de 7,5 ml de sangue, realizada por pessoa designada pela equipe da pesquisadora. Sei que este estudo não trará nenhum benefício imediato para mim. Entretanto, os resultados obtidos nesta pesquisa poderão contribuir para um melhor entendimento da hanseníase. Não haverá qualquer despesa para mim e as informações sobre minha pessoa e minha doença são confidenciais.
Os riscos a que estarei exposto são: dor, infecção, sangramento e manchas arroxeadas no local, que serão minimizados com cuidados de higiene na coleta e a pressão local após a coleta do sangue. Estarei livre para interromper a qualquer momento. O acompanhamento da minha doença não será alterado, caso eu desista de participar deste estudo.

Este projeto foi avaliado comitê de ética do CISAM que faz parte da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/CNS/Ministério da Saúde, Brasília). Qualquer dúvida ligarei para o centro de ética médica do CISAM, cujo número é 33021716 ou procurarei a pesquisadora responsável, Márcia Almeida Galvão Teixeira, no seguinte endereço: rua Arnóbio Marques S/N –Hospital Oswaldo Cruz - ambulatório de dermatologia ou pelo fone 34215003 ou no centro de saúde Lessa de Andrade (fone: 32327694)

Sendo assim, concordo em participar como voluntário não remunerado dessa pesquisa, estando ciente dos riscos e benefícios desses procedimentos para minha pessoa, conforme exposto acima. Sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo para mim. Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento em duas vias (uma ficará comigo).

Recife, _____, _____, _____

Voluntário

Assinatura

1º testemunha

Assinatura

Pesquisadora responsável

Apêndice B – PROTOCOLO DA PESQUISA

Título: Reação hansênica e imunidade: polimorfismos do gene *NRAMP1*(SLC11A1) em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência no Recife, nordeste do Brasil

Pesquisadora responsável: Márcia Almeida Galvão Teixeira
Endereço: Rua Arnóbio Marques S/N – Hospital Oswaldo Cruz
ambulatório de Dermatologia Recife –PE- Fone: 81 34215003

1. Número de registro da pesquisa: _____
2. Data do Exame: _____
3. Tipo ☐ 1 multibacilar ☐ 2 paucibacilar (comparativo)
- 4.Nome: _____
5. Data Nascimento: _____
- Grupo Idade ☐ 1(1/14) ☐ 2(15/29) ☐ 3(30/44) ☐ 4(45/59) ☐ 5(>60)
6. Número de registro na unidade de Saúde: _____
☐ 1CISAM ☐ 2Lessa de Andrade
7. Sexo:
☐ 1 masculino ☐ 2 feminino
8. Fototipo Fitzpatrick:
☐ I - I ☐ 2 -II ☐ 3- III ☐ 4 – IV ☐ 5 –V ☐ 6 - VI
- 9.Endereço

- ☐ 1Recife ☐ 2Região metropolitana ☐ 3 Interior

10. Forma clínica:

☐ 1 MHT ☐ 2 MHBT ☐ 3 MHBB

☐ 4 MHBV ☐ 5 MHB ☐ 6 MHV ☐ 7 MHI

11. Data início tratamento: _____

12. Data final tratamento: _____

13. Tratamento padrão:

☐ 1 padrão ☐ 2 alternativo ☐ 3 não informado

14. Se fora do padrão, quantos meses:

☐ 1 = 24 meses ☐ 2 diferente de 24 meses

15. Regularidade do tratamento (sem abandono por mais de 3 meses consecutivos)

☐ 1 sim ☐ 2 não

16. Retratamento:

☐ 1 sim ☐ 2 não

17. Baciloscopia Início tratamento:

☐ 1 positiva (valor = _____) ☐ 2 negativa

18. Reação Tipo I:

☐ 1 sim ☐ 2 não

☐ 1 placas antigas infiltradas

☐ 2 placas recentes eritemato-infiltradas, tricotóides e com distúrbio de sensibilidade

☐ 3 dor ou espessamento em um ou mais nervos periféricos

☐ 4 febre e/ou mal estar

☐ 5 vesículas e/ou bolhas e/ou úlceras

☐ 6 edemas/dor em mãos

19. Reação Tipo II:

☐ 1 sim ☐ 2 não

☐ 6 <10 nódulos seguimento superior ou inferior

☐ 7 entre 10-20 nódulos em seguimento superior ou inferior

☐ 8 >20 nódulos em seguimento superior ou inferior

☐ 9 febre e/ou mal estar

☐ 10 astenia

☐ 11 vesículas e/ou bolhas e/ou úlceras

☐ 12 dor/espessamento em qualquer nervo periférico

☐ 13 linfadenopatia

☐ 14 irite ☐ 15 artrite/ artralgia

☐ 16 edema/dor em mãos/pés

☐ 17 eritema polimorfo

20. neurite (acometimento neural) :

☐ 1 sim ☐ 2 não

21. Início reação:

☐ 1 no tratamento ☐ 2 < 6 meses alta

☐ 3 >6 meses alta ☐ 4 >1 ano alta

22. Baciloscopia na alta:

☐ 1 positiva (valor = ____) ☐ 2 negativa ☐ 3 não realizada

23. Avaliação clínica na alta:

☐ 1 cura c/lesões ☐ 2 cura s/lesões

☐ 3 conclusão tratamento ☐ 4 sem referência

24. Uso de drogas na reação:

☐ 1 corticóides ☐ 2 talidomida ☐ 3 ambas ☐ 4 outras

25. Genotipagem para *NRAMP1*

1. 274 C/T:

Alelo: ☐ 1 C ☐ 2 T

Genótipo: ☐ 1 CC ☐ 2 CT ☐ 3 TT

2. D543N :

Alelo ☐ 1 G ☐ 2 A

Genótipo: ☐ 1 GG ☐ 2 GA ☐ 3 AA

3. 1729+55 del :

Alelo ☐ 1 + TGTG ☐ 2 - TGTG

Genótipo: ☐ 1 + TGTG + TGTG ☐ 2 + TGTG - TGTG

☐ 3 - TGTG – TGTG

OBSERVAÇÕES:.....

.....

.....

.....

.....

Prezada Doutora Márcia,

Informo que o trabalho "**Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares atendidos em dois centros de referência para hanseníase na cidade de Recife-PE**" foi recebido pela **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, em **13/10/09** e registrado com o nº **3396**.

Atenciosamente,

Valquiria Cunha
Secretária/RSBMT

Prezada Doutora Márcia,

Informo que o trabalho **"Poliformismo do gene NRAMP1 em indivíduos com reações hansênicas atendidos em dois Centros de Referência no Recife, Nordeste do Brasil"** foi recebido pela **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, em **05/10/09** e registrado com o nº **3391**.

Oportunamente, entrarei em contato com Vossa Senhoria.

Atenciosamente,

Valquiria Cunha
Secretária/RSBMT