



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Medicina Tropical
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

**IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE PARA O RECEPTOR
TOLL-LIKE 2 (-196 A -174 DEL) E DOSAGEM DE CITOCINAS TH2 EM
PACIENTES HANSÊNICOS**

Márcio da Silveira Gomes

Recife, 2013

Márcio da Silveira Gomes



**IDENTIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE PARA O RECEPTOR *TOLL-
LIKE 2* (-196 A -174 DEL) E DOSAGEM DE CITOCINAS TH2 EM PACIENTES
HANSÊNICOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical de Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre na área de conhecimento em Medicina Tropical.

Prof^a Orientadora: Dr^a Vláudia Maria Assis Costa

Prof^a Co-Orientadora: Dr^a Rosângela Ferreira Frade de Araújo

Recife, 2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

G633i Gomes, Márcio da Silveira.
Identificação do polimorfismo no gene para o receptor *toll-like 2* (-196 a -174 del) e dosagem de citocinas th2 em pacientes hanseníacos / Márcio da Silveira Gomes. – Recife: O autor, 2013.
71 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Vláudia Maria Assis Costa .
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Hanseníase. 2. Receptores imunológicos. 3. Citocinas. I. Costa, Vláudia Maria Assis (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-040)



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 DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO MÁRCIO DA SILVEIRA GOMES

No dia 25 de novembro de 2013, às 14h00, na Sala de Aula do PPGMEDTROP, os Membros Doutores a **Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho – Presidente da Banca (UFPE)**, a **Prof^ª. Dr^ª. Valdênia Maria Oliveira de Souza (UFPE)** e a **Prof^ª. Dr^ª. Virgínia Maria Barros de Lorena (CPqAM-FIOCRUZ)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram o mestrando **MÁRCIO DA SILVEIRA GOMES** sobre a sua Dissertação intitulada **“Identificação do Polimorfismo no Gene para o Receptor Toll-like 2 (-196 a -174 del) e dosagem de citocinas Th2 em Pacientes Hansênicos”**, a qual foi orientada pela **Prof^ª. Dr^ª. Vladia Maria Assis Costa (UFPE)** e co-orientada pela **Prof^ª. Dr^ª. Rosângela Ferreira Frade de Araújo (LIKA/UFPE)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do mestrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

APROVADO

Prof^ª. Dr^ª. Valdênia Maria Oliveira de Souza

APROVADO

Prof^ª. Dr^ª. Virgínia Maria Barros de Lorena

APROVADO

Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Prof^ª. Dr^ª. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Prof^ª. Dr^ª. Virgínia Maria Barros de Lorena



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

REITOR

Prof^o. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÉ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^o. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^o. Nicodemos Teles de Pontes Filho

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

TROPICAL

Prof^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

MEDICINA TROPICAL

Prof^a. Vera Magalhães da Silveira

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Catarina de Souza Lopes

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof^o. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof^o. Fábio André dos Santos Brayner

Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^a. Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Prof^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof^a. Marli Tenório Cordeiro

Prof^a. Rejane Pereira Neves

Prof^o. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Prof^a. Vera Magalhães da Silveira

Prof^a. Vláudia Maria Assis Costa

Dedico

*A minha família, por todo o amor,
atenção, paciência e incentivo.*

Agradecimentos

Agradeço a:

Agradeço a Deus, por me dar força e paciência necessárias.

A minha família pela contínua paciência e pelo incrível apoio. Se cheguei aonde cheguei devo grande parte a minha família.

Às professoras Vláudia e Rosângela pela orientação e apoio nos momentos difíceis, pelas lições ensinadas, pela a orientação.

Ao Francisco e Érica, médico e enfermeira, pela a ajuda nas coletas.

Aos membros dos laboratórios de imunologia, biologia molecular e PROSPECMOL por sempre me ajudarem nos momentos de dúvida.

A Pós-Graduação em Medicina Tropical, pela chance dada de realizar o mestrado e pela paciência.

A meus colegas de pós-graduação, pelo companheirismo e atenção.

A todos, muito obrigado.

“Não há problema que não possa ser solucionado pela paciência”

Chico Xavier

Resumo

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica de caráter granulomatosa, que afeta pele e nervos periféricos, causada pelo *Mycobacterium leprae* ou bacilo de Hansen. Os receptores denominados *Toll-like* (TLR), encontrados nas células do sistema imune, são primordiais no reconhecimento das estruturas dos bacilos. Os heterodímeros TLR 2-TLR 1 e os homodímeros TLR 2 e TLR 4 são fundamentais no desenvolvimento da resposta imune inata frente às agressões provocadas por micobactérias. Vários estudos corroboram o fato de que polimorfismos nos TLRs podem influenciar a susceptibilidade a uma variedade de infecções, incluindo a hanseníase. As citocinas do padrão Th2, especialmente IL-4 e IL-10, são responsáveis pela supressão da resposta dos macrófagos a infecção pelo agente etiológico da hanseníase. O presente estudo tem como objetivos determinar os genótipos de pacientes hanseníacos e controles sadios em relação ao receptor TLR 2 e a frequência de apresentação destes nas formas multibacilar e paucibacilar da hanseníase e o perfil de produção das citocinas IL-4 e IL-10 em pacientes hanseníacos. As amostras foram analisadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), UFPE. Dos casos analisados 79,5% foram classificados como multibacilares e 20,5% como paucibacilares. O genótipo Ins/Del foi mais comumente encontrado nos pacientes hanseníacos. O genótipo Del/Del foi associado com o efeito de proteção no desenvolvimento da hanseníase (OR=0,58, IC_{95%} 0,07-7,48, p= 0,44). Quando analisados ambos os genótipos em relação a forma paucibacilar Ins/Del (OR= 0,68; IC_{95%} : 0,14-3,85; p: 0,42); Del/Del (OR= 0,31, IC_{95%} : 0,01-0,38; p: 0,38), ambos apresentaram efeito de proteção em relação a forma paucibacilar e ambos os genótipos Ins/Del (OR= 1,45; IC_{95%}; 0,25-6,95; p: 0,38) e Del/Del (OR= 3,2; IC_{95%}; 0,04-57,91) apresentaram o risco de desenvolver a forma multibacilar. Observou-se maior produção de IL-4 e IL-10 em pacientes multibacilares e uma redução na produção de IL-4 e IL-10 após a primeira dose de tratamento poliquimioterápico, que é indicativo de uma modulação imunológica do indivíduo hanseníaco.

Palavras Chave: Hanseníase. Receptores Imunológicos. Citocinas.

Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease, which affects skin e pheriferic nerves, caused by *Mycobacterium leprae* or Hansen's bacilli. The receptors *Toll-like* (TLR) found in the cells of the immune system, are phrimordial in recognizing the components of the bacilli. The heterodimeros TLR 2-TLR 1 and the homodímeros TLR 2 and TLR 4 are critical in the development of the innate imunne response against the mycobacteria. A great amount of researches support the fact that TLR polymorphisms can influence the susceptibility to a great amount of infections, including leprosy. Th2 cytokines, especially IL-4 e Il-10, are responsible for the suppression of the macrophages response to the leprosy agent. This study has the objective sf verify the association between the genetic variation in TLR 2 and the chance of developing multibacillary or paucibacillary form of the disease and the production profile of IL-4 and IL-10. Of all the cases 79,5% were multibacillary and 20,5% were paucibacillary. The Ins/Del genotype was related with the risk of developing leprosy (OR=2,64, IC_{95%}: 0,48-26,89, p= p=0,19). The Del/Del genotype was associated with the protection effect in development of the disease (OR=0,58, IC_{95%} 0,07-7,48, p= 0,44). When both genotypes were analyzed for the paucibacillary form Ins/Del (OR= 0,68; IC_{95%} : 0,14-3,85; p: 0,42); Del/Del (OR= 0,31, IC_{95%} : 0,01-0,38; p: 0,38) both showed protective effect and both Ins/Del (OR= 1,45; IC_{95%}; 0,25-6,95; p: 0,38) e Del/Del (OR= 3,2; IC_{95%}; 0,04-57,91) showed risk of development of the multibacillary form. We observed higher production of IL-4 and IL-10 in multibacillary patients and a reduction in the production of IL-4 and Il-10 after the first round of treatment, which indicates a immunological modulation by the patient.

Key-Words: Leprosy. Receptors, Immunologic. Cytokines.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Incidência e prevalência da hanseníase no Brasil pg. 22

Figura 2: Representação da variação da resposta imunológica ao longo do espectro da classificação de Ridley & Jopling pg. 23

Figura 3: Esquema representativo da estrutura dos receptores *Toll-Like* pg. 27

Figura 4: Esquemas terapêuticos utilizados para Paucibacilar: 6 cartelas pg. 30

Figura 5: Esquemas terapêuticos utilizados para Multibacilar: 12 cartelas pg. 30

Figura 6: Esquema de extração de DNA genômico pg. 38

Figura 7: Gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, ilustrando os padrões eletroforéticos encontrados na PCR para TLR 2 (-196 a -174 del). Os poços 1 a 5 correspondem ao genótipo Ins/Del (bandas de 286 pb e 264 pb), as bandas 6 e 7 correspondem ao genótipo Del/Del (banda de 264 pb) e as bandas 8 a 11 correspondem ao genótipo Ins/Ins (banda de 286 pb) pg. 40

Figura 8: Produção de IL-4 em cultura de sangue total de pacientes com a forma multibacilar (MB), paucibacilar (PB) e contatos saudáveis estimulados com fitohemaglutinina (PHA) ou BCG pg. 50

Figura 9: Produção de IL-10 em cultura de sangue total de pacientes com a forma multibacilar (MB), paucibacilar (PB) e contatos saudáveis © estimulados com fitohemaglutinina (PHA) ou BCG. $P < 0.01$ pg. 50

Figura 10: Produção de IL-4 em cultura de sangue total de pacientes com a forma multibacilar (MB), paucibacilar (PB), antes (S/T) e após (C/T) início do tratamento poliquimioterápico, estimulados com fitohemaglutinina (PHA) ou BCG pg. 51

Figura 11: Produção de IL-4 em cultura de sangue total de pacientes com a forma multibacilar (MB), paucibacilar (PB), antes (S/T) e após (C/T) início do tratamento poliquimioterápico, estimulados com fitohemaglutinina (PHA) ou BCG pg. 52

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características clínicas e histopatológicas (GOULART *et al.*, 2002) das formas tuberculóide e Virchowiana da hanseníase pg. 25

Tabela 2: Frequência gênica dos genótipos para TLR 2 (-196 a -174 del) pg. 48

Lista de Abreviaturas e Siglas

BB: *Boderline borderline*

BCG: Bacilo Calmette-Guérin

BT: *Boderline* Tuberculóide

BV: *Boderline* Virchowiana

C: Citosina

CFZ: Clofamizina

DD: Dimorfa-dimorfa

DDS: Dapsona

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTPs: Desoxirribinucleotídeos tri-fosfatados

DT: Diforma tuberculóide

DV: Diforma Virchowiana

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

G: Guanina

HEPES: N-(2-hydroxyethyl-piperazine-N⁺)-(2-ethanesulfonic acid)

I: Indeterminada

IB: Índice baciloscópico

IC: Imunidade celular

IC_{95%}: Intervalo de confiança de 95%

IL: Interleucina

IFN- γ : Interferon γ

KDa: Quilo-Dalton

LPS: Lipopolissacarídeo

M: Molar

MgCl₂: Cloreto de magnésio

OMS: Organização Mundial de Saúde

OR: *Odds ratio*

pb: Pares de Base

PBS: Solução salina fosfatada

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PGL: Glicolipídios fenólicos

pH: Potencial Hidrogeniônico

PHA: Fitohemaglutinina

pmol: Pico-molar

PPR: Padrão de Reconhecimento de Patógenos

PQT: Poliquimioterapia

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

RFM: Rifampicina

q-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de base única)

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th: *T helper*

TNF: Fator de necrose tumoral

TLR: Receptor *Toll-like*

TT: Tuberculóide

VV: Virchowiana

Sumário

1.	Introdução	16
2.	Revisão da Literatura.....	19
2.1.	Epidemiologia da Hanseníase.....	21
2.2.	Classificação da Hanseníase	22
2.2.1.	Classificação Histopatológica da Hanseníase.....	22
2.2.2.	Classificação Operacional da Hanseníase	23
2.3.	Características Clínicas	24
2.4.	Resposta Imune	26
2.4.1.	Resposta Imune Inata	26
2.4.1.1.	Receptor <i>Toll-Like</i>	26
2.4.1.2.	Receptor <i>Toll-Like 2</i>	26
2.4.2.	Resposta Imune Adaptativa	28
2.5.	Diagnóstico e Tratamento.....	30
2.6.	Polimorfismos Genéticos.....	31
3.	Objetivos.....	32
3.1.	Objetivo Geral	33
3.2.	Objetivos Específicos	33
4.	Hipóteses	34
5.	Materiais e Métodos	36
5.1.	População de Estudo e Desenho de Estudo	37
5.2.	Critérios de Inclusão.....	37
5.3.	Critérios de Exclusão.....	37
5.4.	Coleta Sanguínea	37
5.5.	Extração de DNA.....	38
5.6.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para TLR 2	39
5.7.	Cultura Celular	40
5.8.	Dosagens de citocinas	40
5.9.	Análise estatística	41

6. Identificação do Polimorfismo no Gene para o Receptor <i>Toll-like</i> 2 (-196 a -174 del) e Dosagem de Citocinas Th2 em Pacientes Hansênicos.....	42
7. Conclusões.....	56
Referências	58
Anexos.....	64
Anexo A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	65
Anexo B. Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências de Saúde, UFPE	68

1. Introdução

1. Introdução:

A hanseníase é uma doença que predomina em países em desenvolvimento de climas tropical e sub-tropical, como é o caso do Brasil. Aproximadamente 40% dos casos da doença em nosso país provém das regiões Norte e Nordeste. Em 2011, o país apresentou 1,54 casos/10.000 habitantes, com 29.690 casos sendo tratados. Neste mesmo ano, detectaram-se 33.955 novos casos com um coeficiente de detecção de 17,6 novos casos/100.000 habitantes. A doença é de caráter granulomatosa crônica afetando principalmente a pele e os nervos periféricos. Possui baixa patogenicidade, uma vez que a maioria das pessoas expostas não irá adoecer, e alta infectividade, uma vez que cerca de 100 milhões de bacilos podem ser eliminados por secreção nasal todos os dias por indivíduos contaminados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, OMS, 2010).

A resposta imune na infecção causada por *M. leprae* é de fundamental importância na determinação da fisiopatologia da doença. Os receptores *Toll-like* (TLR) estão relacionados à resposta imune inata contra diversas infecções (BEUTLER *et al.*, 2006) e os polimorfismos destes receptores foram associados com a susceptibilidade ou resistência a diversas doenças (COOK *et al.*, 2004, HILL, 2006), incluindo a hanseníase. Existem diversas associações com os polimorfismos nos genes para estes receptores com as formas clínicas apresentadas pelos pacientes.

A interação entre moléculas constituintes do *M. leprae*, especialmente o glicolípido fenólico 1 (PGL-I), com o TLR 2 leva a ativação de um dos polos da resposta imune para o Th1 ou Th2 (SOUZA, 1997). Na forma tuberculóide e suas variantes, observa-se um padrão Th1, onde se observa a produção de citocinas pró-inflamatórias e eliminação do bacilo. Na forma Virchowiana e suas variantes, observa-se a produção de citocinas do padrão Th2 com a IL-4 e a IL-10 (MAEDA *et al.* 2003). Estas citocinas são responsáveis pela supressão da resposta dos macrófagos. A IL-4 diminui a expressão do TLR 2 e estimula a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B, enquanto que a IL-10 bloqueia a ativação de macrófagos. De acordo com Sharma *et al.* (1998), a infecção nas células dendríticas pelo bacilo é facilitada pela estimulação da IL-4 que leva a expressão do CD209, aumentando os danos nestas células e levando a perda de sensibilidade.

Em pesquisa realizada por Bochud *et al.* (2003), foi demonstrado que o receptor TLR 2 é essencial no reconhecimento de *M. leprae* e que o polimorfismo TLR 2 (Arg677Trp) é mais comum nas lesões tuberculóides. Constatou-se que um polimorfismo do tipo microsatélite e um polimorfismo de base única (SNP) (597C →T) em TLR 2 estão associados

com a ocorrência da reação reversa em pacientes hansênicos (BOCHUD *et al.*, 2008). Em estudo do tipo caso-controle realizado por Chen *et al.* (2010) em pacientes com tuberculose pulmonar em tratamento, constatou-se que o polimorfismo em TLR 2 (-196 a -174 del), nos pacientes com o genótipo del/del, tinha um efeito de prevenção contra o desenvolvimento de sintomas sistêmicos causados pela doença. Não existe nenhum estudo na América Latina onde se determine o padrão genotípico para TLR 2 (-196 a -174 del) em pacientes hansênicos.

Diante das informações apresentadas, presente estudo investigou o padrão genético em relação ao polimorfismo TLR 2 (-196 a -174 del) e o padrão de produção das interleucinas 4 e 10, em pacientes hansênicos e controles sadios

2. Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura:

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo álcool-ácido resistente, não-móvel, não formador de esporos e micro-aerófilo. É constituído de uma parede celular similar aquelas encontradas nas bactérias Gram positivas, formada de peptideoglicano constituído de moléculas de N-acetilglucosamina e N-glicolmuramato conectadas por ligações cruzadas de peptídeos e essas ligações são conectadas a camadas de galactano pelo arabinogalactano (DAFFE *et al.*, 1993, DRAPER *et al.*, 1987). Observa-se uma zona elétron-densa formada por três cadeias de arabinose ligadas ao galactano e pela camada de peptideoglicano. Além disso, encontra-se a molécula de ácido micólico ligada às cadeias terminais da molécula de arabinose para formarem uma bicamada pseudo-lipídica. Observa-se, também, uma região elétron-transparente formada por regiões intercaladas de ácido micólico de mono-micolatos de trehalose e ácidos mico-serosólicos de dimico-cerosatos assim como os glicolipídios fenólicos (PGLs). Estas mesmas moléculas, juntamente com os monosídeos de fosfatidil-inositol e fosfolipídios são liberados da célula após sua síntese e formam uma região semelhante a uma cápsula. Além disso, a molécula de PGL é importante para o micro-organismo, pois confere especificidade imunológica, especialmente a PGL-1 (SCOLLARD *et al.*, 2006).

O micro-organismo não cresce em meios de cultura artificiais o que torna o diagnóstico etiológico da doença mais difícil de ser realizado. Porém, sabe-se que pode ser estocado em meio 7H12 a 33 °C e manter-se viável por várias semanas. O fato de que o micro-organismo não consegue crescer em meios artificiais dificulta, também, a detecção molecular do *M. leprae* (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Análises do metabolismo de *M. leprae* ainda são escassas, porém alguns trabalhos demonstraram caminhos catabólicos e anabólicos da bactéria necessários para sua sobrevivência dentro do hospedeiro (SCOLLARD *et al.*, 2006). Análises do genoma de *M. leprae* podem vir a elucidar algumas das questões relacionadas ao seu metabolismo, a suas características bioquímicas e a seu potencial patogênico. O genoma de *M. leprae* apresenta algumas características que o distingue de outra espécie de micobactéria de importância clínica, o *M. tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose. Seu genoma possui 3.3 Mb, menos do que as 4.4 Mb encontradas em *M. tuberculosis*, possui menor quantidade das bases G e C (*M. leprae*: 58%; *M. tuberculosis*: 66%) e de genes responsáveis pela codificação de proteínas. A maioria dos genes responsáveis pela síntese do polímero de peptideoglicano-arabino-galactano-micolato parecem estar presentes no genoma bacteriano, sendo as exceções os genes envolvidos na síntese de poli-prenil-fosfato, do mero-micolato e da glicosil-transferase

envolvidos na bio-síntese de moléculas envolvidas na síntese de componentes deste polímero. Como uma espécie, *M. leprae* possui pouca diversidade genética. De acordo com Monot *et al.* (2009), em pesquisa que comparou quatro genomas diferentes do micro-organismo, existe 1 SNP a cada 28.000 pb, enquanto que em *M. tuberculosis* este número é de 1 SNP a cada 200 pb (ACHTMAN, 2008).

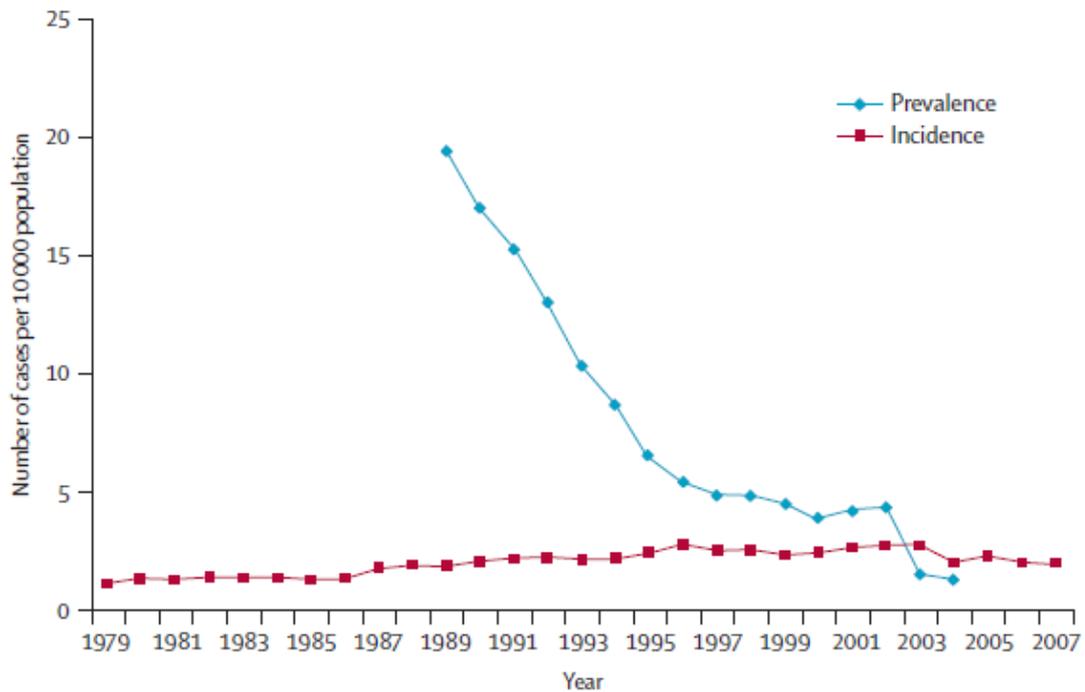
2.1. Epidemiologia da Hanseníase:

A incidência da hanseníase ainda continua alta com cerca de 220.000 novos casos relatados em 2010 (OMS, 2011). A prevalência vem sendo reduzida graças, em parte, devido ao tempo de duração do tratamento da doença. Além disso, a prevalência também é afetada por certos fatores operacionais, como pesquisa ativa de casos e integração entre os serviços de referência com serviços primários de saúde. De acordo com Scollard *et al.* (2006) cerca de 15 milhões de pessoas foram tratadas com a poliquimioterapia (PQT) ao redor no mundo. A doença é altamente incapacitante em sua forma mais grave e a sua eliminação é a meta da Organização Mundial de Saúde (OMS), que pleiteia tornar a prevalência mundial da doença em índices menores que 1/10.000 habitantes. O diagnóstico e tratamento precoces são algumas das formas de se controlar a doença (LOCKWOOD, 2002). A introdução da PQT e os estudos científicos que apontam a sua eficácia tornaram-se um marco no combate à doença.

A hanseníase permanece sendo um dos agravos de saúde pública de maior relevância em nosso país. O Programa Nacional de Controle da Hanseníase assume como objetivo de saúde pública o controle da doença (OMS, 2010) e privilegia, nesse aspecto, o acompanhamento epidemiológico por meio do coeficiente de detecção de casos novos por 100.000 habitantes. O quantitativo de novos casos confirmados da doença aumenta a cada ano (Figura 1). Segundo dados da OMS, o Brasil ocupa o primeiro lugar de prevalência mundial da doença por cada 100.000 habitantes e o segundo lugar mundial de casos novos confirmados, perdendo apenas para a Índia (OMS, 2010). No ano de 2010, 92,9% dos casos novos da hanseníase foram detectados em indivíduos maiores de 15 anos em nosso país, enquanto que 7,1% de casos novos da hanseníase foram detectados em menores de 15 anos.

No ano de 2010, a região Nordeste foi onde houve maior número de novos casos da doença e o estado de Pernambuco ocupou a 2ª posição em detecção de novos casos atrás apenas do Maranhão. O estado apresentou elevado coeficiente de detecção da doença (31,78/100.000 habitantes) e coeficiente de prevalência da doença (2,71/100.000 habitantes).

Figura 1: Incidência e prevalência da hanseníase no Brasil (Adaptado de RODRIGUES & LOCKWOOD, 2011).



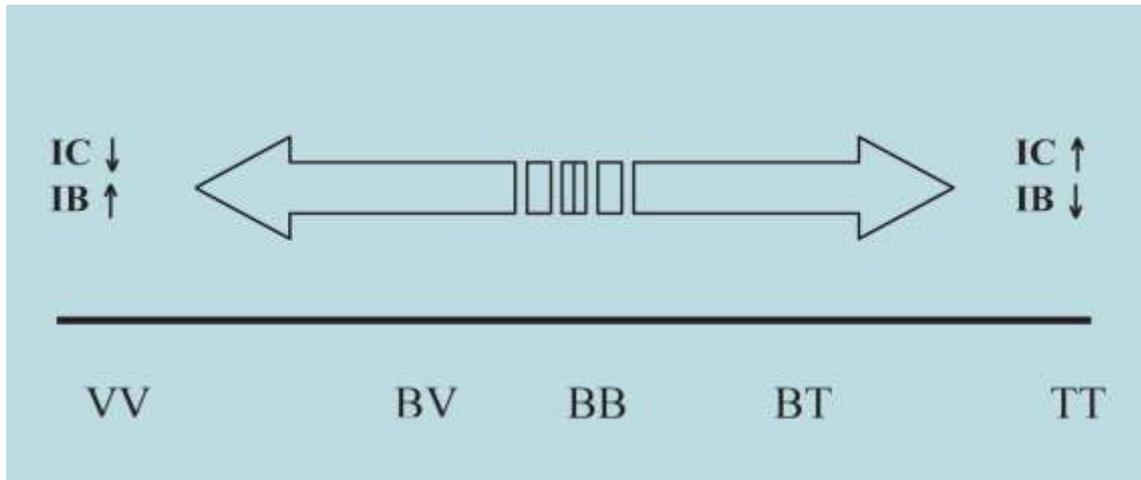
2.2. Classificação da Hanseníase:

Existem duas classificações da doença: a histopatológica, estabelecida de acordo com a lesão e a carga bacilifera do paciente, e a operacional, de acordo com a quantidade de lesões.

2.2.1. Classificação Histopatológica da Hanseníase:

A classificação clínica da hanseníase segue os critérios estabelecidos segundo Ridley e Jopling, em 1966, que se baseia no tipo de lesão e na carga bacilifera do paciente. Os portadores de hanseníase são divididos em Virchowianos polares (VV), tuberculóides polares (TT), dimorfos Virchowianos (DV), dimorfos tuberculóides (DT) e dimorfos dimorfos (DD) (Figura 2). Esta classificação leva em conta o índice baciloscópico, quantidade de bacilos encontrados, a imunidade celular do indivíduo acometido, além das características histopatológicas e clínicas do paciente. As formas mais resistentes ao bacilo apresentam menor índice baciloscópico e maior resposta da imunidade celular enquanto que as formas mais susceptíveis apresentam maior índice baciloscópico e menor resposta imune celular.

Figura 2: Representação da variação da resposta imunológica ao longo do espectro da classificação de Ridley & Jopling; a imunidade celular (IC) e inversamente proporcional ao índice baciloscópico (IB) VV – forma clínica Virchowiana; BV, BB, BT – forma clínica *borderline*; TT – forma clínica tuberculóide (MENDONÇA *et al.*, 2008).



Os indivíduos VV e os indivíduos TT representam as formas polares do espectro imunológico e de manifestação clínica e os indivíduos dimorfos correspondem àqueles que são imunologicamente instáveis, podendo ora apresentar características do pólo Virchowiano e ora do pólo tuberculóide, ou ainda localizarem-se no meio do espectro. Na atualidade se aceita a classificação de Madrid com a forma clínica indeterminada (I) e a proposta por Ridley e Jopling, com a subdivisão dos grupos interpolares em DV, DT e DD.

2.2.2. Classificação Operacional da Hanseníase:

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 1995) instituiu uma forma de classificação da doença mais simplificada que toma como critério o número de lesões apresentadas pelo paciente se dividindo em formas paucibacilares (até cinco lesões) e multibacilares (mais de cinco lesões). Os pacientes paucibacilares apresentam pequenas quantidades do micro-organismo, exibindo infecção localizada com predomínio de citocinas da resposta Th1 (IL-2, IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF). Os pacientes multibacilares apresentam lesões sistêmicas com predomínio das citocinas Th2 (IL-4, IL-10). De acordo com esta classificação, as formas VV, BV e BB estão incluídas nas formas multibacilares enquanto que as formas TT e BT estão incluídas nas formas paucibacilares. Esta classificação foi instituída para que se pudesse melhor

guiar a terapêutica em pacientes hansênicos dependendo do número de lesões encontradas no exame clínico.

2.3. Características Clínicas:

A hanseníase é uma doença infecciosa de caráter granulomatosa e crônica que afeta, principalmente, a pele e os nervos. Seu período de incubação é prolongado podendo durar, geralmente, de 2 a 7 anos, porém existem referências de períodos mais curtos (7 meses) e mais longos (10 anos). Os pacientes paucibacilares não são importantes na transmissão da doença devido à baixa carga bacilífera. Já os pacientes multibacilares constituem o grupo de contágio, sendo a fonte de infecção até o início do tratamento específico. O modo de transmissão da doença ainda não está conclusivamente comprovado, contudo acredita-se que a transmissão pessoa-pessoa ocorra através de gotículas provenientes da via nasal. A maioria dos indivíduos na forma tuberculóide não é infecciosa uma vez que os poucos bacilos presentes nestes indivíduos mantêm-se intracelulares. Porém, pacientes com as formas Virchowianas podem transmitir a doença através da mucosa nasal e da pele (JOB *et al.*, 2008), além de serem transmissíveis antes do início da terapia. Além disso, contatos destes pacientes apresentam risco maior de desenvolver a doença. O risco de contrair o micro-organismo está associado com a carga bacteriana do caso primário, o que indica que casos multibacilares podem transmitir mais facilmente o bacilo do que os casos paucibacilares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

De acordo com o Ministério da Saúde (2010), um caso de hanseníase é definido como a presença de um ou mais sinais cardinais (lesão e/ou área da pele com diminuição ou alteração de sensibilidade, acometimento do nervo periférico, com ou sem espessamento associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; baciloscopia de esfregaço intradérmica) e que necessita de tratamento poliquimioterápico (PQT).

A doença inicia-se por uma fase onde se observam lesões hipocrômicas com hipoestesia ou anestesia local. No exame histológico destas lesões, observam-se infiltrado inflamatório inespecífico que podem ou não atingir as terminações nervosas. Estas lesões podem curar espontaneamente ou progredir para uma das formas clínicas da doença. Suas características clínicas e imunopatológicas são determinadas de acordo com a resposta imune apresentada pelo hospedeiro e são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Características clínicas e histopatológicas (GOULART *et al.*, 2002) das formas tuberculóide e Virchowiana da hanseníase.

Formas Clínicas	Características Clínicas	Características Histopatológicas
Tuberculóide	<ul style="list-style-type: none"> - Lesões cutâneas e/ou neurais; - Ausência de bacilos; - Hipoastesia ou anestesia local; - Borda papulosa e infiltrada; - Lesões únicas ou em pequeno número. 	<ul style="list-style-type: none"> - Granuloma tuberculóide; - Células gigantes de Langhans e linfócitos; - Derme profunda até a derme papilar; - Camada basal da epiderme.
Virchowiana	<ul style="list-style-type: none"> - Lesões em tecidos cutâneos, nervos periféricos, etc.; - Pele: infiltração difusa, pápulas e nódulos eritemato-violáceas; - Lesões ricas em bacilos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Extenso infiltrado celular; - Células infectadas com bacilos; - Células com aspecto espumoso; - Vacúolos citoplasmáticos.

Uma das principais causas de morbidade na hanseníase é a neuropatia periférica que é responsável pelas deformidades e deficiências observadas em muitos pacientes hansênicos. Estas lesões são caracterizadas por serem infiltrados crônicos ou sub-agudos, compostos por células epitelióides ou macrófagos contendo grande quantidade de bacilos. O dano neural afeta fibras sensitivas, motoras e autônomas, o que explica a falta de sensibilidade nas lesões características encontradas na doença. Além disso, estas lesões também são encontradas em nervos mielinizados e não-mielinizados. Na forma tuberculóide, observam-se menor número de troncos nervosos afetados, embora possa haver lesões intensas e mais precoces causadas pela imunidade celular. Além disso, pode-se observar necrose caseosa nos granulomas e formação de abscessos e destruição total dos nervos. Na forma Virchowiana tem-se maior número de troncos nervosos afetados e dano neural lento e progressivo.

2.4. Resposta Imune:

A infecção por *M. leprae* induz intensa resposta imune nos indivíduos acometidos oferecendo, assim, um atrativo modelo para a investigação da regulação de respostas imunológicas frente às infecções (MODLIN, 2010). O *M. leprae* possui afinidade pelos macrófagos e pelas células dendríticas, particularmente na região dos nervos periféricos. Durante a evolução da doença são ativados mecanismos de imunidade inata e adaptativos que refletem na evolução da doença. As micobactérias apresentam em sua superfície estruturas de reconhecimento de padrões (PRR) que constituem na primeira detecção por parte do organismo hospedeiro frente à presença do *Mycobacterium leprae*. Estas moléculas de reconhecimento padrão são reconhecidas por receptores denominados de Toll-Like (TLRs), que demonstram serem primordiais para o reconhecimento de patógenos pelas células dendríticas e pelos macrófagos. Destes, parece que os heterodímeros TLR2-TLR1 e os homodímeros TLR2 e TLR4 são fundamentais no desenvolvimento da resposta imune inata frente às agressões provocadas por micobactérias. (BRIGHTBILL HD et al, 1999).

A ativação, particularmente do TLR2, induzem a uma resposta protetora, diretamente relacionada a secreção de IL-12/IL-23 e ativação dos macrófagos e células dendríticas. (KRUTZIK SR, TAN B et al, 2004).

As células dendríticas são fundamentais na ativação da resposta adaptativa das células T protetora contra patógenos intracelulares. Lesões virchowianas são caracterizadas por um déficit acentuado nas células dendríticas, tanto na derme quanto na epiderme, reduzindo significativamente o desenvolvimento da resposta imune mediada por células nestas lesões (SIELING PA, 1999). As células dendríticas promovem a ativação de células T virgens através da secreção de interleucina 12. (DEMANGEL C, BRITTON WJ, 2000).

2.4.1. Resposta Imune Inata:

Após a entrada do micro-organismo no hospedeiro, células do sistema imune reconhecem padrões moleculares microbianos através dos receptores de reconhecimento padrão, destacando-se os receptores TLR presentes em macrófagos e células dendríticas.

2.4.1.1. O Receptor *Toll-Like*:

A família do receptor TLR consiste de proteínas transmembrana tipo I altamente conservadas, com peso molecular variando de 90 a 115 kDa. Esta família de receptores possui 10 receptores que apresentam importância durante o reconhecimento de patógenos pela

resposta imune inata (Figura 3). Estes receptores possuem um domínio intracelular chamado de receptor *Toll* e Interleucina-1 (TIR) e um domínio extracelular com grande concentração do aminoácido leucina. Alguns tipos de TLR são do tipo transmembrana (por exemplo, TLR 1, TLR 2, TLR 4) enquanto que outros tipos estão localizados dentro das células (TLR 3, TLR 7, TLR 8, TLR 9). Acredita-se que a maioria dos TLR são homodímeros, porém outros, como o TLR 1/TLR 2 e o TLR 2/TLR 6, são heterodímeros. Este grupo de receptores reconhece diversas moléculas e permite que o sistema imune inato diferencie os diversos grupos de patógenos, o que leva a transdução adequada para o início de reações intracelulares. Por exemplo, os receptores TLR 1 e TLR 2 ligam-se a lipoproteínas bacterianas, enquanto que o receptor TLR 4 liga-se a lipopolissacarídeos. Após a ativação destes receptores, se observam várias reações dentro das células que levam a transcrição de genes responsáveis pela expressão de citocinas inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão endotelial, moléculas co-estimulatórias, entre outras moléculas importantes durante a resposta imune. Na hanseníase, a ativação de células é mediada através da ligação de regiões triacetiladas das lipoproteínas constituintes do micro-organismo. (CASANOVA *et al.*, 2011)

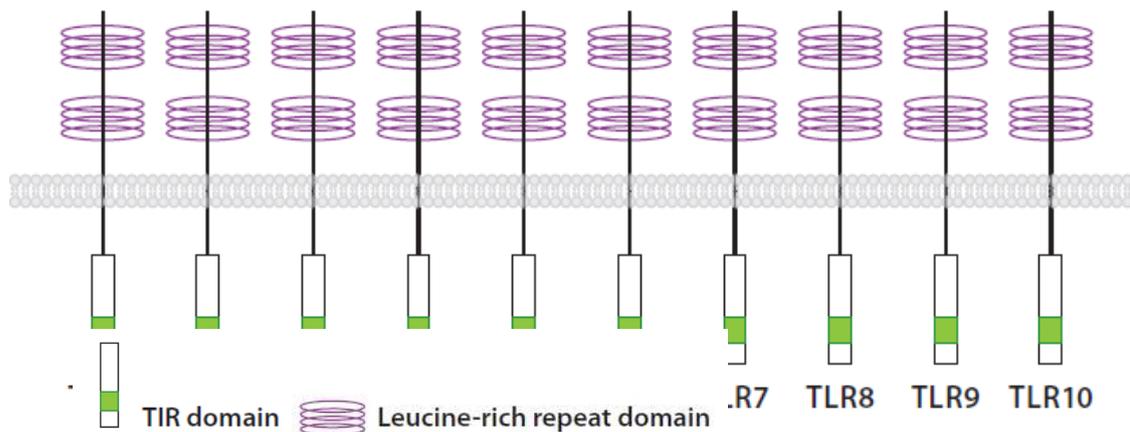


Figura 3: Esquema representativo da estrutura dos receptores *Toll-Like* (Adaptado de CASANOVA *et al.*, 2011)

2.4.1.2. Receptor *Toll-Like* 2:

O receptor TLR 2 reconhece diversos patógenos desde bactérias até vírus e fungos (AKIRA *et al.*, 2006). No caso da hanseníase, o heterodímero TLR 1/TLR 2 é ativado pelas lipoproteínas e pelas moléculas lipomanana e lipoarabinomanana (JIMENEZ-DALMARONI *et al.*, 2009) constituintes do bacilo. A interação entre moléculas do micro-organismo com a porção extracelular do receptor leva a uma cascata de reações que irão resultar na expressão de genes para quimiocinas e citocinas (AKIRA & TAKEDA, 2004).

Após a estimulação da molécula ligante, heterodímeros de TLR 2 iniciam o caminho de sinalização intra-celular dependente de MyD88. Essa sinalização inclui a translocação nuclear do fator B nuclear (NF- κ B) que modula a expressão gênica e produção de citocinas inflamatórias (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

A ativação deste receptor é de fundamental importância na eliminação do bacilo, uma vez que está relacionado com a resposta protetora através da secreção de IL-12, ativação de macrófagos e células dendríticas. Estas células apresentadoras de antígenos levam a ativação de linfócitos T através da secreção da IL-12. Em lesões encontradas na forma tuberculóide observa-se uma maior expressão dos receptores TLR 1 e TLR 2 se comparada com a forma Virchowiana (MODLIN, 2010).

Polimorfismos no receptor TLR 2 do tipo microsatélite e um SNP estão associados com a susceptibilidade ao desenvolvimento de diversas infecções, incluindo infecções por micobactérias (OGUS *et al.*, 2004; YIM *et al.*, 2006). Observou-se associação significativa entre polimorfismos do tipo micro-satélite de 290 bp e um SNP neste receptor com a ocorrência da reação hanseníca tipo I (BOCHUD *et al.*, 2008). Neste mesmo estudo, observou-se que outro micro-satélite de 288 bp era menos frequente em pacientes com a forma Virchowiana.

2.4.2. Resposta Imune Adaptativa:

A resposta imune celular é fundamental na resistência a infecção através de um rigoroso balanço entre a resposta de citocinas Th1, como IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-12 versus as citocinas Th2 como IL-4, IL-6 e IL-10. O predomínio de um tipo de resposta imune (celular ou humoral) determina o tipo de lesão que o paciente virá a apresentar. Após o reconhecimento do bacilo pelas células do sistema imune, a produção local de citocinas e quimiocinas regula o processo inflamatório e direciona o curso da imunidade adaptativa (resposta Th1 ou resposta Th2) em relação ao micro-organismo.

Aqueles que apresentam a forma tuberculóide apresentam vigorosa resposta Th1, o que leva a limitação da doença a poucas e bem definidas lesões na pele e em troncos nervosos (BRITTON, LOCKWOOD, 2004), com produção de Interferon- γ (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e linfotóxina- α que são secretados nas lesões, resultando em intensa atividade fagocítica. Estas quimiocinas auxiliam a formação do granuloma composto de macrófagos e linfócitos, onde se tem os linfócitos CD4+ dentro do granuloma e os linfócitos CD8+ na área externa do granuloma (MODLIN *et al.*, 1988, MODLIN *et al.*, 1983). A IL-12 induz a diferenciação para Th1 com conseqüente produção de IFN- γ . O IFN- γ tem sua ação sobre macrófagos, estimulando a fagocitose e ativando estas células levando a uma maior produção de TNF- α , que também ativam os macrófagos aumentando sua atividade microbicida (MURRAY HW, *et al.*, 1985; MADAN, N. K. *et al.* 2011).

Nos pacientes que apresentam a forma Virchowiana, observa-se deficiente resposta imune celular específica contra o bacilo o que leva a maior proliferação do micro-organismo, presença de numerosas lesões e infiltrações extensas na pele e nervos (BRITTON *et al.*, 2004). Foi demonstrado que TNF- α está presente em soro de paciente com a forma tuberculóide e ausente no soro de pacientes com a forma Virchowiana, indicando que o baixo índice de baciloscopia nos pacientes com a forma tuberculóide poderia estar relacionado à presença dessa citocina (MADAN, N. K. *et al.* 2011).

Vários trabalhos apontam IFN- γ e TNF- α como tendo importante papel na imunoproteção. IFN- γ ativa mecanismos antimicrobianos, induzindo produção de NO sintase induzível, levando a produção de óxido nítrico, um importante microbicida (MOUBASHER AD *et al.*, 1998; BELGAUMKAR VA *et al.*, 2007; SARNO *et al.*, 1991).

Carl Nathan e colaboradores demonstraram a redução do *M. Leprae* nas lesões de paciente Virchowiano com a injeção de IFN- γ recombinante, observando sua ação em induzir à infiltração macrofágica e produção de peróxido de hidrogênio (NATHAN *et al.*, 1983).

Madan e colaboradores (2011) demonstraram que pacientes paucibacilares produzem níveis mais elevados de IFN- γ e TNF- α em comparação com multibacilares, resultados similares aos encontrados por outros autores (Belgaumkar *et al.*, 2007, Sarno *et al.*, 1997).

Na forma Virchowiana observa-se a resposta do tipo Th2 com produção, predominantemente, de IL-4, IL-5 e IL-10, além de pouca formação de granuloma e presença de complexos de anticorpos. (MODLIN *et al.*, 1988, MODLIN *et al.*, 1983).

Sabe-se que a produção de IL-4 diminui a expressão dos receptores TLR 2 nos monócitos e que a produção de IL-10 inibe a produção de IL-12. A produção desta citocina

suprime a produção de mediadores inflamatórios contribuindo para direcionar a um padrão Th2.

2.5. Diagnóstico e Tratamento da Hanseníase:

O diagnóstico da hanseníase é baseado em dados clínicos e em informações epidemiológicas. Realiza-se análise do histórico do paciente e das suas condições de vida, exames dermatológicos e neurológicos.

O tratamento instituído pela OMS consiste na utilização uma multi-droga terapia específica com objetivo de destruir e evitar o crescimento do bacilo e levar a cura do paciente. Ao se iniciar o tratamento, o indivíduo infectado não consegue transmitir a doença. Utilizam-se os seguintes antimicrobianos em administração associada: rifampicina, dapsona e clofazimina. O tratamento varia de acordo com a classificação operacional do paciente (figuras 4 e 5).

Figura 4: Esquemas terapêuticos utilizados para Paucibacilar: 6 cartelas (Fonte: MS, 2010)

Adulto	Rifampicina (RFM): dose mensal de 600mg (2 cápsulas de 300mg), com administração supervisionada
	Dapsona (DDS): dose mensal de 100mg, supervisionada, e dose diária de 100mg, autoadministrada
Criança	Rifampicina (RFM): dose mensal de 450mg (1 cápsula de 150mg e 1 cápsula de 300mg), com administração supervisionada
	Dapsona (DDS): dose mensal de 50mg, supervisionada, e dose diária de 50mg, autoadministrada
Duração: 6 doses.	
Seguimento dos casos: comparecimento mensal para dose supervisionada.	
Critério de alta: o tratamento estará concluído com 6 doses supervisionadas, em até 9 meses. Na 6ª dose, os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, avaliação neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e receber alta por cura.	

Figura 5: Esquemas terapêuticos utilizados para Multibacilar: 12 cartelas (Fonte: MS, 2010)

Adulto	Rifampicina (RFM): dose mensal de 600mg (2 cápsulas de 300mg), com administração supervisionada
	Dapsona (DDS): dose mensal de 100mg, supervisionada, e uma dose diária de 100mg, autoadministrada
	Clofazimina (CFZ): dose mensal de 300mg (3 cápsulas de 100mg), com administração supervisionada, e uma dose diária de 50mg, autoadministrada
Criança	Rifampicina (RFM): dose mensal de 450mg (1 cápsula de 150mg e 1 cápsula de 300 mg), com administração supervisionada
	Dapsona (DDS): dose mensal de 50mg, supervisionada, e uma dose diária de 50mg, autoadministrada
Clofazimina (CFZ): dose mensal de 150mg (3 cápsulas de 50mg), com administração supervisionada, e uma dose de 50mg, autoadministrada, em dias alternados	
Duração: 12 doses.	
Seguimento dos casos: comparecimento mensal para dose supervisionada.	
Critério de alta: o tratamento estará concluído com 12 doses supervisionadas, em até 18 meses. Na 12ª dose, os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, avaliação neurológica simplificada e do grau de incapacidade física, e receber alta por cura.	
Os pacientes MB que não apresentarem melhora clínica, ao final do tratamento preconizado de 12 doses (cartelas), deverão ser encaminhados para avaliação nas unidades de maior complexidade, para verificar a necessidade de um segundo ciclo de tratamento, com 12 doses.	

2.6. Polimorfismos Genéticos:

Polimorfismos genéticos são encontrados quando, em certos *loci*, se observam variações da sequência do DNA. Já se sabe que certos polimorfismos em certos genes, como aqueles nos genes para TLR, são responsáveis por alterações na resposta do hospedeiro contra grande variedade de infecções.

Polimorfismos nos genes TLR 2 e TLR 4 estão correlacionados a um aumento de susceptibilidade a infecções bacterianas. Há na literatura limitada informação sobre variantes alélicas dos genes humanos de TLR. As mutações nos resíduos 299 e 399 foram mostradas como sendo importantes na baixa resposta a endotoxinas em humanos, enquanto mutações em TLR 2 (Arg753Gln) é associada ao choque séptico provocado por bactérias Gram positivas. Este mesmo polimorfismo foi associado em pacientes hansênicos com a forma Virchowiana, correlacionando este polimorfismo a maior susceptibilidade a infecção pela micobactéria. (BOCHUD, *et. al.* 2003).

O gene para o receptor TLR 2 localiza-se no cromossomo 4q32 e o polimorfismo em TLR 2 (-196 a -174 del) afeta o gene para este receptor através da alteração da região promotora deste gene. Neste polimorfismo observa-se a deleção de 22 pb indo da posição 196 até a posição 174 do gene para TLR 2. Poucos são os estudos onde se utilizou a pesquisa deste polimorfismo para determinação do seu papel frente a infecções. Chen *et al.* (2010), determinaram que paciente com o genótipo Del/Del estavam menos propensos a desenvolver a sintomatologia sistêmica na tuberculose

3. Objetivos

3. Objetivos:

3.1. Objetivo Geral:

- Determinar a frequência dos genótipos encontrados nos polimorfismos para TLR 2 (-196 a -174 del) e as dosagens de IL-4 e IL-10 nos pacientes hansênicos, de Centros de Referências do estado de Pernambuco, e nos controles sadios.

3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar a frequência dos genótipos Ins/Ins, Ins/Del e Del/Del nos pacientes hansênicos;
- Avaliar a associação entre o desenvolvimento da doença e de suas formas clínicas de acordo com os genótipos TLR 2 (-196 a -174 del).
- Determinar a dosagem de IL-4 e IL-10 em pacientes multibacilares e paucibacilares e em controles sadios, estimulados com fitohemaglutinina e bacilo Calmette-Guérin.
- Determinar a dosagem de IL-4 e IL-10 em pacientes multibacilares e paucibacilares, antes e após o tratamento poliquimioterápico, estimulados com fitohemaglutinina e bacilo Calmette-Guérin.

4. Hipótesis

4.Hipóteses:

- Indivíduos com polimorfismo no gene para o receptor Toll-like 2 (-196 a -174 del) apresentam maior risco de desenvolver a hanseníase.
- O polimorfismo no gene para o receptor Toll-like 2 (-196 a -174 del) está relacionado a maior susceptibilidade e risco de desenvolver a forma multibacilar da doença.
- As citocinas IL-4 e IL-10 estão relacionadas com a maior susceptibilidade dos pacientes hanseníacos e desenvolvimento de formas multibacilares.

5. Materiais e Métodos

5. Materiais e Métodos:

5.1. População de Estudo e Desenho de Estudo:

Trata-se de um estudo do tipo descritivo, onde foi determinada as frequências dos 3 diferentes genótipos para o polimorfismo em TLR2 (Ins/Ins; Ins/Del; Del/Del), e um estudo observacional, onde os níveis de duas citocinas da resposta Th2, IL-4 e IL-10, serão determinados em pacientes antes e após o tratamento, além dos contatos, estimulados com fitohemaglutinina (PHA) e Bacilo Calmette-Guérin (BCG) em 30 indivíduos (10 multibacilares, 10 paucibacilares e 10 controles). Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa assinaram o TCLE. Esta população foi analisada no período de janeiro de 2012 a julho de 2013.

5.2. Critérios de inclusão:

- Casos: Doentes de hanseníase em qualquer forma de classificação clínica espectral (tuberculóide e suas variantes, Virchowiana e suas variantes, paucibacilares, multibacilares);
- Controles: Contatos intradomiciliares saudáveis com histórico familiar positivo de casos de hanseníase, previamente examinados para procura dos sinais cardinais da doença.

5.3. Critérios de Exclusão:

- Casos: Pacientes que estejam apresentando quaisquer doenças infecciosas ou de natureza auto-imune no momento da coleta sanguínea.
- Controles: Pacientes sem histórico de contato com doentes de hanseníase que não sejam portadores

5.4. Coleta Sanguínea:

Coletou-se 4 mL de sangue periférico mediante punção de veia periférica cefálica ou basílica em prega flexural de um dos antebraços utilizando-se suporte de coleta para tubos Vacutainer®.

5.5. Extração de DNA:

A extração de DNA de leucócitos periféricos a partir de sangue total foi realizada através do uso de kit de extração comercial PROMEGA (Figura 6).

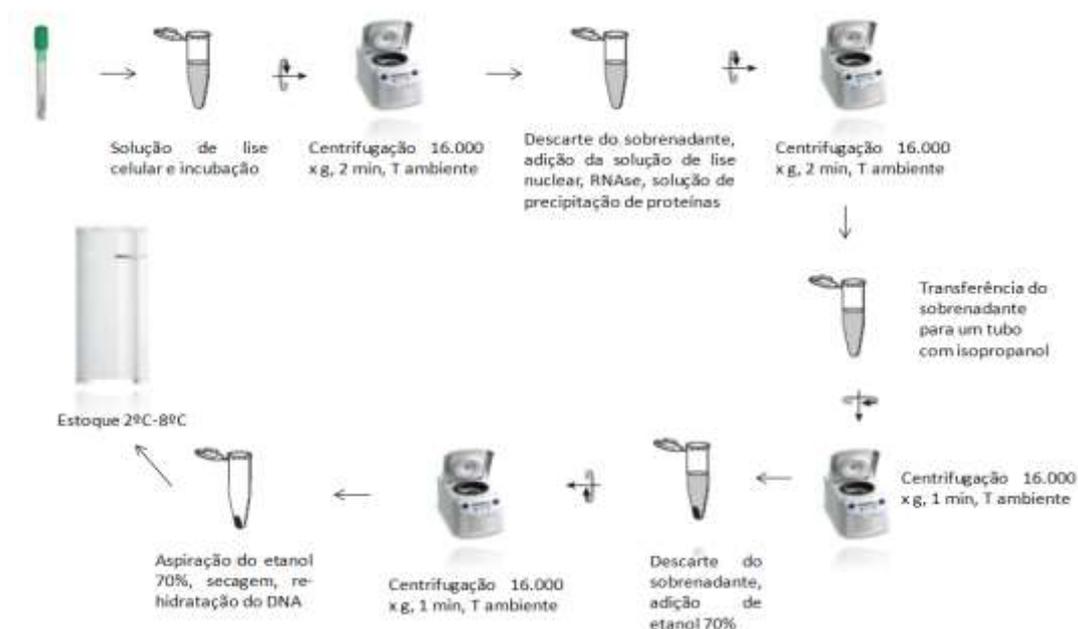


Figura 6: Esquema de extração de DNA genômico.

Foram adicionados a um tubo com 300 μL de sangue periférico 900 μL da solução de lise celular que foi incubada a temperatura ambiente durante um intervalo de tempo de 10 minutos. Em seguida, haverá centrifugação da solução a 16.000 x g por 3 minutos a temperatura ambiente. As duas etapas anteriores serão repetidas até que haja completa lise das células vermelhas. O sobrenadante será desprezado para, então, agitar-se o material vigorosamente durante 10 a 15s para que haja a re-suspensão das células brancas e, em seguida, adicionar 300 μL da solução de lise nuclear para, então, se incubar a solução a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h. Acrescenta-se a enzima RNase (1,5 μL), misturando a solução por inversão e incubando a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Após esta etapa, adiciona-se a solução de precipitação de proteínas (1 mL) para posterior agitação no vórtex (10-15s) para levar a centrifugação a 16.000 x g por 3 minutos. Transfere-se o sobrenadante para um tubo estéril contendo 300 μL de isopropanol a temperatura ambiente, misturando esta nova solução e, em seguida, centrifugá-la a 16.000 x g por 3 minutos a temperatura ambiente, onde se observará a formação de um *pellet* branco. O sobrenadante deve ser decantado e deve-se adicionar 100 μL de etanol 70% a temperatura ambiente e realizar nova centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. Aspira-se o etanol 70%, cuidadosamente, e inverte-se o tubo em papel absorvente, deixando secar ao ar livre por 10-15 minutos. Adiciona-se 100 μL da solução de re-hidratação de DNA

ao tubo que deve ser incubado a 65 °C por 1 hora, misturando a solução periodicamente para que se possa estocar a 2°C-8°C.

5.6. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):

A PCR foi utilizada para o estudo do polimorfismo TLR 2 (-196 a -174 del) no grupo de pacientes com hanseníase e no e no grupo de indivíduos considerados como controles. O primer utilizado foi o seguinte: F: 5'-CACGGAGGCAGCGAGAAA-3', R: 5'-CTGGGCCGTGCAAAGAAG-3'(TAHARA *et al.*, 2007).

Após a extração do DNA genômico, foi preparada uma reação com volume final de 12,5 µL com 1 µL do DNA e 1 µL dos primers Forward e Reverse (10 pmol) e 6,5 µL do PCR Master Mix (MBI Fermentas, EUA) contendo a enzima *Taq* DNA Polimerase, os dNTPS, o MgCl₂ e as soluções tampões.

As condições da PCR para TLR 2 (-196 a -174 del) foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos, extensão final 72°C por 7 minutos. Os produtos do PCR serão analisados em gel de agarose 1,5% a 80 mV por 3 horas.

A banda de 286 pb será correspondente ao genótipo Ins/Ins, a banda de 264 pb será correspondente ao genótipo Del/Del e as bandas 286 pb e as bandas de 264 pb serão correspondente ao genótipo Ins/Del (figura 7).

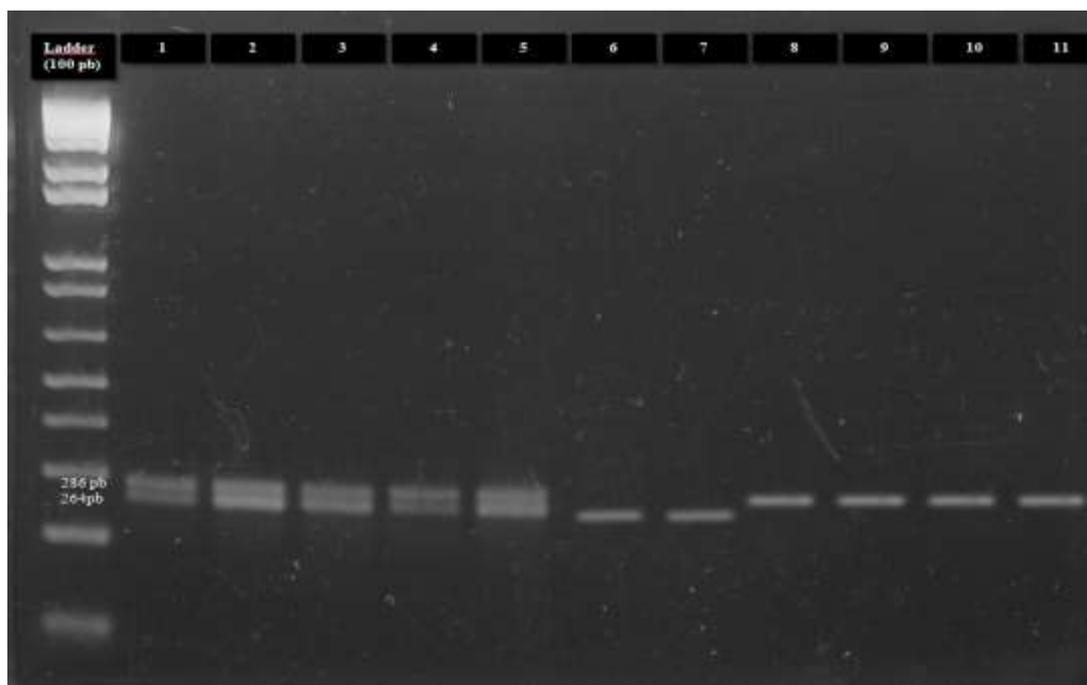


Figura 7: Gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, ilustrando os padrões eletroforéticos encontrados na PCR para TLR 2 (-196 a -174 del). Os poços 1 a 5 correspondem ao genótipo Ins/Del (bandas de 286 pb e 264 pb), as bandas 6 e 7 correspondem ao genótipo Del/Del (banda de 264 pb) e as bandas 8 a 11 correspondem ao genótipo Ins/Ins (banda de 286 pb).

5.7. Cultura celular de sangue total para dosagem de IL-4 e IL-10:

Incubaram-se tubos contendo 500µL de sangue total + 1 mL de meio RPMI (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) suplementado com HEPES 1% (1M), 2-mercaptoetanol 0,5% (0,01M), L-glutamina 1% (200mM), antibiótico gentamicina 50mg/L e soro fetal bovino a 10%, sob estímulo de fitohemaglutinina (PHA) (10µg/mL) e Bacilo Calmette-Guérin (BCG) (1µg/mL), que possui padrões antigênicos semelhantes aqueles encontrados em *M. leprae*, por 24 horas para a posterior coleta dos sobrenadantes e dosagem de citocinas.

5.8. Dosagem de citocinas:

Placas para realização do ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (2595, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IL4, para detecção de IL-4, ou anti IL10, para detecção de IL-10, diluídos em tampão carbonato (pH 9,6) sendo distribuídos 50 µl do sobrenadante em cada poço da placa e posterior incubação à temperatura de 4°C por 18 h. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBST (Tampão salina

fosfato com 0,05% de Tween 20) e posteriormente bloqueadas com 80 µl de uma solução de PBST-SBF a 10 % (WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro/Brasil) por 1 hora.

Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBST e, em seguida, adicionados 50 µL dos respectivos padrões recombinantes de citocinas humanas: rIL-10 e rIL-4 diluídos nas concentrações indicadas pelo fabricante ou amostras dos sobrenadantes em duplicata de cada poço da cultura de células. Os padrões foram distribuídos no volume de 100 µL nos primeiros poços nas concentrações iniciais de 10 ng/mL para rIL-10 e de 10 ng/mL para rIL-4 e feitas diluições seriadas até as concentrações de 0,3125 ng/mL e as amostras distribuídas sem diluição. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas. Passado este período, as placas foram lavadas e adicionou-se 50 µL dos anticorpos biotinizados anti-IL-4 e anti-IL-10. Após esta incubação, cada placa foi novamente lavada três vezes com PBST e o conjugado enzimático (estreptoavidina marcada com peroxidase, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) diluído 1:8000 em PBS contendo BSA 0,1% (Tampão Salina Fosfato) e incubadas à temperatura ambiente por uma hora. As placas foram lavadas e a reação revelada pela adição do substrato contendo H₂O₂ e o cromógeno ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvidos em tampão citrato 0,1 M e fosfato de sódio 0,2 M pH = 5,5. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura realizada em leitor de ELISA (BIORAD), em comprimento de onda de 405 nm. As concentrações de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas a partir de curvas-padrão. Os resultados foram apresentados como as médias aritméticas ± desvio padrão (DP).

5.9. Análise Estatística:

Os valores do OR e os níveis de significância estatística ($p < 0.05$) foram calculados através do teste de Fisher realizado pelo software STATA, 12.0.

Os resultados do teste para os níveis de IL-4 e IL-10 foram considerados estatisticamente significantes dos resultados que apresentarem $p < 0.05$. Foi utilizada a análise de variância one-way ANOVA e os níveis de significância estatística ($p < 0.05$) foram calculados através do teste de Kruskal-Wallis. Realizados através do software GraphPad Prism 5.

**6. Identificação do Polimorfismo no Gene para o Receptor
Toll-like 2 (-196 a -174 del) e Dosagem de Citocinas Th2
em Pacientes Hansênicos**

Introdução

A hanseníase é uma doença cujas manifestações dependem da resposta imune do hospedeiro. Pacientes que apresentam as formas mais brandas da doença apresentam forte resposta imune celular com lesões bem localizadas, apresentando nenhum ou muito poucos bacilos dentro de granulomas, onde se observa a expressão das citocinas da resposta Th1. Na forma tuberculóide e suas variantes, observa-se um padrão Th1, onde se observa a produção de citocinas pró-inflamatórias e eliminação do bacilo. Na forma Virchowiana e suas variantes, observa-se a produção de citocinas do padrão Th2 com a IL-4 e a IL-10 (MAEDA *et al.* 2003). Estas citocinas são responsáveis pela supressão da resposta dos macrófagos. A IL-4 diminui a expressão do TLR 2 e estimula a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B, enquanto que a IL-10 bloqueia a ativação de macrófagos. A infecção das células dendríticas pelo bacilo é facilitada pela estimulação da IL-4 que leva a expressão do CD209, aumentando os danos nestas células e levando a perda de sensibilidade (SHARMA *et al.*, 1998).

Os receptores *Toll-Like* (TLR) são importantes elementos do sistema imune inato no processo de iniciação do processo de inflamação contra diversos patógenos, incluindo *Mycobacterium leprae*. A resistência à hanseníase está associada ao desenvolvimento da resposta imune inata em associação com a baixa virulência do *Mycobacterium leprae*. As lipoproteínas constituintes da parede celular e os glicolípidios fenólicos (SCOLLARD *et al.*, 2006), além de reconhecerem a lipoarabinomana presente na estrutura do micro-organismo (CHANG, 2010) encontrados em *Mycobacterium leprae* ativam os *Toll like receptors* (TLRs), receptores encontrados em diversas células do sistema imunológico que são responsáveis pelo reconhecimento de moléculas constituintes da micobactéria. Estes receptores são proteínas transmembrana tipo 1 cuja porção extracelular, responsável pelo reconhecimento de diversas estruturas microbianas, é formada por estruturas ricas em leucina (CASANOVA *et al.*, 2011). Os genes para TLR constituem importantes marcadores na questão do desenvolvimento e evolução da doença. O gene para TLR 2 está localizado no cromossomo 4q32 e é composto por 2 exóns não-codificadores e 1 éxon codificador (HAEHNEL *et al.*, 2002). No caso da hanseníase, o heterodímero TLR 1/TLR 2 é ativado pelas lipoproteínas e pelas moléculas lipomanana e lipoarabinomanana (JIMENEZ-DALMARONI *et al.*, 2009) constituintes do bacilo. A interação entre moléculas do micro-organismo com a porção extracelular do receptor leva a uma cascata de reações que irão resultar na expressão de genes para quimiocinas e citocinas (AKIRA & TAKEDA, 2004). O receptor é expresso, preferencialmente em macrófagos, células mielóides e células epiteliais, onde há o reconhecimento destas substâncias

a lipoarabinomana presente na estrutura do micro-organismo (CHANG, 2010) e leva a ativação de um dos polos da resposta imune para o Th1 ou Th2 (SOUZA, 1997), daí a importância na ativação deste receptor para a eliminação do bacilo. Kang e colaboradores (2004) demonstraram que pacientes com mutação em TLR2 (Arg677Trp) diminuem significativamente a produção de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α por células PBMC de pacientes hansênicos estimulados com *M. leprae* quando comparados com células de indivíduos sem a mutação aumentam a produção de IL-10.

O polimorfismo em TLR 2 (-196 a -174 del) afeta o gene para este receptor através da alteração da região promotora deste gene. Neste polimorfismo observa-se a deleção de 22 pb indo da posição 196 até a posição 174 do gene para TLR 2. Foi determinado que este polimorfismo está envolvido com a prevenção de desenvolvimento certos sintomas (ex. febre) na tuberculose (CHEN *et al.*, 2010), a presença do alelo del está relacionada com o risco de pacientes portadores do vírus da hepatite C desenvolverem carcinoma hepatocelular (NISCHALKE *et al.*, 2011).

Nossa pesquisa tem como objetivo a identificação do polimorfismo em TLR 2 (-196 a -174 del) em pacientes hansênicos e contatos intradomiciliares sadios e sua associação com o desenvolvimento das formas paucibacilares e multibacilares da doença. Além disso, foram realizadas as dosagens das citocinas Th2, IL-4 e IL-10, nos grupos paucibacilares, multibacilares e contatos intradomiciliares saudáveis para comparação entre a produção destas citocinas em cada um destes grupos.

Materiais e Métodos

População de Estudo

O presente estudo classifica-se como um caso-controle. Para a análise genética, foram selecionados 63 indivíduos, destes 49 pacientes hansênicos e 14 controles intradomiciliares sadios, no período de junho de 2012 a junho de 2013. Para a análise das citocinas, foram selecionados 30 indivíduos, 10 paucibacilares, 10 multibacilares e 10 controles sadios. Foram coletados 4 mL de sangue periférico de pacientes hansênicos e de controles sem hanseníase. Todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 01057112.6.0000.5208).

Extração de DNA

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos com heparina. DNA genômico foi extraído utilizando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA).

Genotipagem do polimorfismo no gene TLR 2 (-196 to -174 del)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada na avaliação do polimorfismo TLR 2 (-196 to -174 del) nos casos e controles sadios. A sequência dos primers para a PCR TLR 2 (-196 to -174 del) foram as seguintes: F: 5'-CACGGAGGCAGCGAGAAA-3', R: 5'-CTGGGCCCGTGCAAAGAAG-3' (TAHARA *et al.*, 2007).

O volume total da reação foi de 12,5 µL com 1 µL para ambos os primers Forward e Reverse, 6,5 µL do PCR Master Mix (PROMEGA), 3 µL de água livre de nuclease (Mili-Q), 1 µL da amostra de DNA genômico. As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial: 95 °C for 5 min; 35 ciclos de: 95 °C por 30 s (desnaturação), 60 °C por 40 s (anelamento), e 72 °C por 40 s (extensão); Extensão final: 72 °C for 7 min.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% corado pelo brometo de etídio. A banda de 286 pb corresponde ao genótipo homozigoto TLR 2 Ins/Ins, a banda de 264 pb corresponde ao genótipo homozigoto TLR 2 Del/Del e as banda de 286pb e 264 pb correspondem ao genótipo heterozigoto TLR 2 Ins/Del (Figura 1).

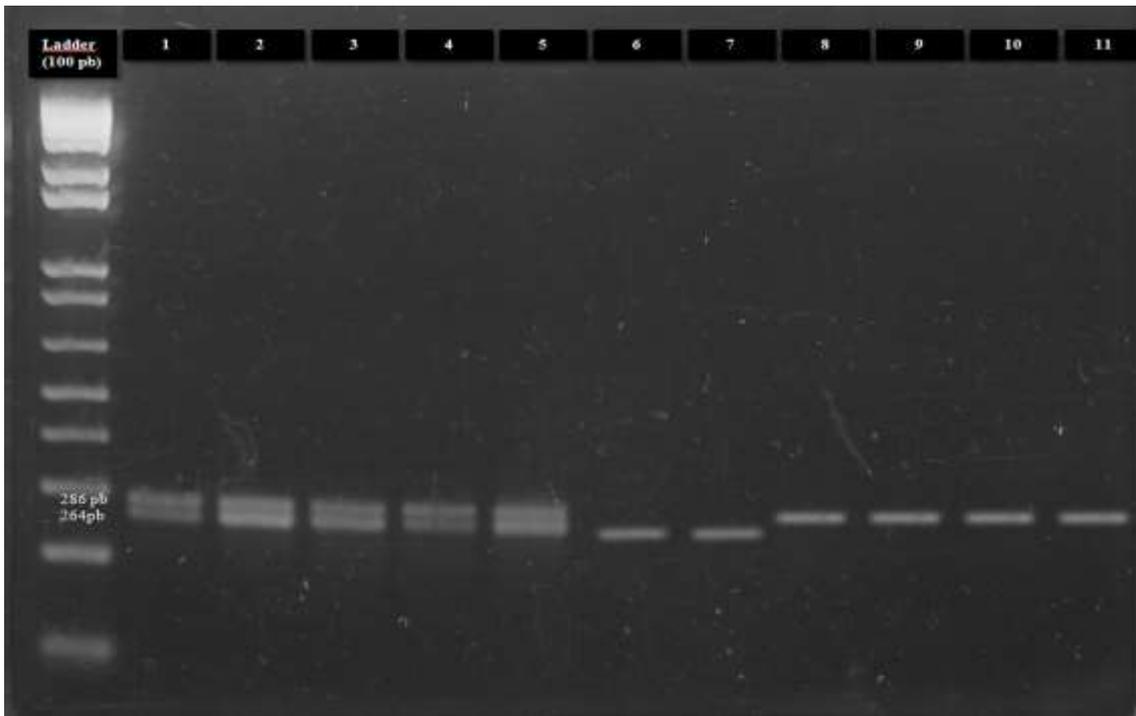


Figura 1: Gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio, ilustrando os padrões eletroforéticos encontrados na PCR para TLR 2 (-196 a -174 del). Os poços 1 a 5 correspondem ao genótipo Ins/Del (bandas de 286 pb e 264 pb), as bandas 6 e 7 correspondem ao genótipo Del/Del (banda de 264 pb) e as bandas 8 a 11 correspondem ao genótipo Ins/Ins (banda de 286 pb).

Cultura Celular:

Incubaram-se tubos contendo 500 μ L de sangue total + 1 mL de meio RPMI (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) suplementado com HEPES 1% (1M), 2-mercaptoetanol 0,5% (0,01M), L-glutamina 1% (200mM), antibiótico gentamicina 50mg/L e soro fetal bovino a 10%, sob estímulo de fitohemaglutinina (PHA) (10 μ g/mL) e Bacilo Calmette-Guérin (BCG) (1 μ g/mL) por 24 horas para a posterior coleta dos sobrenadantes e dosagem de citocinas.

Dosagem de citocinas:

Placas para realização do ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (2595, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IL4, para detecção de IL-4, ou anti IL-10, para detecção de IL-10, diluídos em tampão carbonato (pH 9,6) sendo distribuídos 50 μ l do sobrenadante em cada poço da placa e posterior incubação à temperatura de 4°C por 18 h. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBST (Tampão salina fosfato com 0,05% de Tween 20) e posteriormente bloqueadas com 80 μ l de uma solução de PBST-SBF a 10% (WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro/Brasil) por 1 hora.

Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBST e, em seguida, adicionados 50 μ L dos respectivos padrões recombinantes de citocinas humanas: rIL-10 e rIL-4 diluídos nas concentrações indicadas pelo fabricante ou amostras dos sobrenadantes em

duplicata de cada poço da cultura de células. Os padrões foram distribuídos no volume de 100 µL nos primeiros poços nas concentrações iniciais de 10 ng/mL para rIL-10 e de 10 ng/mL para rIL-4 e feitas diluições seriadas até as concentrações de 0,3125 ng/mL e as amostras distribuídas sem diluição. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas. Passado este período, as placas foram lavadas e adicionou-se 50 µL dos anticorpos biotinizados anti-IL-4 e anti-IL-10. Após esta incubação, cada placa foi novamente lavada três vezes com PBST e o conjugado enzimático (estreptoavidina marcada com peroxidase, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) diluído 1:8000 em PBS contendo BSA 0,1% (Tampão Salina Fosfato) e incubadas à temperatura ambiente por uma hora. As placas foram lavadas e a reação revelada pela adição do substrato contendo H₂O₂ e o cromógeno ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvidos em tampão citrato 0,1 M e fosfato de sódio 0,2 M pH = 5,5. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura realizada em leitor de ELISA (BIORAD), em comprimento de onda de 405 nm. As concentrações de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas a partir de curvas-padrão. Os resultados foram apresentados como as médias aritméticas ± desvio padrão (DP).

Análise Estatística:

Os valores do OR e os níveis de significância estatística ($p < 0.05$) foram calculados através do teste de Fisher realizado pelo software STATA, 12.0.

Os resultados do teste para os níveis de IL-4 e IL-10 foram considerados significativamente diferentes os resultados que apresentarem $p < 0.05$. Foi utilizada a análise de variância one-way ANOVA e os níveis de significância estatística ($p < 0.05$) foram calculados através dos testes de Kruskal-Wallis. Realizados através do software GraphPad Prism 5.

Resultados e Discussão

Características Clínicas

Foram analisados 63 indivíduos, os 49 casos possuíam média de idade de 42,3 anos, ±15,7 anos, os 14 controles saudáveis apresentaram média de idade de 51 anos ±11,9 anos. A maior frequência de casos ocorreu na faixa etária entre 40 e 60 anos. Dos 42 casos, 79,5% foram classificados como multibacilares e 20,5% como paucibacilares. De acordo com o Ministério da Saúde, no ano 2012, de todos os casos de hanseníase no estado de Pernambuco, 53% foram classificados como multibacilares.

Genotipagem TLR 2 (-196 a -174 del)

As frequências dos genótipos para TLR 2 (-196 a -174 del) estão apresentadas na tabela 2.

Genótipo	Casos (%)	Controle (%)
Ins/Ins	34 (67,3%)	10 (71,4%)
Ins/Del	12 (24,5%)	2 (14,3%)
Del/Del	4 (8,2%)	2 (14,3%)
Total	49	14

Tabela 2: Frequência gênica dos genótipos para TLR 2 (-196 a -174 del)

O genótipo Ins/Del foi relacionado com o risco de se desenvolver a hanseníase (OR=2,64, IC_{95%}: 0,48-26,89), porém não houve significância estatística (p=0,19). O genótipo Del/Del foi associado com o efeito de proteção no desenvolvimento da hanseníase (OR=0,58, IC_{95%} 0,07-7,48), porém não houve significância estatística (p= 0,44). Quando analisados ambos os genótipos em relação a forma paucibacilar Ins/Del (OR= 0,68; IC_{95%} : 0,14-3,85; p: 0,42); Del/Del (OR= 0,31, IC_{95%} : 0,01-0,38; p: 0,38), ambos apresentaram efeito de proteção em relação a forma paucibacilar e ambos os genótipos Ins/Del (OR= 1,45; IC_{95%}; 0,25-6,95; p: 0,38) e Del/Del (OR= 3,2; IC_{95%}; 0,04-57,91, p: 0,48) apresentaram o risco de desenvolver a forma multibacilar.

Dado o papel de reconhecimento do TLR 2 durante a infecção da hanseníase, onde haverá a formação posterior de uma resposta Th1 com finalidade de uma eliminação do bacilo através da produção de citocinas como o IFN- γ (MARCENARO *et al.*, 2008), o fato de termos encontrados a maioria dos paucibacilares apresentando o genótipo homozigoto normal (Ins/Ins) não vem como surpresa. Observamos concordância com outras pesquisas no quesito da pequena frequência do genótipo Del/Del.. Quando comparamos os pacientes com as formas paucibacilares e multibacilares observamos que os genótipos Ins/Del e Del/Del são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da forma multibacilar. Normalmente, a ligação do receptor TLR 2 com componentes celulares do patógeno leva ao início da transcrição de genes para citocinas da resposta Th1 (IFN- γ e a IL-17) responsável por uma rápida e eficaz resposta imune em relação ao micro-organismo, observada nas formas paucibacilares. O heterozigoto (Ins/Del) e o homozigoto selvagem (Del/Del) estão associados com diminuição da redução na atividade transcricional dos genes da resposta imune Th1 para o

patógeno (NOGUCHI *et al.*, 2004), comumente observado nas formas multibacilares, onde se melhor observa o caráter crônico da doença, além da produção de citocinas do padrão Th2.

Kang e colaboradores (2004) avaliando a mutação Arg677Trp em TLR 2 de pacientes hansênicos observou uma frequência de mutação em 22% dos indivíduos com a forma virchowiana e não foi encontrado nos pacientes com a forma tuberculóide e nem em indivíduos saudáveis. Estes autores observaram que os pacientes com esta mutação produziam níveis mais elevados de IL-10 e menor produção de IL-12 e TNF- α . O TLR 2 responde a vários componentes da parede celular bacteriana, o que dificulta determinar o mecanismo envolvido nesta regulação.

Bochud e colaboradores (2003) demonstraram que TLR2 tem papel central no reconhecimento do *M. leprae* e ativação dos mecanismos de resposta inata. Chen e colaboradores (2010), em pacientes com tuberculose, constataram que o polimorfismo em TLR 2 (-196 a -174 del), nos pacientes com o genótipo del/del, tinha um efeito de prevenção contra o desenvolvimento de sintomas sistêmicos causados pela doença.

No presente estudo avaliamos uma mutação diferente e não encontramos na literatura outros estudos onde se realizou associação entre o polimorfismo para TLR 2 (-196 a -174 del) e o desenvolvimento da hanseníase. Deve-se ressaltar que para obtenção de conclusões mais detalhadas, necessita-se de um estudo com maior número de indivíduos analisados e também que sejam coletados dados que possam vir a ser possíveis fatores de confusão, como, por exemplo, a etnicidade dos participantes dentro de uma população etnicamente heterogênea.

Em outro estudo nosso grupo demonstrou que pacientes com lesões multibacilares apresentaram menor frequência de células T CD4+IL-17+ que pacientes com lesões paucibacilares. A frequência de células CD4+IFN- γ + também foi significativamente maior nos pacientes paucibacilares em comparação com os multibacilares. O estudo mostrou que IFN- γ é um crítico componente da resposta imune pro-inflamatória que prover proteção contra microbactéria e pode ser utilizado como biomarcador. Por outro lado, os resultados sugeriram que a IL-17 possivelmente tem um papel protetor no desenvolvimento da infecção. (ALMEIDA-NETO, F.B. 2012).

Desta forma, nosso objetivo neste presente estudo foi também avaliar duas citocinas relevantes na regulação da resposta Th2 e que notadamente vem sendo apontada como envolvidas na susceptibilidade dos pacientes a desenvolverem as formas mais graves. Além disso, procuramos descobrir se estas citocinas são moduladas após o tratamento poliquimioterápico.

Produção de IL-4 e IL-10 em cultura de sangue total

Nas figuras 8 e 9, observam-se a produção da interleucina 4 e da interleucina 10 em cultura de sangue total estimuladas por PHA ou BCG em 30 indivíduos: 10 multibacilares, 10 paucibacilares e 10 controles.

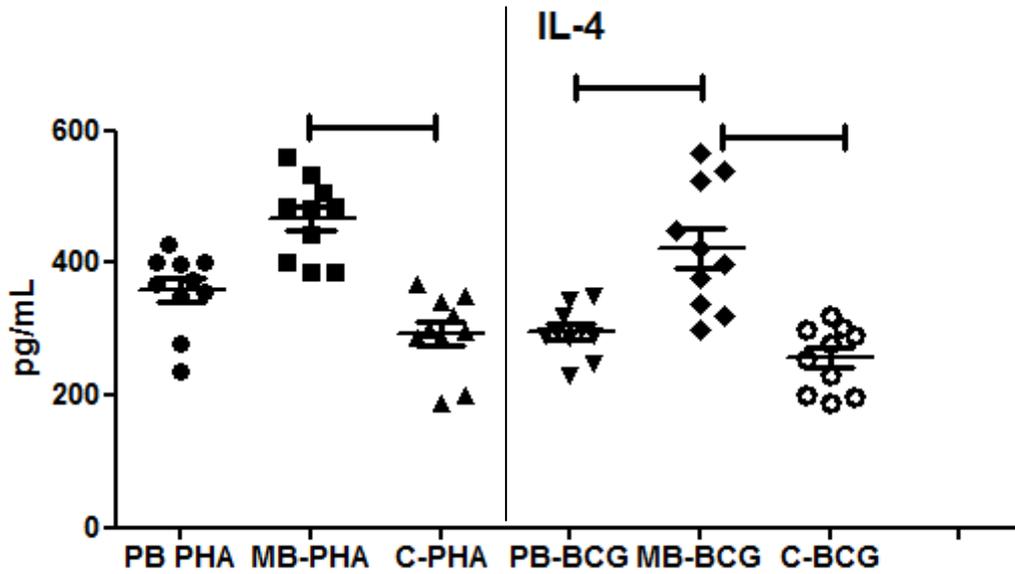


Figura 8: Produção de IL-4 em cultura de sangue total de pacientes com a forma multibacilar (MB), paucibacilar (PB) e contatos saudáveis estimulados com fitohemaglutinina (PHA) ou BCG.

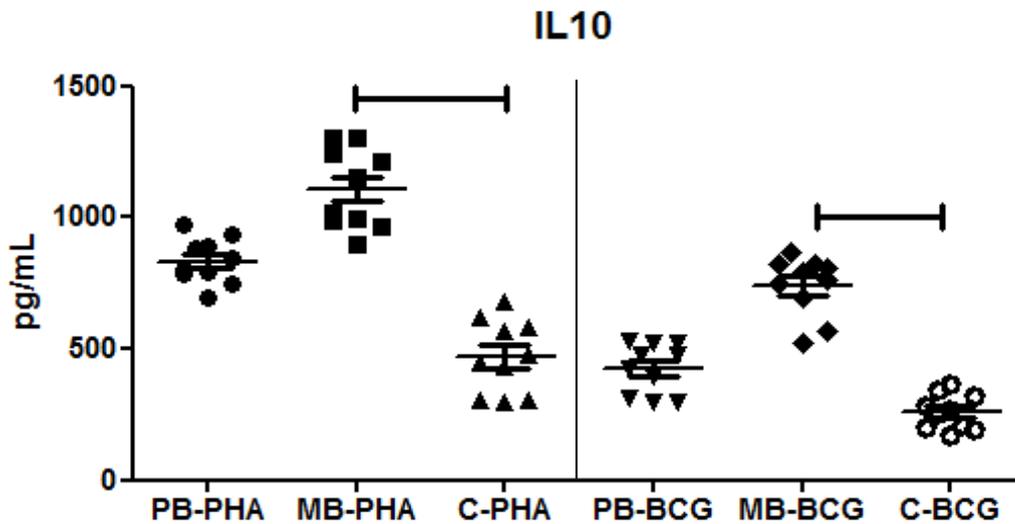


Figura 9: Produção de IL-10 em cultura de sangue total de pacientes com a forma multibacilar (MB), paucibacilar (PB) e contatos saudáveis © estimulados com fitohemaglutinina (PHA) ou BCG. $P < 0.01$

O presente estudo demonstrou uma produção maior de IL-4 e IL-10 em pacientes multibacilares quando comparados aos pacientes paucibacilares e aos indivíduos sadios analisados, em ambos os estímulos. No entanto, a diferença na produção de IL10 entre multibacilar e paucibacilar não foi significativa.

Alguns autores demonstraram elevada expressão de mRNA para IL-4, IL-5 e IL-6 em indivíduos com a forma virchowiana (Yamamura , et. al.,1991; Sieling & Modlin , 1994, Misra et. al.1995). A IL-4 tem sido implicada na maior infecção de células de Schwan pelo *M. leprae*, desta forma, indivíduos multibacilares perpetuam a infecção (Teles, et al. 2010).

Segundo Sampaio e colaboradores (2012), a IL-4 foi considerada a melhor indicadora na hanseníase nas formas Virchowiana, multibacilar, quando estimuladas com diversos antígenos. Neste mesmo estudo de não foi detectado produção de IL1-0 contra nenhum dos estímulos utilizados. Em macrófagos, observou-se que o tratamento com IL-10 aumentou a vida útil do bacilo dentro destas células (Fukutomi *et al.*, 2004).

Produção de IL-4 e IL-10 em pacientes antes e após o tratamento PQT:

As figuras 10 e 11 apresentam os valores das citocinas IL-4 e IL10 em paciente multibacilares e paucibacilares antes e após o tratamento poliquimioterápico estimulados com PHA e BCG.

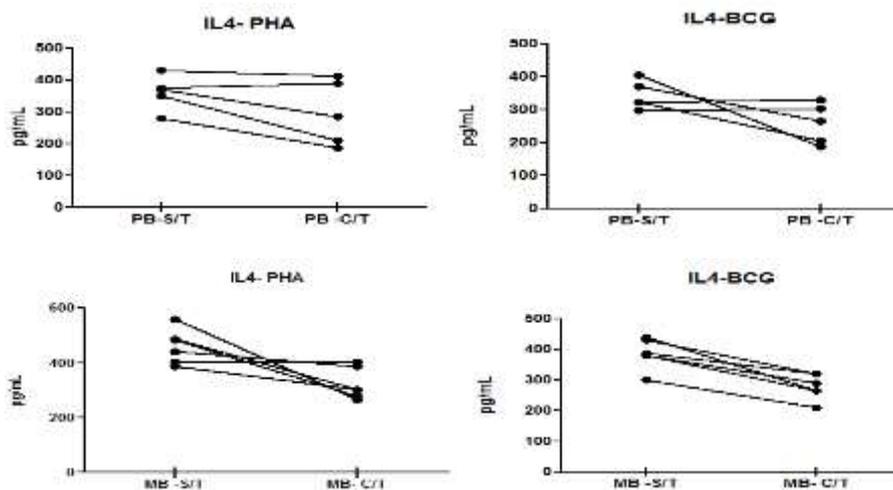


Figura 10: Produção de IL-4 em cultura de sangue total de pacientes com a forma multibacilar (MB), paucibacilar (PB), antes (S/T) e após (C/T) início do tratamento poliquimioterápico, estimulados com fitohemaglutinina (PHA) ou BCG.

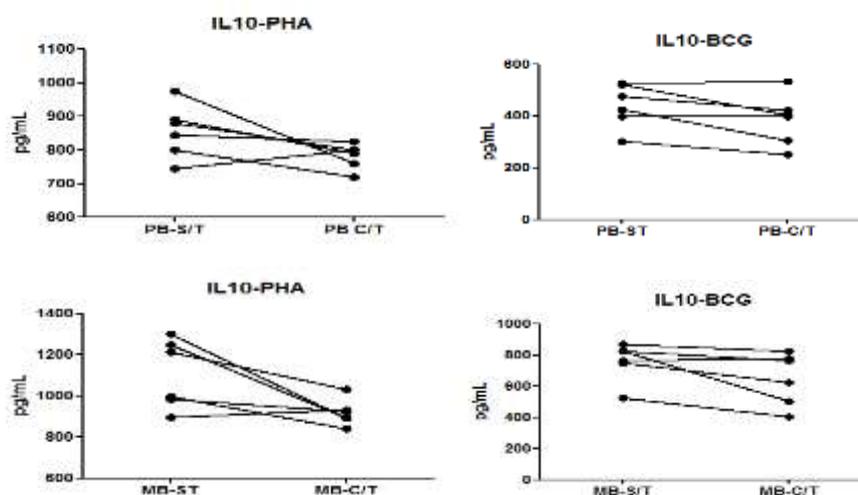


Figura 11: Produção de IL-4 em cultura de sangue total de pacientes com a forma multibacilar (MB), paucibacilar (PB), antes (S/T) e após (C/T) início do tratamento poliquimioterápico, estimulados com fitohemaglutinina (PHA) ou BCG.

Observou-se que após iniciado o tratamento poliquimioterápico existe uma tendência a redução na produção de ambas interleucinas 4 e 10, porém estes resultados não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Devemos ressaltar que a avaliação foi realizada após a administração da primeira dose do tratamento, então é provável que durante a continuação do tratamento esta diminuição seja mais significativa. Estes resultados sugerem que o tratamento poliquimioterápico pode levar a uma modulação na resposta imune do indivíduo, levando a uma possível resolução da infecção.

A produção de citocinas em indivíduos com hanseníase é dependente da estimulação de células do sistema imune pelos antígenos do *M. leprae*, e estes antígenos decaem com o tratamento. A clofazimina e a dapsona tem efeitos anti-inflamatório e pode inibir a resposta de PBMC frente ao mitógeno (Arbiser et. al. 1995; Katz, 1993).

Moubasher e colaboradores (1998) demonstraram que pacientes que desenvolvem a forma virchowiana podem apresentar uma resposta celular frente a *M. leprae* deficiente mesmo após o tratamento. No entanto, os autores acreditam que os níveis de produção de citocinas decrescem devido à redução da carga bacteriana. Os autores demonstraram que o tratamento leva a diminuição de IL-1 β , IL-2R e IL-10.

IL-1 é uma citocina pró-inflamatória induzida na inflamação aguda, que induz preferencialmente células Th2. Desta forma o tratamento poliquimioterápico poderia, pela redução desta citocina, indiretamente levar a redução das citocinas Th2. (Moubasher et. al. 1998)

No presente estudo avaliamos a produção das citocinas após a primeira dose, porque nos interessava observar se havia uma modulação da resposta imune que favorecia a eliminação do patógeno. Em resultados prévios demonstramos que pacientes multibacilares apresentavam maior número de células Th17 após o início do tratamento (Almeida-Neto, 2010), portanto, foi importante identificar que é possível que esta população seja mais relevante na diminuição da carga bacteriana, do que a diminuição de IL-4 e IL-10 nos pacientes multibacilares.

Conclusões

Nossos dados sugerem que o polimorfismo de TLR2 pode estar associado a maior susceptibilidade de indivíduos hansênicos, no entanto, outras regiões deste gene devem ser analisadas. A IL-4, como descrita por outros autores, é um importante indicador do polo multibacilar da infecção pelo *M. leprae*. A IL-10 está aumentada nos indivíduos com hanseníase multibacilar, porém não foi um marcador clínico desta infecção. O tratamento poliquimioterápico levou a uma diminuição da produção de IL-4 e IL10 nos pacientes multibacilares, e paucibacilares, porém não foram significativos após a primeira dose do poliquimioterápico, sugerindo que embora o tratamento module a resposta imune, outros mecanismos imunes podem estar envolvidos na eliminação do patógeno.

Referências

1. Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signaling, *Nature Reviews Immunology*, 4: 499–511, 2004.
2. Almeida-Neto, F. B. Níveis de interleucina 17 e de células TH-17 em indivíduos portadores de hanseníase e sua associação com parâmetros clínicos. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Patologia e Farmacologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
3. Arbiser, JL & Moschella, SL. Clofazimine: a review of its medical uses and mechanisms of action. *J Am Acad Dermatol.*32, 241 247.1995.;
4. Chang, Z., L. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm. Res.*, 59:791–808, 2010.
5. Chen, Y., Hsiao, C., Chen, C., *et al.* Toll-like receptor 2 gene polymorphisms, pulmonary tuberculosis, and natural killer cell counts, *Medical Genetics*, 11:17, 2010.

6. Fukutomi Y, Matsuoka M, Minagawa F, Toratani S, McCormick G, Krahenbuhl J. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, 72(1):16-26., 2004.
7. Haehnel, V., Schwarzfischer, L., Fenton, M., J., Rehli, M. Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol*, 168(11):5629-5637, 2002.
8. Jimenez-Dalmaroni, M.J., Xiao, N., Corper, A.L., Verdino, P., Ainge, G.D., Larsen, D.S., Painter, G.F., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Hoebe, K., Beutler, B., Wilson, I.A. Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a coreceptor for TLR2, *PLoS ONE*, 4, e7411, 2009
9. Katz, SI. Dapsone. In: Fitzpatrick, TB Eisen, AZ Wolff, K eds. *Dermatology in General Medicine*, 4th edn. New York: McGraw-Hill Inc. ;: 2865-2868.1993).
10. Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, Singh S, Colston MJ, Nath I. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology* 86(1):97-103.1995
11. Moubasher, A. E.-D. A., Kamel, ;. N. A., Zedan, H. and Raheem, D. E.-D. A. (1998), Cytokines in leprosy, II. Effect of treatment on serum cytokines in leprosy. *International Journal of Dermatology*, 37: 741-746.1998.
12. Nischalke, H., D., Coenen, M., Berger, O., et al., The toll-like receptor 2 (TLR2) -196 to -174 del/ins polymorphism affects viral loads and susceptibility to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C, *International Journal of Cancer*, 130, 1470-1475, 2011.
13. Noguchi, E., Nishimura, F., Fukai, H., *et al.* An association study of asthma and total serum Immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy*, 34:177-83, 2004.
14. Sampaio, L., H., Sousa, A., L, Barcelos, M., C., Reed, S., G., Stefani, M., M., Duthie, M., S. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(7):1443-51, 2012.
15. Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., Williams, D. L. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol Rev.*, n.19 p. 338-381, 2006.

16. Sharma, N., Sharma, V. K., Gupta, A., Kaur, I., Ganguly, N. K. Alterations in early biochemical events following T cell activation in leprosy patients. *Clin Immunol Immunopathol.*, 88(2), 142-149, 1998.
17. Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology* 191(4-5):378-387. 1994
18. Souza, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina, Ribeirão Preto*, 30: 325-334, jul./set, 1997.
19. Tahara T, Arisawa T, Wang F, et al. Toll-like receptor 2 -196 to -174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric Cancer, *Cancer Sci.*, 98:1790-4, 2007.
20. Teles RM, Krutzik SR, Ochoa MT, Oliveira RB, Sarno EN, Modlin RL () Interleukin-4 regulates the expression of CD209 and subsequent uptake of Mycobacterium leprae by Schwann cells in human leprosy. *Infect Immun* 78(11):4634-4643 .2010
21. Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R., J., Weinberg, K., Rea, T., H., Bloom, B., R., Modlin, R., L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254(5029):277-279. 1991

7. CONCLUSÕES

7. Conclusões:

- Os resultados sugerem que genótipo Ins/Del foi relacionado com o risco de se desenvolver a hanseníase enquanto o genótipo Del/Del foi associado com o efeito de proteção no desenvolvimento da hanseníase.
- Os pacientes paucibacilares apresentam uma menor produção de IL-4 e IL-10 em comparação com os pacientes multibacilares.
- O tratamento poliquimioterápico levou a uma diminuição da produção de IL-4 e IL-10 nos pacientes multibacilares, e paucibacilares, porém não foi significativo após a primeira dose do poliquimioterápico.

Referências

Referências

1. Achtman, M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 53–70, 2008.
2. Akira, S., Takeda, K. Toll-like receptor signaling, *Nature Reviews Immunology*, 4: 499–511, 2004.
3. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.*; 124:783–801, 2006.
4. Almeida-Neto, F. B. Níveis de interleucina 17 e de células TH-17 em indivíduos portadores de hanseníase e sua associação com parâmetros clínicos. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Patologia e Farmacologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
5. Arbour, N. C. E., Lorenz, B. C., Schutte, J., Zabner, J. N., Kline, M., Jones, K., Frees, J. L., Watt, and D. A. Schwartz. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans, *Nat. Genet.*, 25:187–191, 2000.
6. Belgaumkar, V., A., Gokhale, N., R., Mahajan, P., M . Circulating cytokine profiles in leprosy patients. *Lepr Rev.*; 78: 223 – 230. 2007
7. Biebl, A., Muendlein, A., Kazakbaeva, Z., Heuberger, S., Sonderegger, G., *et al.* , CD14 C-159T and Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly Polymorphisms in Surviving Meningococcal Disease Patients. *PLoS ONE* 4(10):, 2009.
8. Bochud, P. Y., Hawn, T. R., Siddiqui, M. R., *et al.* Toll-like receptor 2 (TLR 2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis.*, 197:253–261, 2008.
9. Britton, W. J., Leprosy. In: Cohen J, Powerly WG, *Infectious diseases*, 2th ed. London: Mosby; p. 1507-13, 2004.

10. Casanova, J. L., Abel, L., Quintana-Murci, L. Human TLRs and IL-1Rs in Host Defense: Natural Insights from Evolutionary, Epidemiological, and Clinical Genetics, *Annu. Rev. Immunol.*, 29:447-491, 2011.
11. Cheng, P. L., Eng, H. L., Chou, M. H., You, H. L., Lin, T. M. Genetic polymorphisms of viral infection-associated Toll-like receptors in Chinese population. *Transl. Res.*, 150:311–8, 2007.
12. Daffe, M., M. McNeil, and P. J. Brennan. 1993. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia spp.* *Carbohydr Res.* 249:383–398.
13. Draper, P., O. Kandler, and A. Darbre. 1987. Peptidoglycan and arabinogalactan of *Mycobacterium leprae*. *J. Gen. Microbiol.* 133:1187–1194.
14. Eichelmann, K., *et al.* Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. *Actas Dermosifiliogr.*, 2012.
15. Fukutomi Y, Matsuoka M, Minagawa F, Toratani S, McCormick G, Krahenbuhl J. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*, 72(1):16-26., 2004.
16. Goulart, I. M. B., Penna, G. O., Cunha, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(4): 365-375, 2002.
17. Job, C. K., Jayakumar, J., Kearney, M., Gillis, T. P. Transmission of Leprosy: A Study of Skin and Nasal Secretions of Household Contacts of Leprosy Patients Using PCR, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78(3), 518–521, 2008.
18. Lockwood, D. N. J. Leprosy elimination—a virtual phenomenon or a reality?, *BMJ*, , 324, 1516-1518, 2002.

19. Lorenz, E., J. P. Mira, K. L. Frees, and D. A. Schwartz. 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch. Intern. Med.* 162:1028.
20. Madan, N., K., Agarwal, K., Chandler, R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev.* Dec;82(4):371-82.. 2011
21. Mendonca, V. A., Costa, R. D., Brito-Melo, G. E., Antunes, C. M., Teixeira, A. L. Imunologia da hanseníase. *An. Bras. Dermatol.*, 83(4):343-50, 2008.
22. Murray, H., W., Spitalny, G., L., Nathan, C., F. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol.*, v. 134 n. 3, p. 1619–1622, 1985.
23. Lundberg, A., Wikberg, L. A., Ilonen, J., Vaarala, O., Böttcher, M. F. Lipopolysaccharide Induced Immune Responses in Relation to the *TLR4(Asp299Gly)* Gene Polymorphism, *Clinical And Vaccine Immunology*, , p. 1878–1883, Vol. 15, No. 12, 2008.
24. Maeda, Y., Masaichi, G., Ishii, N., Chifumi, M., Makino, M. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens, *Cellular Immunology*, Pages 69 –77, Vol. 222, No.01, 2003.
25. Misch, E. A., Hawn, T. R. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease, *Clin. Sci. (Lond).*, 114:347–360, 2008.
26. Modlin, L. R. The innate immune response in leprosy, *Curr. Opin. Immunol.*, , v. 22, n.1, p. 48-54, 2010.
27. Modlin, R. L., Melancon-Kaplan, J., Young, S. M. M., Pirmez, C., Kino, H., Convit, J., *et al.* Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:1213-7, 1988.

28. Modlin, R. L., Hofman, F. M., Taylor, C. R., Rea, T. H. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 8:182-89, 1983.
29. Moubasher, A., D., Kamel, N., A., Zedan, H., Raheem, D., A. Cytokines in leprosy. I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol.*; 37: 733 – 740. 1998
30. Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Zidane, *et al.* 2009. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat. Genet.*, 41, 1282–1289.
31. Nathan, C. F., Kaplan, G., Levis, W., R., Nusrat, A., Witmer, M., D., Sherwin, S., A., Job, C., K., Horowitz, C., R., Steinman, R., M., Cohn, Z., A. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy. *N Engl J Med.* v. 315, n. 1, p. 6-15, 1983.
32. Ogus, A. C., Yoldas, B., Ozdemir, T., *et al.* The Arg753Gln polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease, *Eur. Respir. J.*, 23:219 –23, 2004.
33. Organização Mundial da Saúde (OMS). Guide to eliminate leprosy as a public health problem. Geneva: *World Health Organization*; 1995.
34. Organização Mundial da Saúde (OMS). Weekly epidemiological record. No. 36, 2011, 86, 389–400.
35. Organização Mundial de Saúde. World health statistics, 2010.
36. Portal Saúde, Ministério da Saúde, Indicadores Epidemiológicos, Operacionais da hanseníase.http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jul/16/tab_indicadores_epid_operacionais_2012.pdf
37. Rodrigues, L. C., Lockwood, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps, *The Lancet*, 11: 464-470, 2011.

38. Sampaio, L., H., Sousa, A., L., Barcelos, M., C., Reed, S., G., Stefani, M., M., Duthie, M., S. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(7):1443-51, 2012.
39. Sarno, E., N., Grau, G., E.; Vieira, L., M., M., Nery, J., A. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 β during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol.*; 84: 103 – 108. 1991.
40. Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., Williams, D. L. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol Rev.*, n.19 p. 338-381, 2006.
41. Sharma, N., Sharma, V. K., Gupta, A., Kaur, I., Ganguly, N. K. Alterations in early biochemical events following T cell activation in leprosy patients. *Clin Immunol Immunopathol.*, 88(2), 142-149, 1998.
42. Souza, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina*, Ribeirão Preto, 30: 325-334, jul./set. 1997
43. Tahara T, Arisawa T, Wang F, et al. Toll-like receptor 2 -196 to -174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric Cancer, *Cancer Sci.*, 98:1790–4, 2007.
44. Yim, J. J., Lee, H. W., Lee, H. S., et al. The association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human *Toll-like* receptor 2 gene and tuberculosis among Koreans, *Genes Immun*, 7:150 –5, 2006.

Anexos

Anexos

a. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **Identificação do Polimorfismo no Gene para o Receptor *Toll-like 2* (-196 a -174 del) e Dosagem de Citocinas Th2 em Pacientes Hansênicos**. O motivo que nos leva a estudar este problema é contribuir para o avanço nos estudos da hanseníase, que em nosso país, ocupa o segundo lugar de ocorrência em relação ao mundo. Pernambuco apresenta-se como o estado que ocupa a primeira colocação em detecção de casos novos da doença. O objetivo desta pesquisa é determinar se determinado polimorfismo genético em um receptor presente na célula, o receptor *Toll-like*, determina o tipo de resposta imune contra a doença.

Os procedimentos de coleta de material serão da seguinte forma: O Sr (a) receberá um atendimento para avaliação clínica. Será realizada a coleta de uma amostra sanguínea de 4 mL, igual a uma coleta que é feita para a realização de qualquer exame de sangue.

Os riscos aos quais os voluntários serão submetidos são inerentes a uma punção venosa periférica, tais sejam: dor moderada, infecções e infiltrações, todos minimizados pelo emprego de técnica adequada à sua realização.

Os benefícios que os pacientes obterão com o estudo serão: acompanhamento mais próximo de toda a evolução do tratamento da hanseníase, realização de exames de triagem que poderão detectar outras infecções, recebimento de material educativo sobre a hanseníase, exame e avaliação rigorosa dos contatos domiciliares, que apesar de ser preconizado pelo Programa Nacional de combate à hanseníase, por vezes é negligenciado pelos profissionais de saúde, contribuindo desta forma para a perpetuação da doença.

Caso você apresente algum problema em seu exame clínico ou que possa ser presumido pelo resultado obtido com esta amostra de sangue, você será encaminhado para o tratamento adequado ao seu problema, sendo direcionado para a Equipe de Saúde da Família ou para o Centro de Referência onde está sendo acompanhado com as observações que forem necessárias. No entanto é preciso que você fique ciente que este exame de sangue é específico para esta pesquisa e não irá detectar outros problemas de saúde. Este exame não substitui e nem complementa em nenhum momento os exames de rotina que você realiza com o seu médico.

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer

momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial, da pesquisa, etc. serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Curso “Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco” e outra será fornecida a você.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo a qual serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que eu sou livre para interromper a participação na pesquisa a qualquer momento, sem justificar a decisão tomada e que isso não afetará o meu tratamento. Sei que o meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o pesquisador responsável por este projeto, ou a professora orientadora Dr^a Vladia Costa no telefone 8805-5527 ou ainda no Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), localizado na Avenida da Engenharia, s/n - 1º andar, CEP: 50740-600, Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil. Telefone/Fax (81) 21268588 .

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Recife, ____/____/____

Nome do participante: _____

Assinatura: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura: _____

Nome do Testemunha:

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador

Assinatura: _____

,

- b. Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa do Centro de Ciências de Saúde, UFPE:

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS

PROJETO DE PESQUISA

Título: Identificação de Polimorfismos nos Genes para os Receptores Toll-like 2 (-196 a -174 del) e Toll-like 4 (Asp299Gly/Thr399Ile) em Pacientes Hanseníacos

Pesquisador: Márcio da Silveira Gomes **Versão:** 4

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE **CAAE:** 01057112.6.0000.5208

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 20171
Data da Relatoria: 10/05/2012

Apresentação do Projeto:

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo álcool-ácido resistente, não-móvel, não formador de esporos e micro-aerófilo. O microorganismo não cresce em meios de cultura artificiais o que torna o diagnóstico etiológico da doença mais difícil de ser realizado. Porém, sabe-se que pode ser estocado em meio 7H12 a 33 °C e manter-se viável por várias semanas. A incidência da hanseníase ainda continua alta com cerca de 220.000 novos casos relatados em 2010 (OMS, 2011). A prevalência vem sendo reduzida graças, em parte, devido ao tempo de duração do tratamento da doença.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a associação entre os polimorfismos em TLR 2 (196 a -174 del) e TLR 4 (Asp299Gly/Thr399Ile) com as formas clínicas em pacientes hanseníacos, comparados com grupo controle composto por indivíduos saudáveis, do Centro de Referência do estado de Pernambuco, nos anos de 2011 e 2012.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:
Os riscos aos quais os voluntários serão submetidos são inerentes a uma punção venosa periférica, tais sejam: dor moderada, infecções e infiltrações, todos minimizados pelo emprego de técnica adequada à sua realização.

Benefícios:
Os benefícios que os pacientes obterão com o estudo serão: acompanhamento mais próximo de toda a evolução do tratamento da hanseníase, realização de exames de triagem que poderão detectar outras infecções, recebimento de material educativo sobre a hanseníase, exame e avaliação rigorosa dos contatos domiciliares, que apesar de ser preconizado pelo Programa Nacional de combate à hanseníase, por vezes é negligenciado pelos profissionais de saúde, contribuindo desta forma para a perpetuação da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto apresenta-se adequado após as modificações sugeridas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Riscos e Benefícios estão adequados
Os riscos aos quais os voluntários serão submetidos são inerentes a uma punção venosa periférica, tais sejam: dor moderada, infecções e infiltrações, todos minimizados pelo emprego de técnica adequada à sua realização.
Os benefícios que os pacientes obterão com o estudo serão: acompanhamento mais próximo de toda a evolução do tratamento da hanseníase, realização de exames de triagem que poderão detectar outras infecções, recebimento de material educativo sobre a hanseníase, exame e avaliação rigorosa dos contatos domiciliares, que apesar de ser preconizado pelo Programa Nacional de combate à hanseníase, por vezes é negligenciado pelos profissionais de saúde, contribuindo desta forma para a perpetuação da doença.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram indicadas e consideradas adequadas ao projeto apresentados, devendo o mesmo ser aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto foi considerado aprovado, pois atendeu as exigências. Projeto avaliado e aprovado pelo colegiado sendo liberado para o início da coleta de dados. A aprovação definitiva do projeto será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final no Comitê de Ética.

RECIFE, 10 de Maio de 2012

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO