

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**MESTRADO EM PATOLOGIA**

**ANA CECÍLIA DE BRITO SAUNDERS**

**POLIMORFISMO E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA INTERLEUCINA-  
10 EM HANSENÍASE**

**FORTALEZA**

**2010**

**ANA CECÍLIA DE BRITO SAUNDERS**

**DOSAGEM SÉRICA E POLIMORFISMO DA INTERLEUCINA-10 NA  
HANSENÍASE**

**Dissertação submetida à Coordenação do  
Mestrado em Patologia da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Max Victor Carioca  
Freitas.**

**FORTALEZA**

**2010**

S275d Saunders, Ana Cecília de Brito

Dosagem sérica e polimorfismo da Interleucina-10  
na hanseníase/ Ana Cecília de Brito Saunders. – Fortaleza, 2010.

92 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do  
Ceará. Faculdade de Medicina. Curso de Mestrado em Patologia.  
Fortaleza, CE.

1. Hanseníase 2. Polimorfismo Genético 3. Interleucina-10  
I. Freitas, Max Victor Carioca (orient.) II. Título.

CDD: 616.998

ANA CECÍLIA DE BRITO SAUNDERS

DOSAGEM SÉRICA E POLIMORFISMO DA INTERLEUCINA-10 NA  
HANSENÍASE

Dissertação submetida ao Mestrado em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof (a). Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Jose Ajax Nogueira Queiroz

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Heitor de Sá Gonçalves

Centro de Dermatologia Dona Libânia - SESA

*A Deus, pelo privilégio em ter  
concluído mais essa etapa na minha vida.*

*Aos meus pais, Haroldo e Sulamita  
minha eterna gratidão.*

*Aos meus amados esposo e filha:  
Kenno e Giulia; aos meus irmãos: Alexandre,  
Midleton e Bezold e aos meus queridos  
sobrinhos: João Paulo, Arthur e Bezold  
Júnior, com todo amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo sustento em tudo na minha vida e nesse momento em especial.

Ao Prof. Max Victor Carioca Freitas pela dedicação, paciência, confiança e tranquilidade que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Margarida Maria Lima Pompeu, Coordenadora do Mestrado em Patologia Tropical pela dedicação ao programa e aos alunos.

Ao Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC pelo suporte técnico em equipamentos e insumos necessários para realização do experimento.

À Profa. Dra. Lygia Kerr pela dedicação ao estudo da hanseníase no Ceará.

Ao CNPQ pelo incentivo financeiro a esse estudo.

À colega Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima pela realização da tipificação do polimorfismo da citocina.

À Profa. Zirlane Castelo Branco pela disponibilização do Kit de IL-10, do tempo e da paciência que foram de extrema importância para a realização desse estudo.

Aos colegas de turma de mestrado, em especial à Sammara, que juntas desde a graduação, dividimos alegrias, tristezas, mais com a certeza de que teríamos que persistir em nossos objetivos.

Aos professores da banca de qualificação, Prof(a) Danielle Malta e Prof. Fernando Schemelzer, pela grande contribuição para o aperfeiçoamento do presente trabalho.

*“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas: glória, pois, a Ele eternamente, amém.” (Romanos 11:36)*

## RESUMO

A hanseníase continua sendo um problema de saúde mundial, sendo o Brasil o segundo país em maior número de casos novos. No Ceará a doença é considerada endêmica e em 2009 foram diagnosticados 1.952 casos novos, alcançando um coeficiente de detecção geral de 22,8/100.00 habitantes. A doença é causada pelo *M. leprae*, manifesta-se através de sinais e sintomas dermatoneurológicos e é transmitida de pessoa a pessoa através do convívio de indivíduos suscetíveis com doentes bacilíferos sem tratamento. A interação do *M. leprae* com os subtipos de células T produz citocinas do tipo Th1 e Th2, responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença. Padrões de citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) foram encontrados em lesões de pele das formas tuberculóides e padrões de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) foram encontrados em lesões das formas virchovianas. A hanseníase é influenciada por vários fatores, sendo os genéticos os mais estudados no momento. Os genes das citocinas aparecem como fortes candidatos capazes de influenciar a interação patógeno-hospedeiro e favorecer ou não o desenvolvimento da doença. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e imunomoduladora que possui regiões promotoras bastantes polimórficas, contendo regiões de microssatélites e SNPs que formam vários haplótipos que estão associados a diferentes níveis de produção de citocina *in vitro*. Vários estudos tentam reportar associações entre os polimorfismos de IL-10 e o risco ou proteção para diversas doenças. Contudo, os dados relatados tem sido contraditórios e a maioria das associações entre os polimorfismos e a produção dessa citocina são baseados em estudos *in vitro*. Dessa forma o presente estudo teve o objetivo de definir como os polimorfismos da região promotora da citocina afetam a produção *in vivo* frente à infecção pelo *M. leprae*. Foram quantificadas as concentrações séricas de IL-10 de 181 indivíduos, sendo 77 casos índices de hanseníase, 74 indivíduos contactantes e 30 controles saudáveis. Sendo que destes, 31 possuíam análise genotípica de IL-10 no grupo caso, 33 no grupo contactante e 29 no grupo controle. Os pacientes com análise genotípica foram estratificados em baixo, médio e alto produtor da citocina. As diferenças nos níveis da citocina foram comparadas entre os grupos dentro do espectro da hanseníase (paucibacilar e multibacilar), dos controles externos, dos controles internos, dos genótipos e alelos encontrados nos grupos. Foram realizados testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para análise das medianas de IL-10 em pg/mL. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos caso, contactante e controle ( $p=0,7450$ ), entre os indivíduos pauci e multibacilar ( $p=0,7898$ ), entre os fenótipos de nível de produção de citocina (baixo, médio e alto) ( $p=0,4355$ ). Foi encontrada diferença significativa na produção

de IL-10 entre os alelos -1082A,-819C e -592C do grupo caso em relação aos controles ( $p<0,05$ ) e dos alelos -819C e -592C do grupo caso em relação aos contactantes ( $p<0,05$ ). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos contactante e controle ( $p>0,05$ ). Em conclusão, os genótipos de IL-10, -1082G>A, -819C>T e -592G>C não influenciaram a produção e/ou o desfecho da infecção pelo *M. leprae*. Por outro lado, os alelos -1082A,-819C e -592C determinaram menor produção de IL-10 em indivíduos com hanseníase.

**Palavras-chave:** hanseníase, polimorfismo, IL-10, níveis séricos, contactantes.

## ABSTRACT

Leprosy is a world problem of health and Brazil has the second higher rates of new cases in the world. It is considered an endemic disease at Ceará and a total of 1,952 new cases were detected, reaching a detection rate of 22.8/100,000 inhabitants. The interaction between the *M. leprae* and different T cells stimulates the production of a Th1 or a Th2 pattern of cytokines, which are responsible for the different clinical forms of leprosy. Th1 cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) were found in tuberculoid skin lesions while Th2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-10) were found in lepromatoid lesions. Leprosy is influenced by many distinct factors, among them, genetic factors are the most studied at this moment. Cytokine genes seem to influence the interaction between the pathogen and the host and contribute to the development or not of the disease. The IL-10 is an antiinflammatory and immunomodulatory cytokine which has too much polymorphic promoter regions with microsatellites and SNPs. Different haplotypes are associated to distinct levels of cytokine production *in vitro*. Many studies reported associations between IL-10 polymorphisms and the risk or the protection against many diseases. However, the data reported have been contradictory and most of the associations between these polymorphisms and the production of IL-10 are showed in *in vitro* studies. The aim of this study was to evaluate how the promoter region polymorphisms of IL-10 influence the cytokine levels production *in vivo*, during the *M. leprae* infection. Serum levels of IL-10 were analyzed by ELISA in 181 individuals, 77 of them were leprosy cases, 74 household contacts and 30 healthy controls. Among them, 31 had IL-10 polymorphism typed in the case group, 33 in household contact group and 29 in healthy controls. Cases with polymorphism typed were stratified in low, medium and high levels of cytokine production. Differences in the IL-10 production were compared among leprosy cases (pauci and multibacillary), household contacts, healthy controls, genotypes and alleles distribution found in the groups. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to analyze mean values of IL-10 levels. No differences were observed between cases, contacts and controls ( $p=0.7450$ ), pauci and multibacillary ( $p=0.7898$ ), phenotypes of IL-10 production (low, medium or high) ( $p=0.4355$ ). A significant difference in the IL-10 levels between cases and controls was found associated to the alleles -1082A,-819C and -592C ( $p<0.05$ ) and between cases and contacts associated to the alleles -819C and -592C ( $p<0.05$ ). No differences were found between contacts and controls ( $p>0.05$ ). In conclusion, the -1082G>A, -819C>T and -592G>C IL-10 genotypes did not influence the

IL-10 production or the *M. leprae* infection outcome. On the other hand, -1082A,-819C e - 592C alleles determined a lower production of IL-10 in cases of leprosy.

**Keywords:** Leprosy. Polymorphisms. IL-10. Serum levels. Contacts.

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1</b> Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL nos grupos caso, contactante e controle.....	46
<b>Figura 2</b> Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no grupo caso nas formas paucibacilar e multibacilar.....	46
<b>Figura 3</b> Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no grupo contactante da forma paucibacilar e multibacilar.....	47
<b>Figura 4</b> Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no fenótipo baixo, médio e alto produtor da citocina.....	48
<b>Figura 5</b> Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no fenótipo baixo, médio e alto produtor da citocina no grupo caso.....	48
<b>Figura 6</b> Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no fenótipo baixo e médio produtor da citocina no grupo contactante.....	49
<b>Figura 7</b> Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no fenótipo baixo, médio e alto produtor da citocina no grupo controle.....	50

## LISTA DE QUADROS

	Pág.
<b>Quadro 1</b> Genótipos e alelos polimórficos da região promotora do gene de IL-10 relacionados à produção da citocina.....	34
<b>Quadro 2</b> Principais alelos e genótipos envolvidos na proteção e suscetibilidade à hanseníase.....	35

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1</b> Caracterização da população de estudo.....	45
<b>Tabela 2</b> Análise das medianas da concentração sérica de IL-10 entre os sexos masculino e feminino nos grupos caso, contactante e controle.....	45
<b>Tabela 3</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10, no fenótipo baixo produtor da citocina nos grupos caso, contactante e controle.....	50
<b>Tabela 4</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10, no fenótipo baixo produtor da citocina nos grupos caso, contactante e controle.....	51
<b>Tabela 5</b> Frequência dos genótipos de IL-10 nos grupos caso, contactante e controle.....	51
<b>Tabela 6</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 em pg/ml dos genótipos polimórficos nos grupos caso, contactante e controle.....	52
<b>Tabela 7</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 por genótipo polimórfico na população geral estudada.....	53
<b>Tabela 8</b> Distribuição dos alelos -1082G, -1082A, -819C, -919T, -592C e -592A nos grupos caso, contactante e controle.....	53
<b>Tabela 9</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A do grupo caso.....	54
<b>Tabela 10</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A do grupo controle.....	54
<b>Tabela 11</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A do grupo contactante .....	55
<b>Tabela 12</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A nos grupos caso e controle.....	55
<b>Tabela 13</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A nos grupos contactante e controle... ..	56
<b>Tabela 14</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A nos grupos caso e contactante.....	56
<b>Tabela 15</b> Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A nos grupos caso, contactante e controle.....	57

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 Aspectos históricos da hanseníase.....	17
1.2 O <i>Mycobacterium leprae</i> .....	18
1.3 Epidemiologia.....	19
1.4 Manifestações clínicas da hanseníase.....	20
1.5 Resposta imune na hanseníase.....	22
1.5.1 Imunidade inata e a hanseníase.....	22
1.5.2 Imunidade adaptativa e a hanseníase.....	26
1.6 Citocinas das respostas Th1 e Th2 na hanseníase.....	27
1.7 A influência genética da hanseníase.....	29
1.8 Gene da IL-10 e a suscetibilidade genética.....	31
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>36</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 Descrição do estudo.....	38
4.2 População do estudo.....	38
4.3 Coleta de sangue.....	38
4.4 Extração de DNA.....	39
4.5 Tipificação dos polimorfismos de IL-10.....	39
4.6 Análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose .....	40
4.7 Interpretação dos resultados.....	41
4.8 Dosagem de IL-10 por ELISA.....	41
4.9 Análise estatística.....	42
<b>5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>43</b>
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>

<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
Anexo A - Dados dos casos de hanseníase.....	80
Anexo B - Dados dos contactantes de hanseníase.....	83
Anexo C - Dados dos controles.....	86

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos históricos da hanseníase

A história da hanseníase está interligada com a da própria civilização. Apesar de não se saber ao certo a época do real aparecimento da moléstia no mundo, as primeiras referências textuais à hanseníase são encontradas em vários documentos históricos, como o papiro Egípcio de Ebers, datado de 1550 anos A.C. (HULSE, 1972), livros sagrados hindus, como o Atharva Veda, datados do primeiro milênio A.C. (BLOOMFIELD, 2004) e a Bíblia, que no decorrer do Antigo e Novo Testamento, faz menção a doença (ROBERTS; MANCHESTER, 2005). No entanto, alguns autores acreditam que o uso bíblico da palavra provavelmente tenha referência maior a uma maldição do que à doença em si (COCHRANE, 1964).

A hanseníase foi prevalente no Egito Antigo, com provas incontestáveis de sua ocorrência em uma múmia do 2º século A.C. (DZIERZYKRAY-ROGALSKI, 1980; LECHAT, 1999). Sushruta Samhita, um compilado médico escrito na Índia em torno de 200-100 anos A.C. pelo médico cirurgião Sushruta, forneceu descrições detalhadas do que provavelmente seriam as características clínicas e o tratamento da hanseníase (DHARMENDRA, 1969). Inscrições antigas da China, cerca de 600 anos A.C. também revelam a prevalência da doença (JOPLING; MCDUGALL, 1988). Na Grécia antiga, descrições clínicas possivelmente da forma virchoviana da hanseníase, foram incluídas no âmbito do nome “Elephantiasis graecorum” (BROWNE, 1970; KAPLAN, 1993). O caso mais antigo de hanseníase diagnosticado foi encontrado por arqueólogos da Universidade Hebraica em Israel. A partir de um sudário do 1º século depois de Cristo, foi possível concluir que o indivíduo sofria de hanseníase e tuberculose (MATHESON et al., 2009).

Alguns historiadores da doença têm mantido que a hanseníase foi originada no subcontinente indiano e se espalhou para a Europa após o quarto século A.C. (MONOT et al., 2005; MARIOTTI et al., 2005), mas a doença só tornou-se um grave problema de saúde pública na Europa a parti da Idade Média (RAWCLIFFE, 2006), quando provavelmente foi trazida por os soldados de Alexandre o Grande, durante o retorno da campanha indiana (BROWNE, 1970; KAPLAN, 1993), ou por soldados do exército de Pompey, retornando do Egito (LECHAT, 1999).

A hanseníase foi introduzida nas Américas em grande parte como resultado da

colonização pelos europeus e, em certa medida, pelo comércio de escravos na África Ocidental do Século XVIII (MONOT et al., 2005). Para Opromolla (2000), o papel exercido pelos escravos na introdução da hanseníase no Brasil é questionável, pois era difícil a negociação de africanos que apresentassem lesões cutâneas (OPROMOLLA, 2000). No Brasil, os primeiros casos da doença foram notificados no ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro (YAMANOUCHI, 1993).

Após os primeiros casos no Rio de Janeiro, outros focos da doença foram identificados, principalmente na Bahia e no Pará (YAMANOUCHI, 1993). Tal fato, conforme relata o Ministério da Saúde (BRASIL, 1989), levou as autoridades da época a solicitarem providências a Portugal, sem, entretanto alcançarem êxito.

Em virtude do desenvolvimento da agricultura, novas terras foram sendo colonizadas dando origem à necessidade de mão-de-obra. Como consequência houve a migração de vários doentes as mais diferentes regiões do território brasileiro. De acordo com Maurano (1950), após a introdução da hanseníase por diversos pontos da costa brasileira, a infecção teria acompanhado paralelamente a colonização. De Pernambuco, a doença teria se estendido à Paraíba e Alagoas, devido ao desenvolvimento agrícola dessas regiões. E ao Ceará, Maranhão, Pará e Amazonas pela ocupação desses Estados (MAURANO, 1950).

A hanseníase foi durante muito tempo uma doença que marginalizava seus portadores e cujo tratamento era baseado no isolamento do doente. Só em meados de 1800 os estudos sobre a hanseníase iniciaram. O investigador pioneiro foi Daniel Danielssen, um médico norueguês que juntamente com seu colega Carl Boeck, descreveu a opinião de que a hanseníase seria uma doença hereditária (TAN; GRAHAM, 2008). No entanto, Armauer Hansen, também médico norueguês, a partir de seus achados histopatológicos, derrubou a hipótese de Danielssen, pois descreveu que a hanseníase é uma doença infecciosa. Foi então, que em 1873, relatou a presença de microrganismos em tubérculos hansênicos, o que seria posteriormente denominado *Mycobacterium leprae* (TAN; GRAHAM, 2008). A enfermidade então ganhou, anos mais tarde, o nome do seu descobridor.

## 1.2 O *Mycobacterium leprae*

O *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) tem a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura. A presença de ácido micólico, de alto peso molecular na membrana celular do bacilo, torna-o resistente à descoloração pelo álcool-ácido utilizado na coloração pelo método de Ziehl-

Neelsen. O microrganismo cora-se de vermelho pela fucsina e é chamado de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos os bacilos são vistos isolados, em agrupamentos variados ou em arranjos especiais denominados globias que resultam da sólida união de bacilos através de uma substância chamada gléia (REES, 1985).

A temperatura ótima para a reprodução está em torno de 27°C a 33°C, o que explica a sua predileção para as áreas mais frias do corpo como a pele, os nervos periféricos e a mucosa das vias aéreas superiores. Na pele, o *M. leprae* se encontra preferencialmente nos macrófagos, enquanto no tecido neural, localiza-se nas células de Schwann, onde pode permanecer por largo período de tempo sem estimular uma resposta imunológica (CONCHA et al., 2008).

A parede celular tem espessura de 20 nm apresentando uma camada interna eletrondensa e uma externa eletrtransparente, onde estão agrupados componentes lipídicos, particularmente o glicolípido fenólico-1 (PGL-1) e lipoarabinomanana (LAM) (BRENNAM; BARROW, 1980; HUNTER et al., 1986). O citoplasma é eletrondenso contendo estruturas comuns as de outros organismos gram positivos (REES; YOUNG, 1994).

O *M. leprae* possui um genoma constituído por 3.268.203 pb que codifica 1.604 proteínas e 1.116 pseudogenes, que são pedaços de DNA que não são mais traduzidos em proteína úteis. Isso comparado ao genoma do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que codifica 3.959 proteínas, com um genoma de 4.411.532, mostra o quanto o processo evolutivo do *M. leprae* foi inferior, o que tem tornado o patógeno totalmente adaptado ao organismo humano (COLE et al., 2001).

### 1.3 Epidemiologia

A hanseníase continua sendo um problema de saúde pública mundial, onde foram notificados 249.007 casos novos, em 121 países, em 2008, dos quais 134.184 (54%) foram detectados na Índia, o país com maior número de casos novos, seguido do Brasil, com 39.047 (15%), e da Indonésia, com 17.441 (7%) (BRASIL, 2010).

Na população geral brasileira, a hanseníase apresenta tendência decrescente nos coeficientes de detecção, mas ainda estão em patamares elevados nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Em 2008, o coeficiente de detecção foi de 20,56 por 100 mil habitantes. O dado é 30% menor que o registrado em 2003, quando o indicador ficou em 29,37 por 100 mil

habitantes, o valor mais elevado dos últimos anos. (BRASIL, 2010). Em números absolutos, o Brasil teve 51.900 casos novos da doença em 2003, 50.565 em 2004, 48.448 em 2005, 43.642 em 2006, 40.126 em 2007 e 39.047 em 2008. Dados preliminares de 2009 mostram que já foram notificados 32.022 casos novos, de acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010).

Desde 2007, o Brasil utiliza como indicador de acompanhamento da endemia, o coeficiente de casos de hanseníase em menores de 15 anos, porque permite detectar focos de transmissão ativa da doença. Assim, mesmo com o aumento da sensibilidade no Sistema Único de Saúde (SUS), verifica-se uma redução no número de casos novos em menores de 15 anos. (BRASIL, 2010). Em 2008, houve registro de 2.913 casos entre menores de 15 anos, o que correspondeu a um coeficiente de detecção de 5,89 por 100 mil habitantes dessa faixa etária. Em 2007, foram 3.048 registros entre menores de 15 anos, ou 6,07 por 100 mil habitantes. Em 2006, 3.444 menores tiveram a doença, representando coeficiente de 6,22. A análise do Programa Nacional de Combate a Hanseníase (PNCH) mostra que o auge da detecção de casos nessa faixa etária ocorreu em 2003, quando 4.181 portadores da doença foram identificados e tratados, resultando em um coeficiente de 7,98 por 100 mil habitantes. Estes dados indicam uma redução significativa no coeficiente, da ordem de 25%, em um período de 5 anos (BRASIL, 2010).

No Ceará, a doença é considerada endêmica. Em 2009 foram diagnosticados 1.952 casos novos, alcançando um coeficiente de detecção geral de 22,8/100.000 habitantes e de 4,6/100.000 habitantes em menores de 15 anos (CEARÁ, 2010). Segundo o relatório do ano de 2005 da situação do estado do Ceará, publicado pelo Ministério da Saúde, os municípios do estado que são prioritários para a eliminação da hanseníase são: Fortaleza, Caucaia, Maracanaú, Sobral, Iguatu, Juazeiro do Norte e Crato. Estes municípios respondem por aproximadamente 60,0% do total de casos registrados de hanseníase e por cerca de 40% da população do estado (CEARÁ, 2003; BRASIL, 2005). Durante o ano de 2009 esses municípios apresentaram altos coeficientes de detecção geral onde Fortaleza obteve 27,9/100.00 habitantes, Caucaia 17,6/100.00, Maracanaú 33,2/100.00, Sobral 52,1/100.000, Iguatu 84,4/100.000, Juazeiro do Norte 27,2/100.000 e Crato 27,4/100.00 (CEARÁ, 2010).

O município de Sobral situa-se a 240 quilômetros da capital Fortaleza na região Noroeste do Estado, foi criado em 1841 e é constituído por 11 distritos possuindo uma área territorial de 2.129 Km<sup>2</sup> (IBGE, 2008). Devido o alto índice de detecção de casos de hanseníase, esse município foi escolhido para a realização do presente estudo.

#### 1. 4 Manifestações clínicas da hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa que se caracteriza por evolução lenta, alta infectividade e baixa patogenicidade, manifestando-se principalmente, através de sinais e sintomas dermatoneurológicos. É transmitida de pessoa a pessoa através do convívio de indivíduos contactantes suscetíveis com doentes bacilíferos sem tratamento. Tem um período médio de incubação que varia de 2 a 5 anos, e é causada pelo *M. leprae*, que pode infectar além do homem, outros animais como tatus, chimpanzés e macacos (TALHARI; NEVES, 1997).

Durante o curso natural da doença pode-se identificar algumas etapas que levam a divisão da hanseníase em: hanseníase *per se*, que é a fase independente da forma clínica, fase das formas clínicas espectrais que ocorre após a instalação da infecção e por último a fase das reações hansênicas, que é a fase onde há aumento da atividade da doença e que podem ser do tipo I (Reação reversa, RR) e do tipo II (Eritema Nodoso Hansênico, ENH) (MORAES et al., 2006). Na fase de manifestação clínica espectral, segundo Ridley e Jopling, os pólos desse espectro são ocupados de um lado pela forma mais localizada denominada tuberculóide, associada à resposta imunológica do tipo Th1 e do outro, pela forma virchoviana, sistêmica, e associada à resposta imunológica do tipo Th2, com três formas clínicas intermediárias ou *borderline*: *boderline* tuberculóide (BT), *boderline boderline* (BB) e *boderline* virchoviana (BV) (RIDLEY; JOPLING, 1966). Os pólos tuberculóide e virchoviano correspondem aproximadamente às formas paucibacilar e multibacilar, classificação criada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para facilitação da orientação terapêutica (OMS, 1998).

No Brasil, o Ministério da Saúde classificou a hanseníase conforme a Portaria 817 de 27/07/2000, que define os pacientes paucibacilares como aqueles com menos de cinco lesões de pele e/ou com comprometimento de um tronco nervoso, e os pacientes multibacilares, aqueles com mais de cinco lesões de pele e/ou com comprometimento de mais de um tronco nervoso. No grupo dos pacientes multibacilares são incluídos todos os casos de baciloscopia positiva (BRASIL, 2000).

A manifestação clínica mais comum da hanseníase é uma lesão de pele hiperpigmentadas ou eritematosas, acompanhadas por uma perda de sensação. Os pacientes geralmente apresentam lesões na pele, dormência ou fraqueza causada pelo envolvimento do nervo periférico, ou, mais raramente, uma queimadura ou úlcera indolor (WALKER; LOCKWOOD, 2006). Os pacientes também podem apresentar inicialmente com uma reação hansênica (PFALTZGRAFF; RAMU, 1994).

## 1.5 Resposta imune e a hanseníase

### 1.5.1. Imunidade inata e a hanseníase

A resposta inicial à penetração de agentes agressores é feita através de mecanismos imunológicos inatos. A resposta imune inata tem a característica de ser um mecanismo de defesa não específico, com uma ação geral sobre os microrganismos, independente da natureza dos mesmos. É constituída por barreiras, ou seja, pele e mucosas íntegras, além de fatores solúveis plasmáticos como lisozimas, complemento, proteínas, citocinas e células fagocitárias (CUNHA, 2001).

Os linfócitos são os principais responsáveis pelo reconhecimento específico e inicial do antígeno, sendo divididos em linfócitos T e B, com base na expressão fenotípica de suas moléculas de superfície e em suas diferenças funcionais. O agente estranho desencadeia, então, uma série de eventos que levam à ativação de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, macrófagos e linfócitos B, esses últimos levando à produção de anticorpos (HARDMAN; LIMBIRD, 1996).

As interações do *M. leprae* com os subtipos de células T produzem citocinas do tipo Th1, que promovem uma resposta imune celular, e, Th2, que promovem uma resposta imune humoral. Esses dois braços da resposta imune ao patógeno têm originado hipóteses para explicar as diferenças entre as formas clínicas da doença (LIMA et al., 2000; BELGAUMKAR et al., 2007).

As células dendríticas (*dendritic cell*, DCs) são células que fazem parte do sistema imune inato e desempenham um papel central no desenvolvimento da resposta imunológica a diversos agentes infecciosos (QUAH; O'NEILL, 2005). São células apresentadoras de antígenos profissionais que atuam tanto no condicionamento da célula T quanto no estabelecimento da auto-tolerância (PULENDRAN, 2004; ALBERT et al., 2001; KALINSKI; MOSER, 2005). Possivelmente essa escolha é determinada pelo estado de maturação das DCs (STEINMAN et al., 2003), embora alguns trabalhos tenham mostrado evidências ao contrário (ALBERT et al., 2001). Contudo a participação das células dendríticas na modulação da resposta da célula Th1 ou Th2 consiste em um assunto de muitos estudos.

A interação das células dendríticas com os patógenos ocorre através dos diferentes receptores de reconhecimento padrão, presentes na superfície celular das células dendríticas (PULENDRAN, 2004).

Os receptores de reconhecimento padrão mais estudados são os da família dos receptores do tipo Toll (Toll Like receptors - TLR) composta atualmente por 14 membros com diferentes sítios de ligação (KUMAGAI et al., 2008). O LPS (Lipopolissacarídeo) é reconhecido através do TLR4 enquanto que os lipopeptídeos micobacterianos através do TLR2 (O'NEILL, 2006). Os TLRs podem reconhecer antígenos como Lipoarabinomanam (LAM), incluindo o AraLAM, manose ou fosfoinositídeoLAM (PILAM), a lipoproteína de 19 kDa, fator solúvel da tuberculose (STF) e a micobactéria inteira (QUESNIAUX et al., 2004; KRUTZIK; MODLIN, 2004) .

Alguns trabalhos sugerem que os diferentes tipos de TLRs podem ser associados com os espectros da hanseníase. Expressão de TLR2 e TLR1 foi encontrada ser muito mais forte nas lesões cutâneas da forma tuberculóide da hanseníase em relação à forma virchoviana (KRUTZIK et al., 2003).

Outros receptores, como a lecitina do tipo C DC-SIGN são importantes na ligação de micobactérias e de vírus, como o HIV (KOOYK; GEIJTENBEEK, 2003). DC-SIGN também podem estar envolvidos na supressão de TLR mediando à inflamação em resposta a infecções por micobactérias (KOOYK; GEIJTENBEEK, 2003). DC-SIGN tem mostrado se ligar a manose presente na parede celular de micobactérias de crescimento lento como a *M. tuberculosis* e *M. leprae* (GEIJTENBEEK et al., 2003) desencadeando a produção de IL-10 e inibindo a produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  por DCs ou células de linhagens monocíticas (GEIJTENBEEK et al., 2002; NIGOU et al., 2001). Estudos recentes mostraram a associação do DC-SIGN com a hanseníase virchoviana, relatando que esse receptor está envolvido tanto na captação do *M. leprae* como na resposta Th2 da doença (SOILLEUX et al., 2006; KRUTZIK et al., 2005) . Outros receptores em DCs imaturas, tais como o receptor de manose (NIGOU et al., 2000 ), CD11b e CD11c (TAILLEUX et al., 2003) foram identificados mediar a ligação de micobactérias aos macrófagos (EHLERS; DAFPE, 1998; SCHLESINGER; HORWITZ, 1994) e provavelmente as DCs.

O macrófago é a célula hospedeira primária do *M. leprae* que desempenha um papel importante na patogênese da hanseníase. Dependendo da forma clínica da doença, os macrófagos possuem características distintas. Na hanseníase virchoviana as lesões caracterizam-se pelo acúmulo de macrófagos que são incapazes de impedir a multiplicação do *M. leprae*. Em contraste, nas lesões das formas tuberculóides, onde há formação de granuloma, dificilmente são encontradas bactérias dentro dos macrófagos. Ultimamente essas diferenças têm sido estudadas profundamente, mostrando haver também distinção dos receptores celulares presentes nos macrófagos de cada forma clínica da doença. Em um

estudo que utilizou material de biópsia de pacientes portadores de hanseníase, houve um aumento da expressão dos receptores Toll like do tipo TLR1 e TLR2 em macrófagos e células dendríticas de lesões tuberculóides quando comparadas as lesões virchovianas (KRUTZIK et al., 2003). Já em outro estudo com macrófagos de lesões da formas virchovianas houve alta expressão de receptor do tipo DC-SING quando comparadas as forma tuberculóides (SOILLEUX et al., 2006). Avanços recentes têm sugerido uma possível dicotomia no fenótipo dos macrófagos, originando células com perfil pró e anti-inflamatórios, sendo este caracterizado pela produção de IL-10 (VERECK et al., 2004). Um estudo realizado com micobactérias e essas duas subpopulações de macrófagos mostraram que as micobactérias mesmo crescendo nos dois subtipos de macrófagos, induzem a produção de IL-23 no fenótipo pró-inflamatório em contraste com a IL-10 no fenótipo anti-inflamatório, sugerindo que a plasticidade dessas células está envolvida no tipo de resposta ao patógeno (VERECK et al., 2004). Em outros estudos, macrófagos infectados por *M. leprae* foram refratários a ativação induzida pelo IFN- $\gamma$  manifestando funções aberrantes (HAGGE et al., 2004; SIBLEY; KRAHENBUHL, 1987).

O sistema complemento também faz parte da imunidade inata e possui as vias de ativação clássica, alternativa e da lectina. É um sistema formado por proteínas que atuam na defesa contra a invasão do organismo, através de vários mecanismos como a opsonização, a formação de imunocomplexos, o recrutamento de leucócitos e a resposta inflamatória. A via da lectina de ativação do complemento envolve a interação das proteínas de ligação com o Manan, presentes nas superfícies bacterianas (MBL), que atuam de modo a proporcionar a captação e fagocitose do *M. leprae* contribuindo para a disseminação e estabelecimento da hanseníase (GARRED et al., 1994). Experimentos realizados em soros de pacientes com hanseníase confirmam que o sistema complemento pode ser ativado por complexos imunes circulantes isolados desses pacientes (NOORDEEEN, 1991) e, especialmente nas formas virchovianas, grandes quantidades de imunocomplexos têm sido observados (BROWNE, 1970).

O estudo que avaliou a atividade hemolítica do complemento em diferentes formas clínicas da hanseníase, mostrou que houve redução da atividade hemolítica e dos componentes C3 e C4 do complemento e aumento dos níveis de MBL em soros de paciente com a forma virchoviana quando comparados as formas tuberculóide e dimorfa e aos controles saudáveis (GOMES et al., 2008). Alguns relatos mostram haver maior proteção contra a hanseníase virchoviana associada à deficiência de MBL no soro (GARRED et al.,

1994), embora essa associação não se aplique à forma tuberculóide da doença (DORNELLES et al., 2006).

Outras células da imunidade inata, como neutrófilos, células *natural killer* (NK) e mastócitos, também estão envolvidas na defesa do organismo ao *M. leprae*, contudo suas funções não estão bem estabelecidas. O curso crônico da hanseníase é caracterizado por uma ausência de neutrófilos no local da lesão. Embora as lesões do ENH (eritema nodoso hansênico) possam mostrar infiltrado de polimorfonucleares (PMN), principalmente nas primeiras 72 horas após o início da reação (OLIVEIRA et al., 1999). Estudos mostraram que a apoptose dos PMN é significativamente maior em pacientes com ENH e que essas células podem ser estimuladas pelo *M. leprae* e lipoarabinomanan, secretando TNF- $\alpha$  e IL-8, sugerindo um papel funcional na contribuição para o recrutamento de linfócitos para os sítios lesionados (OLIVEIRA et al., 1999). Contudo atualmente não está claro o papel dos neutrófilos na patogênese e na resposta imune da hanseníase.

A função das células NK em pacientes com hanseníase também não está bem estabelecida. Um dos primeiros estudos mostrou que não houve diferença significativa na atividade das células NK de indivíduos com hanseníase virchoviana ou com as formas dimorfas comparados aos indivíduos saudáveis, porém mostrou atividade reduzida dos linfócitos NK em pacientes VV com ENH (HUMPHERS et al., 1982). Estudos posteriores mostraram células NK com baixa atividade em pacientes com hanseníase virchoviana não tratados e não reacionais, quando comparados aos controles normais. Enquanto que pacientes com reações reversas mostraram atividade normal dessas células, quando comparados com a forma *boderline* tuberculóide (BT) (CONVERSE; BJUNE, 1986). Outros estudos também mostraram que as células NK de pacientes com a forma virchoviana não tratados e tratados com MDT (Multidrogaterapia) foram menos eficazes em promover a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), em comparação com pacientes com a forma tuberculóide ou controles saudáveis. O tratamento das células NK desses pacientes, com a IL-2 e IFN- $\alpha$  mostrou aumentar a citotoxicidade dessas células (CHIPLUNKAR et al., 1990). Da mesma forma, a administração intradérmica de IL-2 em pacientes com a forma virchoviana resultou em um aumento de 8 vezes das células NK, com aumento de células T e monócitos em infiltrados da derme, um aumento gradativo do infiltrado a um tipo granulomatoso tuberculóide, porém nenhuma reversão na anergia a antígenos do *M. leprae* (KAPLAN; COHN, 1991).

A função específica dos mastócitos na hanseníase permanece enigmática. Vários estudos têm apresentado resultados contraditórios do papel dessas células na doença.

(ANTUNES et al., 2003). Alguns estudos relatam que uma maior quantidade de mastócitos foram encontrados na hanseníase virchoviana, em comparação com hanseníase tuberculóide (JAYALAKSHMI, 1995; UNANUE, 2002), enquanto outros estudos relatam o oposto (CREE et al., 1990).

### 1.5.2. Imunidade adaptativa e a hanseníase

A maioria dos estudos da imunidade humoral tem se restringido aos anticorpos no imunodiagnóstico ou no monitoramento da hanseníase. Apesar de ter sido relatada a presença de células plasmáticas e células B no local das lesões hansênicas (DESIKAN et al., 1983; SEHGAL et al., 2005; IYER et al., 2007), não se sabe muito a respeito dessa relação com a patologia das lesões. Recentemente, a presença de células B foi relatada na pele lesionada de ambas as formas virchoviana e tuberculóide e isso foi associado com a detecção de anticorpo de *M. leprae* presente em sobrenadantes de culturas das biópsias das lesões correspondentes (IYER et al., 2007). Especulou-se que estas células B presentes nas lesões podem influenciar a resposta das células T e / ou desempenhar um papel na manutenção da reação inflamatória na hanseníase em parte através da secreção local de anticorpos (IYER et al., 2007). No entanto, dados funcionais, apoiando essa hipótese não existem.

Especula-se que os anticorpos contra componentes do *M. leprae* não podem exercer um papel considerável na proteção contra a hanseníase. No entanto anticorpos podem desempenhar um papel na captação de *M. leprae* por fagócitos mononucleares e, portanto tem influência na patogênese da doença (SCHLESINGER et al., 1994). Anticorpos naturais provenientes de soro não imunes foram considerados importantes para a ligação do componente C1q do complemento ao PGL-I e na fixação de C3 ao *M. leprae* (SCHLESINGER et al., 1994). Anteriormente, o C3 foi mostrado fixar o PGL-I do *M. leprae* e mediar a captação através de receptores de complemento nos fagócitos mononucleares. Esses estudos demonstraram que os anticorpos naturais promovem a captação do *M. leprae* por receptores do complemento em células do hospedeiro. Isto também sugere que o repertório de anticorpos naturais de um indivíduo pode determinar a predisposição à hanseníase e determinar a forma clínica da doença (SCHLESINGER et al., 1994).

## 1.6 Citocinas das respostas Th1 e Th2 na hanseníase

Desde a descrição inicial dos padrões de citocinas produzidos pelas subpopulações de células T CD4+, Th1 e Th2 em ratos (MOSMANN et al, 1986) e em humanos (DEL PRETE et al., 1991; MOSMANN; SAD, 1996) , tentativas têm sido criadas no intuito de delinear as respostas imunitárias nas doenças ao longo destas linhas. Em geral, as células Th1 estão envolvidas nas reações de imunidade mediada por células e são importantes nas respostas contra patógenos intracelulares. Em contraste, as citocinas Th2 aumentam a produção de anticorpos, especialmente IgE, aumentam a proliferação de eosinófilos e são eficazes contra patógenos extracelulares, parasitas e no desenvolvimento de reações alérgicas (MOSMANN; SAD, 1996). Embora o equilíbrio Th1 e Th2 seja importante para o sucesso de uma resposta imunológica eficaz, ainda não está claro como o perfil dessas respostas podem responder a patógenos distintos (KALINSKI; MOSER, 2005).

A hanseníase mostra um espectro de respostas imunológicas que varia desde uma resposta de imunidade mediada por células forte no pólo TT, a uma resposta quase que exclusivamente humoral no pólo VV. Yamamura et al. (1991) demonstraram uma expressão aumentada de citocinas Th2, IL-4, IL-5 e IL-10 nas lesões de pele de pacientes VV. Em contraste com as citocinas Th1, IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , associadas com hanseníase TT (YAMAMURA et al., 1991). Alguns estudos com clones de linfócitos T CD4+ responsivos ao *M. leprae*, gerados a partir do sangue periférico ou de lesões da pele de pacientes com a forma TT mostraram um perfil um pouco diferente de secreção de citocinas, produzindo IL-2, IFN- $\gamma$  e GM-CSF, mas pouca ou nenhuma IL-4 e IL-5 (SALGAME et al., 1991; HAANEN et al., 1991 ). Em contrapartida, os clones de Linfócito T CD4+ não-responsivos ao *M. leprae* produziram pouca IL-2 e IFN- $\gamma$ , mas mostraram um perfil do tipo 2 secretando IL-4, IL-5 e GM-CSF (SALGAME et al., 1991). Curiosamente, os pacientes com a forma polar VV mostraram um subtipo de linfócito CD8+ produtor de IL-4 que suprimiu a proliferação do *M. leprae* (SALGAME et al., 1991). Estudos imunohistoquímicos de citocinas em lesões hansênicas mostraram um significativo aumento na expressão de IFN- $\gamma$  em lesões tuberculóides, mas não lesões lepromatosas (ARNOLDI et al, 1990; SCHELL-TOELLNER et al, 1995). A relação entre os tipos de respostas Th1 e Th2 e as formas polares da hanseníase foi contestada posteriormente com os estudos que relatam que quase metade dos pacientes mostraram co-expressão tanto IL-4 e IFN- $\gamma$ , independentemente da classificação clínica (MISRA et al., 1995; NATH et al., 2000). No entanto, estes últimos estudos com células mononucleares de sangue periférico estimuladas com diversos antígenos do *M. leprae* , não

necessariamente refletem a situação real *in vivo* das células.

Uma proporção de clone de célula T, obtidas de lesões de pele de pacientes com hanseníase responsiva ao *M. leprae*, mostrou uma resposta do tipo Th0, produzindo tanto de IFN- $\gamma$  e IL-4 (VERHAGEN et al., 1998). Isso foi diferente na polarização Th1 durante o desenvolvimento de reação reversa, onde os clones não responsivos ao *M. leprae* foram heterogêneos apresentando respostas do tipo Th1, Th0 ou Th2 (VERHAGEN et al., 1998; VERHAGEN et al., 1997). Esses resultados sugerem que, embora haja alguns indícios de associação da resposta polarizada tipo Th1 ou tipo Th2 com o espectro da hanseníase, especialmente em isolados clonais de populações de células T, tais distinções podem ser menos perceptíveis *in vivo*, devido à complexidade da resposta imune induzida.

As análises de soros de pacientes com hanseníase apresentaram aumento da expressão de muitas citocinas, exceto da IL-2 em todos os pacientes, do IFN- $\gamma$  nos pacientes com a forma VV e da IL-10, em pacientes com a forma TT, em comparação com controles saudáveis (MOUBASHER et al., 1998; IYER et al., 2007). Isso sugere a ativação das células imunes por antígenos do *M. leprae* em todos os pacientes com hanseníase. IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram elevados em pacientes com a forma TT, em comparação com pacientes com a forma virchoviana (MOUBASHER et al., 1998). Estes resultados correlacionados com estudos *in vitro*, mostraram que a grande maioria das células T na hanseníase tuberculóide são da subpopulação CD4 + e do fenótipo Th1 produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , porém pouco são produtoras ou não de IL-4, IL-5 e IL-6 (SALGAME et al., 1991; HAANEN et al., 1991; MUTIS et al., 1993). Curiosamente, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os níveis de IL-2 das formas TT e VV nos soros de pacientes (MOUBASHER et al., 1998). Pacientes com a forma VV apresentaram níveis mais altos de IL-10 e IL-1 $\beta$  quando comparados a pacientes TT (MOUBASHER et al., 1998). Os estudos *in vivo* têm demonstrado a predominância de IL-4, IL-5 e IL-10 em lesões VV (YAMAMURA et al., 1991). A IL-10 foi demonstrada suprimir macrófagos que medeiam a destruição de microorganismos intracelulares (FREI et al., 1993). A IL-4 foi uma das mais importantes citocinas em pacientes VV que induziu a supressão *in vitro* do *M. leprae* através da atividade imune dos clones de células T CD4 + (SALGAME et al., 1991). No entanto, a atividade supressora de IL-4 não foi confirmada através de outros estudos (MUTIS et al., 1993), apesar dessa citocina ter um papel fundamental na polarização Th2 das células T CD4+ (NAKAMURA et al., 1997; RINCON; FLAVELL, 1997).

## 1.7 A influência da genética na hanseníase

A hanseníase é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro e do patógeno, por fatores ambientais, pela vacinação com BCG e pela taxa de exposição ao *M. leprae* ou outras micobactérias. A baixa diversidade genética do patógeno e o fato de que apenas cerca de 0,1 - 1% da população infectada desenvolve a doença, indicam a capacidade do sistema imune do hospedeiro para controlar a infecção, sugerindo que diferenças na susceptibilidade do hospedeiro ao patógeno, podem estar associadas às características genéticas individuais e influenciar tanto no desenvolvimento da hanseníase bem como nas suas diferentes formas clínicas (MORAES et al., 2006).

Estudos genéticos com gêmeos mostraram uma taxa de concordância maior para a hanseníase entre os monozigóticos (60-85%) do que com os gêmeos dizigóticos (5-20%) (MORAES et al., 2006; SIDDIQUI et al., 2001). Populações com diferentes origens étnicas que vivem na mesma área endêmica exibem distintas taxas de prevalência de hanseníase (MORAES et al., 2006). Além do que as taxas de proteção da vacina BCG tem se mostrado variáveis em diferentes populações (ZODPEY, 2007). Os primeiros estudos genéticos identificaram um importante *locus* de susceptibilidade à hanseníase na região 10p13, contendo o gene do receptor de manose em macrófagos (SIDDIQUI et al., 2001) e na região 20p12 (TOSH et al., 2002), também encontrada ser associada com dermatite atópica e psoríase (NAIR et al., 1997; TREMBATH et al., 1997; COOKSON et al., 2001). Estudos posteriores mostraram ligação da região 10p13 mais especificamente com a hanseníase TT do que com as outras formas da doença (MIRA et al., 2003; REMUS et al., 2003). Um estudo identificou um *locus* de susceptibilidade à doença em famílias Vietnamitas presente no cromossomo 6q25 (MIRA et al., 2003). Outro estudo mostrou envolvimento dos genes que causam a doença de Parkinson PARK2 e PACRG na susceptibilidade à hanseníase em 197 famílias Vietnamitas (MIRA et al., 2004). O *locus* 17q11, que contém os genes NOS2A e CCL2 (MCP-1), entre outros, também tem sido vinculado na susceptibilidade à hanseníase (JAMIESON et al., 2004).

A contribuição das moléculas do HLA para o desenvolvimento da hanseníase também tem sido avaliada, pois se tem correlacionado certos fenótipos ao desenvolvimento da doença. O *locus* HLA com os haplótipos da classe I HLA-A \* 1102-B \* 4006-Cw \* 1502 mostram uma associação significativa com susceptibilidade à hanseníase virchoviana (SHANKARKUMAR et al., 2003). Entre os genes de classe II do *locus* HLA-DRB1, mais especificamente DRB1 \* 15 e DRB1 \* 16 são associados à susceptibilidade a hanseníase na

Índia (VRIES et al., 1980; RANI et al., 1993), Tailândia (SCHAUF et al., 1985) e Brasil (VISENTAINER et al., 1997), enquanto que o locus HLA- DQw1 foi encontrado ser associado com os doentes da forma VV (GORODEZKY et al., 2004).

O polimorfismo na posição -308(G/A) na região promotora do gene TNF $\alpha$  foi o primeiro associado à doença, mas permanece controverso na hanseníase. Em estudo indiano e tailandês foi encontrada associação do alelo -308A e a hanseníase multibacilar (ROY et al., 1997; VEJBAESYA et al., 2007). Contrariamente estudos brasileiros mostram esse alelo em associação à resistência dessa forma clínica (SANTOS et al., 2002; VANDERBRGTH et al., 2004). Enquanto que em um estudo com famílias da Polinésia Francesa não foi encontrada associação (LEVEE et al., 1997). Da mesma forma, um polimorfismo na posição +252 (A-G) no primeiro intron da linfotoxina (LT)-A juntamente com o haplótipo -308A do SNP do TNF foi também associado à proteção contra a hanseníase em uma população brasileira (SHAW et al., 2001). O receptor da vitamina D (VDR) foi associado com hanseníase em uma população na Índia onde a substituição T-C na região do gene 352 no códon 3' resultou na susceptibilidade à hanseníase virchoviana e tuberculóide, na presença de genótipos TT e CC, respectivamente (ROY et al., 1999) enquanto que em uma população do Malauí o genótipo CC foi associado com susceptibilidade à hanseníase *per se* (FITNESS et al., 2004). No entanto, a relevância biológica dos polimorfismos de nucleotídeo único em função de VDR em hanseníase não é conhecida.

O gene NRAMP-1(gene da proteína 1 do macrófago associado à resistência natural) também tem sido estudado como um gene candidato para resistência ou suscetibilidade à hanseníase, com base em estudos em ratos (SKAMENE et al., 1998). Estudos com seres humanos, no entanto, mostram que a associação deste gene com resistência à hanseníase é controversa (BUSCHMAN et al., 1997). Estudo realizado em famílias Vietnamitas encontrou evidência positiva de ligação entre haplótipos do NRAMP1 e susceptibilidade a hanseníase *per se* (ABEL et al., 1998). Já outro estudo, realizado em Mali mostrou associação do polimorfismo desse gene com a forma MB da doença (MEISNER et al., 2001) e o estudo realizado em famílias da Polinésia Francesa não mostrou associação do gene com a doença. (ROGER et al., 1997).

Outros genes candidatos testados para a susceptibilidade à hanseníase incluem a IL-12R $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 (LEE et al., 2003; OHYAMA et al., 2005; KIM et al., 2001), laminina (WIBAWA et al., 2002) e Toll-like receptor (TLR) -2 (KANG; CHAE, 2001). Estudo em uma população da Indonésia revelou que um polimorfismo na posição +7809 no gene da laminina onde ocorre uma substituição da valina por alanina (V2587A) resultou em uma

mutação missense que foi fortemente associada à hanseníase tuberculóide (WIBAWA et al., 2002). Mutações missense no receptor  $\beta 1$  da IL-12 (IL-12R $\beta 1$ ) não foram associados à forma VV na Coreia (LEE et al., 2003), enquanto que o receptor  $\beta 2$  (IL-12R $\beta 2$ ) foi encontrado ser altamente expressa na forma TT (KIM et al., 2001) e mutações missense na região 5' do gene desse receptor podem afetar sua expressão e aumentar a susceptibilidade para a forma LL (OHYAMA et al., 2005). Um estudo inicial na Coreia mostrou associação do polimorfismo Arg677Trp no gene do receptor toll-like (TLR)-2 em pacientes com a forma LL (KANG et al., 2002), porém posteriormente foi demonstrado que se tratava de uma duplicação do exon ao invés de um polimorfismo verdadeiro (MALHOTRA et al., 2005). No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado a associação do polimorfismo do TLR2 com risco aumentado para o desenvolvimento de reação reversa (BOCHUD et al., 2008), sugerindo que TLR2 pode realmente ter um papel na hanseníase.

### **1.8 Gene da IL-10 e a susceptibilidade genética**

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina reguladora produzida tanto pela resposta imunológica inata quanto pela adaptativa e que é capaz inibir as citocinas das respostas Th1 e Th2 e uma variedade de mecanismos imunes (SARAIVA; O`GARRA, 2010).

Os genes das citocinas constituem um importante grupo de genes que podem influenciar a interação patógeno e hospedeiro (MALHOTRA et al., 2005). Os polimorfismos genéticos podem regular os níveis das citocinas e essa regulação da produção pode influenciar a intensidade da resposta imune. Diferenças sutis entre os níveis de citocinas secretadas podem explicar o estabelecimento de fenótipos diferentes na hanseníase (MORAES et al., 2006). Os polimorfismos mais comuns e mais estudados são microssatélites e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Os polimorfismos de nucleotídeo único são substituições bialélicas de ponto (G-A, C-T, C-A) que acontecem em uma determinada sequência de DNA. Como resultado, os SNPs podem alterar a afinidade de ligação para fatores de transcrição na região promotora da citocina (MORAES et al., 2006). Os polimorfismos microssatélites são trechos de DNA que consistem em unidades repetidas de dois, três ou quatro nucleotídeos. Vários métodos baseados na PCR (*polymerase chain reaction*) foram desenvolvidos e utilizados para detecção destes polimorfismos: a metodologia RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), que utiliza enzimas de restrição (WILSON et al., 1992), o método SSOP (*sequence-specific oligonucleotide probes*), que permite a amplificação do gene e a hibridização de alelos específicos com sondas marcadas (TURNER et al., 1997) e a técnica de

SSP (*sequence-specific primers*), a qual faz uso de iniciadores específicos para a sequência de nucleotídeos do alelo polimórfico (REYNARD et al., 2000).

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória e imunossupressora produzida por um largo número de células do sistema imune. Apesar de inicialmente ter sido descrita como uma citocina produzida por células Th2, agora está claro que ela é produzida por outras células T, como as Treg (reguladoras) (MOORE et al., 2001), células T CD8+ (GILLIET et al., 2002), além de macrófagos, células dendríticas (McGUIRK et al., 2002) e células B (FILLARREAU et al., 2002).

A função reguladora da IL-10 tem sido bem documentada em modelos animais. Camundongos com deleção no gene da IL-10 quando infectados com um parasita da malária desenvolvem uma resposta prejudicial ao hospedeiro (LI et al., 1999), enquanto que em outro estudo camundongos com a mesma deleção apresentaram suscetibilidade à doença intestinal (KUHN et al., 1993). Em humanos a função reguladora da IL-10 ainda não foi totalmente elucidada. Em estudos realizados *in vitro* usando PBMCs de indivíduos afetados por várias infecções, a resposta imune foi melhorada na presença de anticorpos monoclonais anti IL-10 na leishmania (CARVALHO et al., 1994), na filariose (MAHANTY et al., 1997), na esquistossomose (KING et al., 1996), na hanseníase (SIELING et al., 1993) e na tuberculose (GONG et al., 1996).

Em um estudo experimental *in vitro*, que utilizou PBMCs de indivíduos imunocompetentes com infecção anterior por tuberculose e que foram em seguida infectados com HIV, mostrou que no momento da segunda infecção por *M. tuberculosis*, a replicação viral foi prejudicada devido ao aumento da IL-10 e a inibição da produção de TNF, mostrando que ambas as citocinas têm um impacto direto sobre a replicação viral (RANJBAR et al., 2004). Em estudos envolvendo a IL-10 e a hanseníase mostraram que esta citocina está aumentada na forma de MB da doença (MISRA et al. 1995) e que há um bom prognóstico em indivíduos contactantes e a relação aumentada de TNF/IL-10 (LIMA et al., 2000).

A IL-10 também está envolvida na patogênese das doenças auto-imunes (CUSH et al., 1995; PEREZ et al., 1995), particularmente na desregulação da função das células B que no lúpus eritematoso sistêmico, leva a produção de auto-anticorpos (ITOH e HIRDHZA et al., 1995; LLORENTE et al., 1995). Além disso, possui capacidade de induzir anergia nas células T (LUSCHER et al., 1994) e inibir a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I nessas células (MATSUDA et al., 1994). A IL-10 desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças infecciosas e foi demonstrada afetar a resposta dos macrófagos durante infecções por micobactérias

(MURRAY et al., 1997). Mostrando também que a gravidade de uma infecção pode estar associada com níveis séricos de IL-10 (DERKX et al., 1995). Níveis elevados de IL-10 no soro foram observados em pacientes com um mau prognóstico de meningite meningocócica, enquanto que os pacientes que tinham doença leve apresentaram baixos níveis IL-10 (LEHMANN et al., 1995). Um estudo realizado em famílias de pacientes que tiveram doença meningocócica demonstrou diferenças na capacidade de produzir IL-10 após estimulação de sangue total com LPS *in vitro*, onde as famílias que apresentaram produção de IL-10 aumentada tiveram risco 20 vezes maior para desfecho fatal, sugerindo que as diferenças na produção estão ligadas a hereditariedade (WESTENDORP et al., 1997).

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1, em 1q31-32 e sua região promotora é bastante polimórfica, contendo regiões de microsatélite e SNPs, que formam vários haplótipos que estão associados com níveis diferentes da citocina (ESKDALE et al. 1999). Estudos têm sugerido que o efeito do SNPs na região promotora proximal (-1082A→G, -819C→T, -592C→A) está mais relacionado com a susceptibilidade ou proteção à hanseníase do que nos SNPs na região promotora distal (-3575T→A, -2849G→A, -2763C→G) (HURME et al., 1998; MALHOTRA et al., 2005).

O alelo -1082A é considerado baixo produtor de IL-10 (TURNER et al., 1997). Sendo que alguns estudos têm demonstrado que esse alelo é predominante nas populações brasileira, holandesa (MORAES et al., 2003), iraniana (AMIRZAGAR et al., 2006) e indiana (PRABHU et al., 2007). O alelo -819C está relacionado com alta produção de IL-10 (TURNER et al., 1997) e é predominante nas populações brasileira, holandesa (MORAES et al., 2003) e iraniana (AMIRZAGAR et al., 2006). Já o alelo -592C também está relacionado à alta produção de IL-10 (TURNER et al., 1997), sendo predominante nas populações iraniana (AMIRZAGAR et al., 2006), da Irlanda do Norte, do continente Sul Africano, de Omã na Arábia e do México (MEENAGH et al., 2002). Sendo que na população de Singapura esse alelo é menos freqüente (MEENAGH et al., 2002) (Quadro -1).

Um estudo brasileiro realizado em Bauru (São Paulo) que comparou os dados obtidos com outros trabalhos usando meta-análise associou o alelo -819T com a suscetibilidade à hanseníase e a baixa produção de IL-10 em cultura de células mononucleares obtidas a partir de sangue periférico estimuladas com antígenos do *M. leprae*. Sugerindo que baixos níveis de IL-10 durante o desenvolvimento da doença podem culminar na ausência de resposta imune e no desenvolvimento da doença (PEREIRA et al, 2009). Esse estudo foi de acordo com o estudo anterior, realizado na população do Rio de Janeiro, onde também foi encontrada associação do alelo -819T com susceptibilidade à doença (SANTOS et al., 2002),

porém em desacordo com o estudo realizado na população do Malauí onde não houve associação dos SNPs -592, -819, -1082 com a hanseníase (FITNESS et al., 2004). E em desacordo também com outro estudo brasileiro realizado em uma população de Maringá (Paraná) no qual se analisou a associação dos polimorfismos de IL-10 com a hanseníase mostrando não haver diferenças significantes entre os genótipos de pacientes com hanseníase e controles saudáveis (FRANCESCHI et al., 2008) (Quadro -2).

Turner et al. (1997), analisou os genótipos dos polimorfismos e viu que o genótipo GCC/GCC está associado à alta produção de IL-10, os genótipos GCC/ACC e GCC/ATA estão associados à produção intermediária de IL-10, e os genótipos ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA associados à baixa produção da citocina (TURNER et al., 1997). O genótipo formado pelos SNPs -1082A/-819T/-592A foi associado à atividade transcricional mais baixa do que o genótipo -1082G/-819C/-592C, enquanto o genótipo ATA foi associado com baixa produção da citocina em cultura de PBMC estimulada com LPS. Adicionalmente, observou-se que o alelo -1082G está associado à alta produção da citocina tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” (TURNER et al., 1997; CRAWLEY et al., 1999; GIBSON et al., 2001) (Quadro -1).

**Quadro 1** - Genótipos e alelos polimórficos da região promotora do gene de IL-10 relacionados à produção da citocina.

Genótipo/Alelo	Fenótipo	Referência
Genótipo		
GCC/GCC	Alto produtor	TURNER et al., 1997
GCC/ACC	Médio produtor	TURNER et al., 1997
GCC/ATA		
ACC/ACC	Baixo produtor	TURNER et al., 1997
ACC/ATA		
ATA/ATA		
Alelo		
-1082G	Alto produtor	TURNER et al., 1997
-1082A	Baixo produtor	
-819C	Alto produtor	TURNER et al., 1997
-819T	Baixo produtor	
-592C	Alto Produtor	TURNER et al., 1997

Na população brasileira o genótipo formado pelos SNPs da região promotora distal -3575A/- 2849G/- 2763C foi associado com a proteção à doença, enquanto o genótipo -3575T /-2849A / -2763C foi encontrado ser susceptível à hanseníase *per se* mas sem apresentar correlação significativa com as formas clínicas (MORAES et al., 2004). Em um estudo realizado na Índia, o genótipo -3575T/ -2849G/ -2763C/ -1082A/ -819C/ -592C mostrou conferir resistência à hanseníase e à forma multibacilar da doença, enquanto o genótipo -3575T/ -2849G/ -2763C/ -1082A/ -819T/ -592A mostrou-se associado à forma multibacilar (MALHOTRA et al., 2005 ) (Quadro - 2).

A frequência dos polimorfismos dos genes das citocinas varia muito entre as populações, principalmente onde a miscigenação é muito forte, como é o caso da população brasileira. Essas diferenças étnicas na distribuição de diversos polimorfismos do gene da IL-10 são importantes na determinação da associação genética com a doença (OPDAL 2004; MORAES et al. 2003).

**Quadro 2** - Principais alelos e genótipos envolvidos na proteção e suscetibilidade à hanseníase.

Citocina	População	Alelo/genótipo	Fenótipo	Referência
IL-10	Brasil-Maringá	-592C/-819T/-1082G	Sem associação	FRANCESCHI et al., 2008
	Brasil-São Paulo Metanálise	-819T	Suscetível	PEREIRA et al., 2009
	Brasil- Rio de Janeiro	-819T	Suscetível	SANTOS et al., 2002
	Malauí	-592C/-819T/-1082G	Sem associação	FITNESS et al., 2004
	Brasil- Rio de Janeiro	-3575A/- 2849G/- 2763C	Protetor	MORAES et al., 2004
		-3575T /-2849A / -2763C	Suscetível <i>per se</i>	MORAES et al., 2004
	Índia e Brasil	-3575T/ -2849G/ -2763C/ -1082A/ -819C/ -592C	Protetor	MALHOTRA et al., 2005
		-3575T/ -2849G/ -2763C/ -1082A/ -819T/ -592A	Suscetível MB	MALHOTRA et al., 2005

## 2 JUSTIFICATIVA

A hanseníase continua sendo um problema de saúde mundial, sendo o Brasil o segundo país em maior número de casos novos. No Ceará a doença é considerada endêmica e em 2009 foram diagnosticados 1.952 casos novos, alcançando um coeficiente de detecção geral de 22,8/100.00 habitantes. A doença é causada pelo *M. leprae*, manifesta-se através de sinais e sintomas dermatoneurológicos e é transmitida de pessoa a pessoa através do convívio de indivíduos suscetíveis com doentes bacilíferos sem tratamento. A interação do *M. leprae* com os subtipos de células T produz citocinas do tipo Th1 e Th2, responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença. Padrões de citocinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) foram encontrados em lesões de pele das formas tuberculóides e padrões de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) foram encontrados em lesões das formas virchovianas. A hanseníase é influenciada por vários fatores, sendo os genéticos os mais estudados no momento. Os genes das citocinas aparecem como fortes candidatos capazes de influenciar a interação patógeno-hospedeiro e favorecer ou não o desenvolvimento da doença. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e imunomoduladora que possui regiões promotoras bastantes polimórficas, contendo regiões de microssatélites e SNPs que formam vários haplótipos que estão associados a diferentes níveis de produção de citocina *in vitro*. Vários estudos tentam reportar associações entre os polimorfismos de IL-10 e o risco ou proteção para diversas doenças. Contudo, os dados têm sido contraditórios e a maioria das associações entre os polimorfismos e a produção dessa citocina são baseados em estudos *in vitro*. Devido à importância da IL-10 para a resposta imunológica, esse estudo tem o objetivo de definir como os polimorfismos da região promotora da citocina afetam a produção *in vivo* frente à infecção pelo *M. leprae*.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Verificar a associação dos polimorfismos da IL-10 -1082G>A, -819C>T, -592A>C e os níveis séricos da citocina entre os casos, os contactantes de hanseníase e controles saudáveis.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Dosar pela técnica de ELISA os níveis de IL-10 entre casos, contactantes de hanseníase e controles saudáveis.
- Verificar os níveis da citocina produzidos pelos casos e contactantes nos casos classificados como paucibacilar e multibacilar.
- Associar os níveis séricos da citocina com os polimorfismos e alelos da IL-10 entre os grupos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Descrição do estudo**

O presente trata-se de um estudo observacional realizado a partir da análise de sangue periférico obtido de indivíduos sem tratamento prévio, com diagnóstico de hanseníase, residentes no município de Sobral, no estado do Ceará, atendidos no Centro de Saúde de Sobral, durante o período de março de 2006 a julho de 2008.

### **4.2 População do estudo**

Os indivíduos foram divididos em três grupos: casos índices, controles internos (indivíduos contactantes dos casos índices) e controles externos.

Foram estudados 77 indivíduos portadores de hanseníase, com idade variando de 15 a 85 anos. O diagnóstico se baseou em exames clínicos, biópsia da pele e baciloscopia da lesão. Todos classificados de acordo com Ridley e Joplin (1996), OMS e Ministério da Saúde conforme a Portaria 817 de 16.07.2000, sendo os pacientes das formas clínicas indeterminada e tuberculóide classificados como paucibacilares (PB) e os pacientes das formas clínicas virchoviana, dimorfo-virchoviana, dimorfo-tuberculóide classificados como multbacilares (MB) (ANEXO A).

O diagnóstico e a caracterização clínico-epidemiológica das diferentes formas clínicas foram realizados por um médico dermatologista com formação específica em hanseníase da Secretaria de Saúde do Município de Sobral. Os exames histopatológicos foram realizados no Laboratório de Biopsia do Centro Dermatológico Dona Libânia, em Fortaleza-CE. A baciloscopia foi realizada pelo Laboratório da Secretaria de Saúde do Município de Sobral.

Para os grupos controles foram selecionados 74 controles internos e 30 controles externos, todos indivíduos sem hanseníase. Os controles internos eram indivíduos contactantes que residiam no mesmo domicílio do caso índice e que não necessariamente possuíam vínculo familiar. Os controles externos não residiam no mesmo domicílio e foram selecionados aleatoriamente (ANEXO B e ANEXO C).

### **4.3 Coleta de sangue**

Foi realizada coleta de amostra de sangue dos casos índices e controles por

punção venosa em tubos com EDTA, para a análise do polimorfismo genético e tubos com gel separador, sem anticoagulante, para a obtenção de soro para a dosagem da IL-10. As amostras colhidas em gel separador foram deixadas coagular por 30 minutos e em seguida centrifugadas durante 10 minutos a 1000 x g. O soro obtido foi transferido para tubos tipo eppendorf e armazenados a  $\leq -20$  ° C até o descongelamento para a dosagem de IL-10 por ELISA.

#### 4.4 Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado através do “*Genomic Prep Blood DNA Isolation Kit*” (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. Dessa forma, foram adicionados 300  $\mu$ L de sangue em um tubo de 1,5 mL contendo 900  $\mu$ L de solução de lise de hemácias. Em seguida, a solução foi homogeneizada por inversão, incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugada durante 20 segundos a 13000-16000 xg. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi agitado vigorosamente e ressuspenso em 300  $\mu$ L de solução de lise de células. Posteriormente foram adicionados 100  $\mu$ L de solução de precipitação de proteínas à solução e essa foi agitada vigorosamente por 20 segundos e centrifugada a 13000-16000 xg por 3 minutos. O sobrenadante foi colocado em um tubo limpo contendo 300  $\mu$ L de isopropanol 100%, sendo a solução homogeneizada por 50 inversões e centrifugada a 13000-16000 xg por 2 minutos. Após isso, foi feito o descarte do sobrenadante e secagem do isopropanol. Em seguida, foram adicionados 300  $\mu$ L de etanol 70% com inversão do tubo para lavagem do DNA. A solução foi centrifugada a 13000-16000 xg por 2 minutos e a extração foi finalizada com secagem e o descarte de todo etanol e posterior adição de 100ul de solução de hidratação do DNA.

#### 4.5 Tipificação dos polimorfismos de IL-10.

Os (SNPs), do gene de IL-10 foram tipificados através de um kit que analisa as citocinas TNF- $\alpha$  -308G $\rightarrow$ A, IFN- $\gamma$  +874T $\rightarrow$ A, TGF- $\beta$ 1 códon 10 e códon 25 , IL-6 -174G $\rightarrow$ A e IL-10 -1082G $\rightarrow$ A, -819C $\rightarrow$ T, -592A $\rightarrow$ C, através da técnica de reação de cadeia da polimerase utilizando-se iniciadores de sequência específica (PCR-SSP) (One-Lambda; Canoga Park, CA, USA).

O material utilizado na tipificação das amostras foi levado a temperatura ambiente

dentre eles, água miliQ, tubos com D-Mix, placas e amostras de DNA, com exceção da enzima Taq Polimerase (Invitrogen) que foi mantida sob congelamento até seu uso. Em seguida, identificou-se com a numeração da respectiva amostra os tubos com D-Mix e a placa de tipificação (kits Cytgen, One-Lambda), adicionando-se 1 $\mu$ L de água MiliQ ao poço de controle negativo da placa. Foram adicionados 1 $\mu$ L de Taq polimerase (5U/ $\mu$ L) a cada tubo com D-Mix, fechando-se e agitando-se em vortex por 5 segundos, pipetando-se logo após 9 $\mu$ L da mistura D-Mix + Taq polimerase ao poço de controle negativo. Após homogeneização das amostras de DNA em vortex, foram adicionados 19 $\mu$ L da amostra ao tubo com D-Mix + Taq polimerase, fechando-os e agitando-os em vortex por 5 segundos. Nesse momento foram aliqüotados 10 $\mu$ L da solução de DNA-Taq polimerase-D-Mix, para cada um dos 15 poços restantes da placa contendo os iniciadores seqüência-específica, em que os primers encontram-se liofilizados em cada poço da placa, que foi levada ao termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems) e o DNA foi amplificado por intermédio da (PCR-SSP) usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial à 96°C por 130 segundos, 63°C por 60 segundos, seguido por 9 ciclos de 96°C por 10 segundos, 63°C por 60 segundos e 20 ciclos de desnaturação à 96°C por 10 segundos, anelamento à 59°C por 50 segundos, extensão à 72°C por 30 segundos e logo após 4°C antes do uso.

#### **4.6 Análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose**

Em uma balança analítica foram pesados 0,75 gramas de agarose à 1,5% (Invitrogen), acrescentando-se em um Erlenmeyer, 50 mL de tampão TBE 1X, onde uma manta térmica foi utilizada para completa dissolução da mistura, que foi colocada em uma forma apropriada com pentes que demarcaram os poços no gel. A análise do produto de amplificação foi feita após eletroforese, utilizando-se corrente elétrica de 150V, 400mA por 7 minutos (Electrophoresis Power Supply EPS 600 – Pharmacia Biotech), o qual foi visualizado em transiluminador luz UV (GE Healthcare) à 304nm, após adição de brometo de etídio na concentração final de 0,5 $\mu$ g/mL ao gel. Em seguida o gel foi fotografado para documentação, sendo tipificado os polimorfismos de genes das citocinas (TNF- $\alpha$  -308G>A, IFN- $\gamma$  +874T>A, TGF- $\beta$ 1 códon 10 e códon 25, IL-6 -174G>A e IL-10 -1082G>A, -819C>T, -592A>C).

#### 4.7 Interpretação dos resultados

Como controle interno de amplificação foi utilizado um par de iniciadores não alélicos, responsáveis pela amplificação do gene da  $\beta$ -globina, gerando um produto de amplificação de 440 pares de bases (pb). Quando o produto de amplificação estava presente e controle interno ausente ou não, considerava-se positivo para o grupo de alelos ou do alelo. O tamanho do fragmento do produto específico não foi considerado, pois a interpretação foi meramente baseada na presença ou ausência da amplificação do alelo ou do grupo específico.

A interpretação dos resultados referentes aos polimorfismos dos genes das citocinas estudadas foi realizada conforme a planilha fornecida pelo kit (one –Lambda, Canoga Park, CA, EUA).

#### 4.8 Dosagem de IL-10 por ELISA

A dosagem de IL-10 foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IL-10 presente no soro utilizando o kit BD OptEIA™ Set.

Utilizando-se microplacas para ELISA com 96 poços de alta ligação e fundo chato (Greiner bio-one), foram adicionados 50 $\mu$ L da diluição (1:250) de anticorpo de captura fornecido pelo kit de IL-10 em tampão de ligação preparado previamente para o ensaio. A diluição do anticorpo de captura não foi adicionada ao poço “branco” da reação. A placa foi incubada por uma noite a 4°C.

Em seguida foram desprezados os conteúdos dos poços e realizada três lavagens com 150  $\mu$ L de solução de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) previamente preparada. Após lavagem, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 100  $\mu$ L com o diluente da reação (PBS com 10% de Soro Bovino Fetal) preparado previamente. Foi realizada incubação da reação por uma hora a temperatura ambiente.

Após incubação foram desprezados os conteúdos dos poços e realizadas novas lavagens com 150  $\mu$ L de solução de lavagem por três vezes.

Em seguida adicionou-se 50  $\mu$ L das amostras e das diluições da solução padrão e da solução padrão pura a 500 pg/mL em duplicata nos poços da placa seguindo-se o desenho pré estabelecido para cada ensaio. As diluições da solução padrão foram 250 pg / mL, 125 pg / mL, 62,5 pg / mL, 31,3 pg / mL, 15,6 pg / mL e 7,8 pg / mL. Agitou-se levemente e

incubou-se por duas horas a temperatura ambiente. Após incubação foi desprezado o conteúdo dos poços e realizadas novas lavagens por cinco vezes.

Seguidamente adicionou-se 50µL em cada poço do reagente de trabalho da reação preparado previamente de acordo com as especificações do kit através da diluição 1:250 do anticorpo de detecção (*Biotinylated Anti-human IL-10*) e do reagente enzimático (*Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate*) em diluente do ensaio. Agitou-se levemente e incubou-se a placa por uma hora a temperatura ambiente.

Após incubação os conteúdos dos poços foram desprezados e realizou-se nova lavagem por sete vezes. Preparou-se a solução substrato quinze minutos antes da utilização em ambiente com pouca luminosidade, mantendo-a no escuro após preparação. Em seguida adicionou-se 50 µL do substrato em cada poço, mantendo a placa ao abrigo da luz por 30 minutos a temperatura ambiente. Após trinta minutos adicionou-se 50 µL de ácido fosfórico 80% (solução de parada) em cada poço. Em seguida realizou-se a leitura da densidade óptica em filtro de 450nm e conversão dos dados a pg/mL através do software Softmax®.

#### **4.9 Análise estatística**

As diferenças nos níveis da citocina foram comparadas dentro do espectro da hanseníase (PB e MB), dos controles externos, dos controles internos, dos genótipos e alelos encontrados nos grupos. Foram realizados testes de Kruskal- Wallis e Mann- Whitney através do programa GraphPad Prism versão 5.

## **5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto “Epidemiologia da hanseníase no Ceará: aprofundamento dos estudos imuno-epidemiológicos”, ao qual este estudo está vinculado, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará através do protocolo nº125/04.

## 6 RESULTADOS

Foram quantificadas as concentrações séricas de IL-10 com resultados expressos em pg/mL de 181 amostras sanguíneas. Das 181 amostras utilizadas, 77 foram de casos índices de hanseníase, 74 de indivíduos contactantes de hanseníase e 30 de indivíduos saudáveis que foram usados como controle negativo para o estudo (Tabela 1).

Dos 77 casos analisados, 42 eram do sexo masculino (54,5%) e 35 do sexo feminino (45,5%) com idades variando de 15 a 88 anos (mediana de 38 anos). Setenta e dois possuíam biópsia conclusiva e puderam ser divididos em 36 casos índices paucibacilares e 36 casos índices multibacilares. Cinco dos casos analisados tiveram achados inconclusivos na biópsia. O total de casos com análise genotípica definida foram 31, sendo estes divididos em: 11 casos com fenótipo baixo produtor de IL-10, 18 com fenótipo médio produtor e 02 com fenótipo alto produtor, definidos de acordo com Turner et al. (1997) (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas da concentração sérica de IL-10 ao se comparar o sexo masculino com o sexo feminino (Tabela 2).

Dos 74 contactantes analisados, 21 eram do sexo masculino (28,4%) e 53 do sexo feminino (71,6%) com idades variando de 15 a 82 anos (mediana de 36 anos). Sessenta e três eram contactantes de casos índices que possuíam biópsia conclusiva e puderam ser divididos em, 23 indivíduos contactantes de pacientes paucibacilares e 40 indivíduos contactantes de pacientes multibacilares. Trinta e três contactantes possuíam análise genotípica para IL-10, sendo divididos em: 20 com fenótipo baixo produtor, 12 com fenótipo médio produtor e 01 com fenótipo alto produtor, definidos de acordo com Turner et al. (1997) (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas da concentração sérica de IL-10 ao se comparar o sexo masculino com o sexo feminino (Tabela 2).

Dos 30 controles negativos utilizados no estudo, 16 eram do sexo masculino (53,4%) e 14 do sexo feminino (46,6%) com idades variando de 18 a 65 anos (mediana de 28 anos). 29 possuíam análise genotípica para a IL-10, sendo 16 com fenótipo baixo produtor, 11 com fenótipo médio produtor e 02 com fenótipo alto produtor de IL-10, definidos de acordo com Turner et al. (1997) (Tabela 1). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas da concentração sérica de IL-10 ao se comparar o sexo masculino com o sexo feminino (Tabela 2).

**Tabela 1-** Caracterização da população de estudo

Características	Grupo		
	Caso	Contactante	Controle
Sexo	N(%)	N(%)	N(%)
Masculino	42 (54,5%)	21 (28,4%)	17 (53,4%)
Feminino	35 (45,5%)	53 (71,6%)	14 (46,6%)
Idade (mediana)	38 anos	36 anos	28 anos
Forma			
Paucibacilar	36	23	*
Multibacilar	36	40	*
Fenótipo de IL-10			
Baixo	11	20	16
Médio	18	12	11
Alto	02	01	02
Total	77	74	30

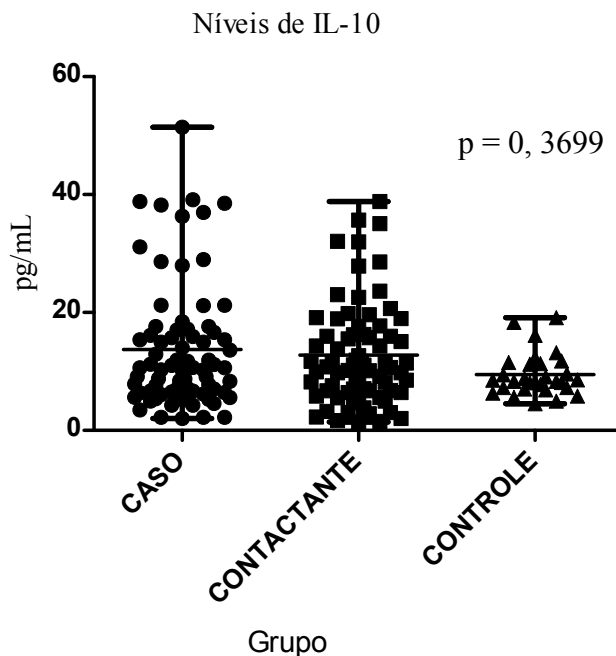
\*A classificação das formas paucibacilar e multibacilar não se aplica ao grupo controle.

**Tabela 2-** Análise das medianas da concentração sérica de IL-10 entre os sexos masculino e feminino nos grupos caso, contactante e controle.

Níveis IL-10 pg/mL (mediana)	Grupo		
	Caso	Contactante	Controle
Sexo			
Masculino	11,10	11,40	8,546
Feminino	10,16	9,55	8,302
P*	0,8459	0,5627	0,8516

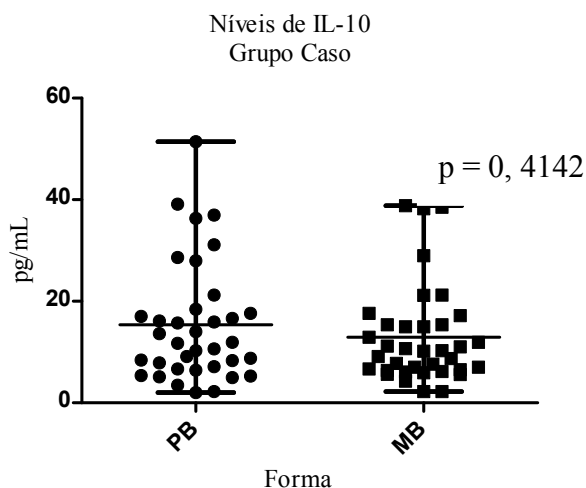
\*O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística.

A dosagem sérica de IL-10 variou de 2,0 a 51,42 pg/mL (mediana de 10,61 pg/mL) no grupo caso, de 1,407 a 38,85 pg/mL (mediana de 10,92 pg/mL) no grupo contactante e de 4,513 a 19,13 pg/mL (mediana de 8,421 pg/mL) no grupo controle. As análises das medianas dos níveis séricos de IL-10 foram comparadas entre os três grupos através do teste de Kruskal-Wallis e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com valor de p igual a 0,3699 (Figura 1).



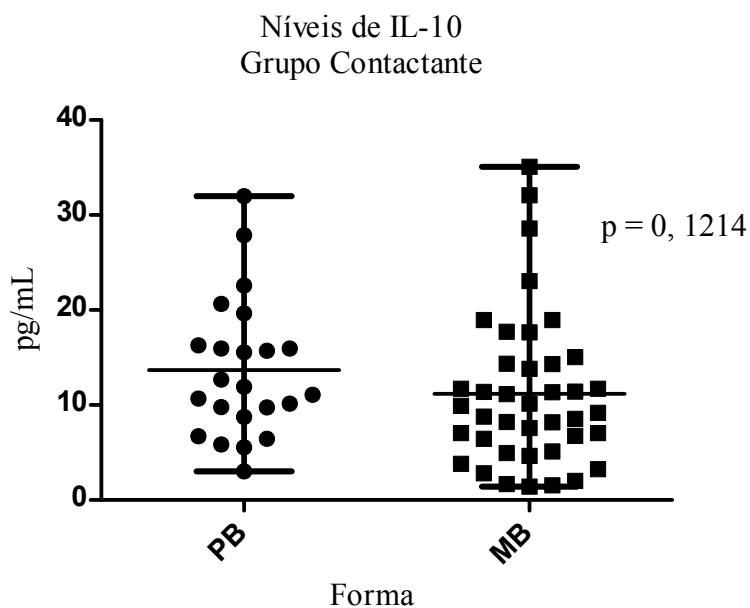
**Figura 1** - Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL nos grupos caso (mediana de 10,61 pg/mL), contactante (mediana de 10,92 pg/mL) e controle (mediana de 8,421 pg/mL)

No grupo caso a dosagem sérica de IL-10 variou de 2,0 a 51,42 pg/mL (mediana de 11,83 pg/mL) nos indivíduos classificados com a forma paucibacilar e de 2,236 a 38,84 pg/mL (mediana de 10,23 pg/mL) com a forma multibacilar. As análises das medianas dos níveis séricos de IL-10 foram comparadas entre os dois grupos através do teste de Mann-Whitney e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com valor de  $p$  igual a 0,4142 (Figura 2).



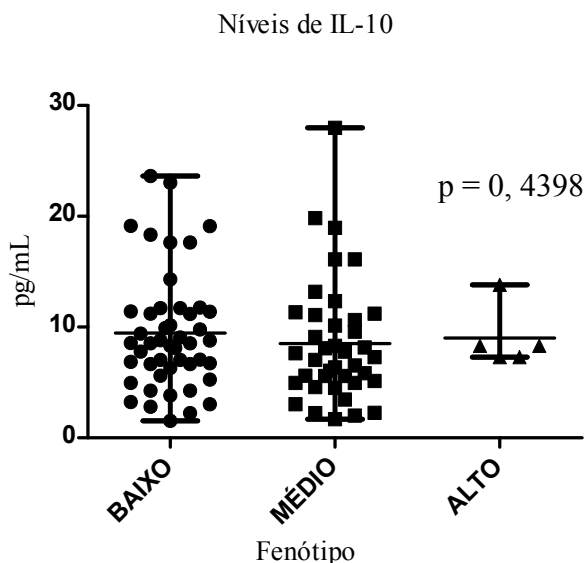
**Figura 2** - Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no grupo caso nas formas paucibacilar (mediana de 11,83 pg/mL) e multibacilar (mediana de 10,23 pg/mL)

A dosagem sérica de IL-10 variou de 3,031 a 31,99 pg/mL (mediana de 11,93 pg/mL) no grupo contactante da forma paucibacilar e de 1,407 a 35,08 pg/mL (mediana de 9,554 pg/mL) no grupo contactante da forma multibacilar. As análises das medianas dos níveis séricos de IL-10 foram comparadas entre os dois grupos através do teste de Mann-Whitney e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com valor de p igual a 0,1214 (Figura 3).



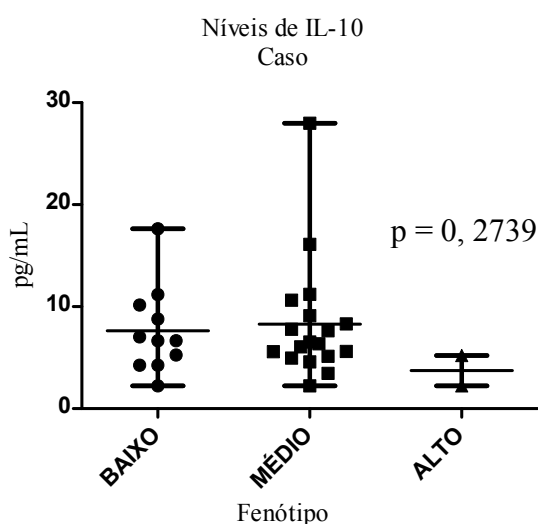
**Figura 3** - Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no grupo contactante da forma paucibacilar (mediana de 11,93) e multibacilar (mediana de 9,554 pg/mL)

A dosagem sérica de IL-10 variou de 1,537 a 23,63 pg/mL (mediana de 9,554 pg/mL) no fenótipo baixo produtor, de 1,680 a 27,98 pg/mL (mediana de 7,292 pg/mL) no fenótipo médio produtor e de 7,292 a 13,83 pg/mL (mediana de 8,306 pg/mL) no grupo fenótipo alto produtor de IL-10. As análises das medianas dos níveis séricos de IL-10 foram comparadas entre os fenótipos através do teste de Kruskal-Wallis e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com valor de p igual a 0,4398 (Figura 4).



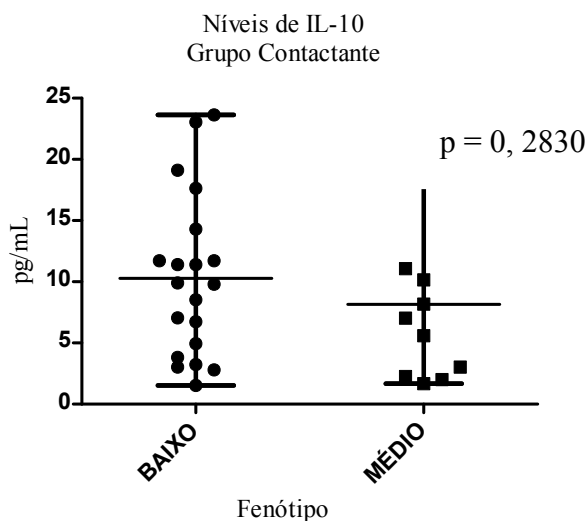
**Figura 4** - Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no fenótipo baixo (mediana de 9,554 pg/mL), médio (mediana de 7,292 pg/mL) e alto (mediana de 8,306 pg/mL) produtor da citocina

No grupo caso a dosagem sérica de IL-10 variou de 2,236 a 17,65 pg/mL (mediana de 6,653 pg/mL) no fenótipo baixo produtor, de 2,236 a 27,98 pg/mL (mediana de 6,458 pg/mL) no fenótipo médio produtor e de 2,236 a 5,219 pg/mL (mediana de 3,728 pg/mL) no grupo fenótipo alto produtor de IL-10. As análises das medianas dos níveis séricos de IL-10 foram comparadas entre os fenótipos através do teste de Kruskal-Wallis e não foi encontrada diferença estatisticamente significante, com valor de p igual a 0,2739 (Figura 5).



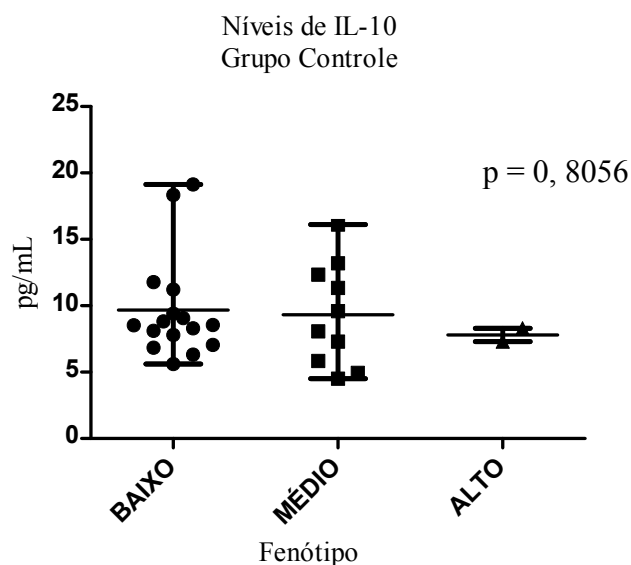
**Figura 5** - Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no fenótipo baixo (mediana de 6,653 pg/mL), médio (mediana de 6,458 pg/mL) e alto (mediana de 3,728 pg/mL) produtor da citocina no grupo caso

No grupo contactante a dosagem sérica de IL-10 variou de 1, 537 a 23,63 pg/mL (mediana de 9,857 pg/mL) no fenótipo baixo produtor e de 1,680 a 19,83 pg/mL (mediana de 7,306 pg/mL) no fenótipo médio produtor. As análises das medianas dos níveis séricos de IL-10 foram comparadas entre os fenótipos através do teste de Mann-Whitney e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com valor de p igual a 0, 2830 (Figura 6).



**Figura 6** - Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no fenótipo baixo (mediana de 9, 857 pg/mL) e médio (mediana de 7,306 pg/mL) produtor da citocina no grupo contactante

No grupo controle a dosagem sérica de IL-10 variou de 5, 615 a 19,13 pg/mL (mediana de 8, 546 pg/mL) no fenótipo baixo produtor, de 4,513 a 16,12 pg/mL (mediana de 8,838 pg/mL) no fenótipo médio produtor e de 7,292 a 8,306 pg/mL (mediana de 7,799 pg/mL) no grupo fenótipo alto produtor de IL-10. As análises das medianas dos níveis séricos de IL-10 foram comparadas entre os fenótipos através do teste de Kruskal-Wallis e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com valor de p igual a 0, 8056 (Figura 7).



**Figura 7** - Dosagem sérica de IL-10 em pg/mL no fenótipo baixo (mediana de 8, 546 pg/mL), médio (mediana de 8,838 pg/mL) e alto (mediana de 7,799 pg/mL) produtor da citocina no grupo controle

Ao analisar o fenótipo baixo produtor de IL-10 entre os três grupos, a dosagem sérica de IL-10 variou de 2,236 a 17,65 pg/mL ( mediana de 6,653 pg/mL) no grupo caso, de 1,537 a 23,63 pg/ mL (mediana de 9,857 pg/mL) no grupo contactante e de 5,615 a 19,13 pg/mL ( mediana de 8,546 pg/mL) no grupo controle. As análises das medianas dos níveis séricos de IL-10 foram comparadas entre os grupos através do teste de Kruskal- Wallis e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com valor de p igual a 0, 3202 (Tabela 3).

**Tabela 3** - Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10, no fenótipo baixo produtor da citocina nos grupos caso, contactante e controle

	Fenótipo baixo produtor			P*
	Caso	Contactante	Controle	
N	11	20	16	
Níveis de IL-10 pg/mL (mediana)	6, 653	9, 857	8, 546	0, 3202

\*O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para a análise estatística

Ao analisar o fenótipo médio produtor de IL-10 entre os três grupos, a dosagem sérica de IL-10 variou de 2,236 a 27,98 pg/mL ( mediana de 6,458 pg/mL) no grupo caso, de 1,680 a 19,83 pg/ mL (mediana de 7,036 pg/mL) no grupo contactante e de 4,513 a 16,12 pg/mL ( mediana de 8,838 pg/mL) no grupo controle. As análises das medianas dos níveis séricos de IL-10 foram comparadas entre os grupos através do teste de Kruskal-Wallis e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com valor de p igual a 0, 5012 (Tabela 4).

**Tabela 4** - Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10, no fenótipo médio produtor da citocina nos grupos caso, contactante e controle

	Fenótipo médio produtor			P*
	Caso	Contactante	Controle	
N	18	11	10	
Níveis de IL-10 pg/mL (mediana)	6, 458	7, 036	8, 838	0, 5012

\*O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para a análise estatística

A análise da frequência dos genótipos polimórficos de IL-10 mostrou que para o grupo caso, o genótipo mais freqüente foi o GCC/ATA (35,5%), para o grupo contactante os genótipos GCC/ATA (21,2%) e ATA/ATA (21,2%) e para o grupo controle, o genótipo ACC/ATA (31,0%) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Frequência dos genótipos de IL-10 nos grupos caso, contactante e controle

	Frequência dos genótipos polimórficos de IL-10					
	GCC/GCC	GCC/ACC	GCC/ATA	ACC/ACC	ACC/ATA	ATA/ATA
Caso	02 (6,4%)	07 (22,6%)	<b>11 (35,5%)</b>	03 (9,7%)	07 (22,6%)	01 (3,2%)
Contactante	01 (3%)	05 (15,2%)	<b>07 (21,2%)</b>	05 (15,2%)	08 (24,2%)	<b>07 (21,2%)</b>
Controle	02 (7,0%)	03 (10,3%)	08 (27,6%)	04 (13,8%)	<b>09 (31,0%)</b>	03 (10,3%)

No grupo caso, os níveis séricos de IL-10 variaram de 2,236 a 16,12 pg/mL (mediana de 6,372pg/mL) no genótipo GCC/ACC, de 3,464 a 27,98 pg/mL (mediana de 6,544 pg/mL) no genótipo GCC/ATA, de 6,653 a 8,781 pg/mL (mediana de 7,029 pg/mL) no genótipo ACC/ACC e de 2,236 a 17,65 pg/mL (Medina de 5,264 pg/mL) no genótipo ACC/ATA. Foi utilizado o teste de Kruskall-Wallis e não foi encontrada diferenças nos níveis séricos de IL-10 entre os genótipos do grupo caso, valor de p igual a 0,7744 (Tabela 6).

No grupo contactante, os níveis séricos de IL-10 variaram de 5,599 a 11,08 pg/mL (mediana de 9,157 pg/mL) no genótipo GCC/ACC, de 1,680 a 19,83 pg/mL (mediana de 3,031 pg/mL) no genótipo GCC/ATA, de 8,535 a 23,04 pg/mL (mediana de 11,41 pg/mL) no genótipo ACC/ACC, de 2,809 a 19,12 pg/mL (mediana de 6,902 pg/mL) no genótipo ACC/ATA e de 1,537 a 23,63 pg/mL (mediana de 9,914 pg/mL) no genótipo ATA/ATA. Foi utilizado o teste de Kruskall-Wallis e não foi encontrada diferenças nos níveis séricos de IL-10 entre os genótipos do grupo contactante, valor de p igual a 0,5094 (Tabela 6).

No grupo controle, os níveis séricos de IL-10 variaram de 8,078 a 16,12 pg/mL (mediana de 13,19 pg/mL) no genótipo GCC/ACC, de 4,513 a 12,33 pg/mL (mediana de 7,292 pg/mL) no genótipo GCC/ATA, de 6,852 a 19,13 pg/mL (mediana de 9,408 pg/mL) no genótipo ACC/ATA, de 5,615 a 8,535 pg/mL (mediana de 8,306 pg/mL) no genótipo ATA/ATA e de 6,319 a 9,07 pg/mL (mediana de 7,952 pg/mL) no genótipo ACC/ACC. Foi utilizado o teste de Kruskall-Wallis e não foi encontrada diferenças nos níveis séricos de IL-10 entre os genótipos do grupo contactante, valor de p igual a 0,3626 (Tabela 6).

**Tabela 6** - Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 em pg/ml dos genótipos polimórficos nos grupos caso, contactante e controle

Mediana dos níveis séricos em pg/mL dos genótipos polimórficos de IL-10							
	GCC/GCC	GCC/ACC	GCC/ATA	ACC/ACC	ACC/ATA	ATA/ATA	P*
Caso	#	6, 372	6, 544	7, 029	5, 264	#	0, 744
Contactante	#	9, 157	3, 031	11,41	6, 902	9, 914	0,5094
Controle	#	13,19	7, 292	7, 952	9, 408	8, 306	0,3626

# Mediana não calculada; \*O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para a análise estatística.

A análise dos genótipos da população geral estudada, mostrou que o nível sérico de IL-10 variou de 2,236 a 13,82 pg/mL (mediana de 7,292 pg/mL) no genótipo GCC/GCC, de 2,236 a 16,12 pg/mL (mediana de 9,157 pg/mL) no genótipo GCC/ACC, de 1,680 a 27,98 (mediana de 6,544 pg/mL) no genótipo GCC/ATA, de 6,319 a 23,04 pg/mL (mediana de 8,658pg/mL) no genótipo ACC/ACC, de 2,236 a 19,13pg/mL (mediana de 7,810pg/ mL) no genótipo ACC/ATA e de 1,537 a 23,63 pg/mL (mediana de 8,535 pg/mL) no genótipo ATA/ATA. As análises foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa, com valor de p igual a 0,5971 (Tabela 7).

**Tabela 7** - Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 por genótipo polimórfico na população geral estudada

	Genótipos polimórficos de IL-10						P*
	GCC/GCC	GCC/ACC	GCC/ATA	ACC/ACC	ACC/ATA	ATA/ATA	
N	05	14	25	12	24	11	
Níveis de IL-10 pg/mL (mediana)	7, 292	9, 157	6, 544	8, 658	7, 810	8, 535	0, 5971

\*O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para a análise estatística

A análise da distribuição dos alelos mostrou que os alelos mais frequentes nos grupos de caso, contactante e controle foram o -1082A, o -819C e o -592C (Tabela 8).

**Tabela 8** - Distribuição dos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A nos grupos caso, contactante e controle

	Caso	Contactante	Controle
N	62	66	58
-1082G	22 (35,5%)	14 (21,2%)	15 (26%)
<b>-1082<sup>a</sup></b>	<b>40 (64,5%)</b>	<b>52 (78,8%)</b>	<b>43(74%)</b>
<b>-819C</b>	<b>42 (67,7%)</b>	<b>37 (56%)</b>	<b>35 (60,3%)</b>
-819T	20 (32,3%)	29 (44%)	23 (39,7%)
<b>-592C</b>	<b>42 (67,7%)</b>	<b>37(56%)</b>	<b>35 (60,3%)</b>
-592 <sup>a</sup>	20 (32,3%)	29 (44%)	23 (39,7%)

A análise da produção de IL-10 por alelo no grupo caso mostrou que o nível sérico de IL-10 variou de 2,236 a 27,98 pg/mL, com medianas de 5,836 pg/mL para o alelo -1082G, de 5,145 pg/mL para o alelo -1082A, de 6,458 pg/mL para o alelo -819C, de 6,599 pg/mL para o alelo -819T, de 6,458 pg/mL para o alelo -592C e de 6,599 pg/mL para o alelo -592A. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos da citocina entre os alelos. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e valor de p foi igual a 0,9545 (Tabela 9).

**Tabela 9** - Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A do grupo caso

	Alelos polimórficos						P*
	-1082G	-1082A	-819C	-819T	-592C	-592A	
N	22	40	42	20	42	20	
Níveis IL-10 pg/mL (mediana)	5, 836	5, 145	6, 458	6, 599	6, 458	6, 599	0, 9545

\*O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para a análise estatística.

A análise da produção de IL-10 por alelo no grupo controle mostrou que o nível sérico de IL-10 variou de 4,513 a 19,13 pg/mL, com medianas de 8,192 pg/mL para o alelo -1082G, de 8,546 pg/mL para o alelo -1082A, de 8,306 pg/mL para o alelo -819C, de 8,535 pg/mL para o alelo -819T, de 8,306 pg/mL para o alelo -592C e de 8,535 pg/mL para o alelo -592A. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos da citocina entre os alelos. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e valor de p foi igual a 0, 9882 (Tabela 10).

**Tabela 10**- Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A do grupo controle

	Alelos polimórficos						P*
	-1082G	-1082A	-819C	-819T	-592C	-592A	
N	15	43	35	23	35	23	
Níveis IL-10 pg/mL (mediana)	8, 192	8, 546	8, 306	8, 535	8, 306	8, 535	0, 9882

\*O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para a análise estatística

A análise da produção de IL-10 por alelo no grupo contactante mostrou que o nível sérico de IL-10 variou de 1,680 a 23,63 pg/mL, com medianas de 8,167 pg/mL para o alelo -1082G, de 9,167 pg/mL para o alelo -1082A, de 9,799 pg/mL para o alelo -819C, de 7,036 pg/mL para o alelo -819T, de 9,799 pg/mL para o alelo -592C e de 7,036 pg/mL para o alelo -592A. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos da citocina entre os alelos. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e valor de p foi igual a 0,9882 (Tabela 11).

**Tabela 11-** Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A do grupo contactante

	Alelos polimórficos						P*
	-1082G	-1082A	-819C	-819T	-592C	-592A	
N	14	52	37	29	37	29	
Níveis IL-10 pg/mL (mediana)	8, 167	9, 167	9, 799	7, 036	9, 799	7, 036	0, 8984

\*O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para a análise estatística

Os níveis séricos de IL-10 do grupo caso foram analisados juntamente com os do grupo controle negativo para cada alelo relacionado ao estudo. Foi realizado o teste de Mann-Whitney e encontradas diferenças significantes para os alelos -1082A ( $p=0,0027$ ), -819C ( $p=0,0014$ ) e -592C ( $p=0,0014$ ) (Tabela 12).

**Tabela 12 -** Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A nos grupos caso e controle

	Níveis de IL-10 (mediana em pg/mL)		p*
	Caso	Controle	
-1082G	5, 836	8, 192	0, 0768
-1082 <sup>a</sup>	6, 653	8, 545	<b>0, 0027</b>
-819C	6, 458	8, 306	<b>0, 0014</b>
-819T	6, 599	8, 533	0, 0977
-592A	6, 599	8, 535	0, 0940
-592C	6, 458	8, 306	<b>0, 0014</b>

\*O teste de Mann- Whitney foi utilizado para a análise estatística.

Os níveis séricos de IL-10 do grupo contactante foram analisados juntamente com os do grupo controle negativo para cada alelo relacionado ao estudo. Foi realizado o teste de Mann-Whitney, porém não foram encontradas diferenças significantes entre os referidos alelos, com comparações onde o valor de p foi sempre maior que 0,05 (Tabela 13).

**Tabela 13** - Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A nos grupos contactante e controle

	Níveis séricos de IL-10 (mediana em pg/mL)		
	Contactante	Controle	P*
-1082G	8, 167	8, 192	0, 8271
-1082 <sup>a</sup>	9, 799	8, 546	0, 7545
-819C	9, 799	8, 306	0, 779
-819T	7, 036	8, 535	0, 3979
-592A	9, 799	8, 306	0, 7504
-592C	7, 036	8, 535	0, 3973

\*O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística.

Os níveis séricos de IL-10 para o grupo caso foram analisados juntamente com os do grupo contactante para cada alelo relacionado ao estudo. Foi realizado o teste de Mann-Whitney e encontradas diferenças estatisticamente significante para os alelos -819C (p= 0,0142) e -592C (p= 0,0169) (Tabela 14).

**Tabela 14** - Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A nos grupos caso e contactante

	Níveis séricos de IL-10 (mediana em pg/mL)		
	Caso	Contactante	p*
-1082G	5, 836	8, 167	0, 4732
-1082 <sup>a</sup>	6, 653	9, 799	0, 1968
-819C	6, 458	9, 799	<b>0, 0142</b>
-819T	6, 599	7, 036	0, 8787
-592A	6, 599	7, 036	0, 8787
-592C	6, 458	9, 799	<b>0, 0169</b>

\*O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística.

Os níveis séricos de IL-10 para os três grupos foram analisados para cada alelo relacionado ao estudo. Foi realizado o teste de Kruskal- Wallis e encontradas diferenças significativas para os alelos -819C ( $p= 0, 0042$ ) e -592C ( $p= 0, 0045$ ) (Tabela 15).

**Tabela 15** - Análise das medianas dos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082G, -1082A, -819C, -819T, -592C e -592A nos grupos caso, contactante e controle

Níveis séricos de IL-10 (mediana em pg/mL)				
	Caso	Controle	Contactante	p*
-1082G	5, 836	8, 192	8, 167	0, 2636
-1082 <sup>a</sup>	6, 653	8, 546	9, 799	0, 0625
-819C	6, 458	8, 306	9, 799	<b>0, 0042</b>
-819T	6, 599	8, 535	7, 036	0, 3812
-592C	6, 458	8, 306	9, 799	<b>0.0045</b>
-592 <sup>a</sup>	6, 599	8, 535	7, 036	0, 3725

\*O teste de Kruskal- Wallis foi utilizado para a análise estatística

## 7 DISCUSSÃO

A resolução de um processo infeccioso depende da capacidade do hospedeiro de montar uma resposta protetora, baseada principalmente no recrutamento de mecanismos efetores imunocompetentes e no estabelecimento da memória imunológica. Quando a resposta fica prejudicada, as infecções não são controladas. No entanto, respostas infecciosas agravadas podem provocar doenças ou lesões sistêmicas do tecido que podem levar a efeitos deletérios para o paciente. Em outras palavras, os mecanismos imunoregulatórios são necessários para dar forma à amplitude da resposta imunológica e prevenir as lesões associadas à infecção. A IL-10 é uma importante molécula imunomoduladora. Muitas bactérias, vírus, parasitas ou seus produtos são capazes de estimular a produção de IL-10 pelas células do hospedeiro. A IL-10 atua como uma citocina multifuncional em doenças infecciosas nos seres humanos, tanto na resposta inata como na resposta adaptativa, ela cria condições favoráveis para a persistência dos micróbios e doenças infecciosas crônicas. No entanto, o controle da resposta imunológica é também importante porque evita a reatividade de auto-antígenos e atenua a exagerada resposta imune que pode levar a lesões teciduais. Embora muitas pesquisas descrevam o efeito da regulação da IL-10 *in vitro* e em modelos animais de infecção, o seu papel nas situações clínicas ainda não foi completamente elucidado.

Neste estudo foi avaliada a produção de IL-10 em hanseníase e as análises estatísticas preliminares não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os níveis séricos da citocina nos três grupos estudados (Figura 1), nem tão pouco nos subgrupos classificados de acordo com a forma clínica em paucibacilar e multibacilar dos grupos caso e contactante (Figuras 2 e 3). Tais dados estão em desacordo com o estudo prévio realizado por Moubasher et al. (1998), que encontrou diferenças significantes dos níveis séricos de IL-10 entre os pólos da hanseníase ( TT e VV) e entre as formas reacionais quando comparadas às formas não reacionais, mostrando que a citocina está aumentada na forma VV e no ENH (MOUBASHER et al., 1998). Essa divergência provavelmente deve-se ao fato de que o número de amostras avaliadas neste estudo pode ter limitado a análise estatística destas comparações.

Os achados de Moubasher et al (1998) podem estar relacionados a capacidade da IL-10 de inibir a ativação do macrófago (DING et al., 2003), o que desvia a resposta para o pólo virchoviano e/ ou pela capacidade da citocina de promover a produção de anticorpos

pelas células B (ROUSSET et al., 1992), o que favorece as formas reacionais, ou ainda pela inibição das citocinas Th1 (DE WAAL MALEFYT et al., 1991), que promovem a inflamação e até certa medida é benéfica para o organismo. No entanto Iyer et al. (2007), em estudo realizado com 131 indivíduos com hanseníase, sendo 82 com ausência de formas reacionais e 49 com formas reacionais, não encontrou diferenças nos níveis séricos da citocina entre as formas clínicas e as formas reacionais. Observando altos níveis da IL-10 apenas no grupo com ENH quando comparado aos indivíduos saudáveis. O que contribui mais uma vez para se pensar que nas formas reacionais os níveis séricos da citocina estão realmente elevados. Da mesma forma, Lima et al. (2000) encontrou altos níveis da citocina em PBMCs de pacientes com a forma virchoviana pós- tratamento estimulados pelo *M. leprae*. No presente estudo não foram incluídas as formas reacionais da hanseníase, nem tão pouco foram avaliados os níveis séricos da citocina pós tratamento, uma vez que nessas condições o perfil imunológico dos pacientes é diferenciado. Tal fato pode ter limitado o presente estudo quanto à caracterização dos níveis séricos de IL-10. No entanto, os dados obtidos por Iyer et al. (2007) corroboram com o presente trabalho, que mostrou não haver diferenças nos níveis séricos da citocina entre as formas clínicas da hanseníase, classificadas aqui apenas como paucibacilar e multibacilar. Misra et al. (1995) em um estudo *in vitro*, mostrou que a IL-10 está aumentada na forma multibacilar da doença, contudo esse tipo de estudo não traduz fielmente a dinâmica que é a resposta imunológica *in vivo*.

No grupo caso, o genótipo GCC/ATA foi o mais frequente, diferindo do que foi encontrado no estudo realizado por Thye et al. (2009), que avaliou os níveis séricos de IL-10 associando-os aos haplótipos da citocina de 2010 indivíduos com tuberculose pulmonar na África. No grupo caso de Thye et al. (2009) observou-se maior frequência do haplótipo ACC com níveis séricos inferiores de IL-10 no genótipo ACC/ACC (mediana de 46,9 pg/mL) em comparação com o genótipo GCC/GCC (mediana de 74,4 pg/mL) (THYE et al., 2009). O presente estudo difere do estudo realizado por Thye et al. (2009), na espécie de *Mycobacterium* estudada, na frequência dos genótipos apresentados, tendo em vista que se tratam de duas populações etnicamente diferentes e no tamanho da população. No presente estudo a baixa frequência do genótipo GCC/GCC não permitiu relacioná-lo com os níveis séricos da citocina. Embora as medianas dos níveis séricos da IL-10 tenham diferido entre os genótipos dos três grupos, as diferenças não foram estatisticamente significantes, provavelmente pela limitação do tamanho das amostras (Tabela 5).

As associações entre os níveis séricos de IL-10 e os fenótipos baixo, médio e alto produtor da citocina (Figura 4), classificados de acordo com o estudo *in vitro* de Turner et al. (1997) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, mostrando que *in vivo* a complexidade da resposta imune não pode ser associada apenas com o que se caracteriza *in vitro* para uma determinada citocina, pois há uma série de outros fatores envolvidos na resposta. Embora que, o número de amostras possa ter limitado o estudo, já que para a análise dos genótipos foram analisados 31 indivíduos no grupo caso, 33 no grupo contactante e 29 no grupo controle. Ao estratificar esses números em fenótipos baixo, médio e alto produtor da citocina, reduzem-se ainda mais as amostras analisadas. No grupo caso foi possível observar uma diminuição dos níveis séricos de IL-10 nos fenótipos baixo e médio produtor (Tabelas 4 e 5), em relação aos grupos contactante e controle. Contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa provavelmente pela restrição do número de amostras analisadas.

Taudorf et al. (2008) em um estudo *in vivo*, injetou Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* por via venosa em 200 indivíduos saudáveis moradores de Copenhague. Com o objetivo de simular um modelo de inflamação de baixo grau de doença crônica, relacionou os polimorfismos de várias citocinas com os respectivos níveis séricos. Para todas as citocinas mencionadas no estudo, não foram encontradas relações entre os alelos polimórficos e a variabilidade dos níveis séricos propostos por estudos prévios que reportam que a suscetibilidade genética influencia a produção das citocinas. Para a IL-10, Taudorf et al. (2008) analisou os SNPs -592 e -1082 e não relacionou os alelos com a diminuição e/ou aumento da citocina após o estímulo. Esses dados corroboram com o presente estudo, pois não foram encontradas diferenças significativas nos níveis séricos de IL-10 por alelo nos grupos (Tabelas 6, 7 e 8). Mostrando que os alelos produzem níveis séricos homogêneos da citocina *in vivo*, pelo menos nos modelos estudados.

A análise da frequência dos alelos mostrou que os mais frequentes foram o -1082A, -819C e o -592C (Tabela 5), em todos os três grupos estudados estando de acordo com estudos anteriores que mostram a maior frequência desses alelos na população brasileira (MORAES et al., 2006). Apesar de não ter sido o objetivo desse estudo, as frequências alélicas e genotípicas realizadas em estudo prévio por Lima Costa (2008), não mostraram alelos com características suscetíveis ou protetoras à hanseníase na população estudada (LIMA COSTA, 2008).

A análise estatística dos alelos mostrou diferenças significantes nos níveis séricos de IL-10 nos alelos -1082A, -819C e -592C do grupo caso quando comparado ao controle

(Tabela 9) e dos alelos -819C e -592C do grupo caso quando comparado ao contactante (Tabela 10). Embora os níveis séricos de IL-10 do grupo caso em todos os alelos tenham sido inferiores quando comparados aos grupos controle e contactante, diferenças estatisticamente significantes foram observadas apenas nos alelos -1082A, -819C e -592C, possivelmente devido à maior frequência destes no grupo estudado.

Pode-se especular que o estímulo antigênico micobacteriano que ocorre na infecção em si, seja diferente do que ocorre com o indivíduo contactante, que recebe o desafio antigênico, mas não desenvolve a doença e isso, em níveis séricos, o coloca em patamares iguais ao indivíduo controle (Tabela 12). Embora se deva ressaltar que esse indivíduo controle negativo para a exposição ao bacilo é um indivíduo residente de área endêmica. O que por sua vez possa explicar níveis tão homogêneos da citocina na população total estudada (Figura 1).

Por outro lado, o estímulo antigênico capaz de desenvolver a doença foi responsável por suscitar uma resposta relacionada aos alelos polimórficos, com conseqüente diminuição dos níveis séricos de IL-10, deixando claro que após o contato com o *M. leprae*, os alelos se tornam importantes e responsáveis pela diminuição dos níveis séricos da citocina. Isso talvez ocorra porque a IL-10 seja capaz de impedir a apresentação de antígenos uma vez que inibe a expressão de MHC C-II, e em baixos níveis, isso pode ter um efeito contrário. Fazendo com que baixos níveis de IL-10 estimulem mais ainda a apresentação antigênica e o estabelecimento da infecção (Tabela 11). Seriam necessários estudos de associação dos polimorfismos MHC C-II e os níveis de IL-10 para comprovar essa hipótese.

Vários são os estudos que tentam associar os polimorfismos de IL-10 a diversas doenças e em diferentes populações, acreditando ser esse polimorfismo determinante para o desenvolvimento e/ou proteção às doenças. Contudo, os resultados são contraditórios, mostrando que o polimorfismo em si talvez não seja tão definitivo. Em adição há poucos estudos que tentam correlacionar os polimorfismos com a produção sistêmica das citocinas. E muitas vezes essa produção é associada com base em estudos *in vitro*, que não levam em conta a grande demanda de outros fatores que estão envolvidos na resposta a um determinado patógeno. O que ficou claro nesse estudo é que é necessária a instalação de infecção para que se possa observar diferenças nos níveis séricos entre os alelos estudados. Levando-se a crer que a influência genética pode determinar sim níveis diferentes de citocinas, entretanto é necessário que o estímulo antigênico seja superior.

Várias outras regiões polimórficas têm sido estudadas tanto na hanseníase como em outras doenças e os resultados são inconsistentes. Não há um senso comum de como as

regiões polimórficas podem estar associadas ao desenvolvimento da doença. Talvez isso, em parte, se deva pela grande diversidade étnica das populações estudadas. Por outro lado, podem haver outras regiões promotoras da citocina que não estejam sendo estudadas, talvez até por não terem sido identificadas até o momento. Esse estudo limitou-se a avaliar os SNPs da região promotora proximal, não contemplando a região promotora distal, que em um estudo no Rio de Janeiro foi associado com a proteção à hanseníase (MORAES et al., 2004) e que de acordo com Gibson et al. (2001) possui outras novas regiões, que no seu estudo foi possível associar com o desenvolvimento do lúpus.

As ações individuais das citocinas são complexas, uma vez que elas agem em um microambiente repleto de uma população heterogênea de células em diferentes estágios de ativação (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). A investigação do comportamento *in vivo* das citocinas torna qualquer associação dos fenômenos relacionados à resposta imunológica nas doenças um grande desafio.

## 8 CONCLUSÕES

- Os genótipos polimórficos da região promotora de IL-10, -1082G>A, -819C>T, -592A>C não influenciaram a produção e/ou o desfecho da infecção pelo *M. leprae*.
- Os alelos -1082A, -819C e -592C determinaram menor produção de IL-10 em indivíduos com hanseníase.
- Os polimorfismos genéticos estudados não influenciam os fenótipos baixo, médio e alto produtor da citocina em níveis sistêmicos.
- O desenvolvimento das formas pauci e multibacilar não está relacionado ao polimorfismo da região promotora de IL-10.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 486 p.
- ABEL, L.; SANCHEZ, F.O.; OBERTI, J.; THUC, N.V.; HOA, L.V.; LAP, V.D.; SKAMENE, E.; LAGRANGE, P.H.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAM1 gene. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n.1, p.133-145, 1998.
- ALBERT, M. L.; JEGATHESAN, M.; DARNELL, R. B. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 11, p.1010-1017, 2001.
- AMIRZARGAR, A. A.; REZAEI, N.; JABBARI, H.; DANESH, A. A.; KHOSRAVI, F.; HAJABDOLBAGHI, M.; YALDA, A.; NIKBIN, B. Cytokine single nucleotide polymorphisms in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. **Eur. Cytokine Netw.**, v.17, n. 2, p. 84-89, 2006.
- ANTUNES, S. L.; LIANG, Y.; NERI, J. A.; SARNO, E.N.; HAAK-FRENDSCHO, M.; JOHANSSON, O. Mast cell subsets and neuropeptides in leprosy reactions. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 61, n.2, p. 208-219, 2003.
- ARNOLDI, J.; GERDES, J.; FLAD, H. D. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. **Am. J. Pathol.**, v. 137, n. 4, p.749-753, 1990.
- BELGAUMKAR, V. A.; GOKHALE, N. R.; MAHAJAN, P. M.; BHARADSWAJ, R.; PANDIT, D. P.; DESHPANDE, S. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. **Lepr. Rev.**, v. 78, n. 3, 2007.
- BLOOMFIELD, M. **Hymns of the Atharva Veda**. Whitefish, MT: Kessinger Publishing, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Brasil reduz casos de hanseníase em menores de 15 anos. **Bol. Eletr.** Secretaria de Vigilância em Saúde, ed. 69, jan. 2010. <<http://portal.saude.gov.br/svs>> Acesso em: 1 mar. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle da hanseníase**: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: DNDS/NUTES, 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. **Relatório de situação**: Ceará. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. SPS/DTGE/ATDS. **Instruções Normativas do Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase**. Brasília, 2000.
- BRENNAN, P. J.; BARROW, W. W. Evidences for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.48, n.4, p.382-387, 1980.

BROWNE, S. G. Leprosy--an imported disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 2, p. 223-227, 1970.

BUSCHMAN, E.; VIDAL, S.; SKAMENE, E.; Nonspecific resistance to Mycobacteria: the role of the Nramp1 gene. **Behring. Inst. Mitt.**, v. 99, p.51-57, 1997.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 56, n.4, p. 315-325, 1994.

CEARÁ. Secretaria de Estado da Saúde. Núcleo de Atenção à Saúde/Adulto e Idoso. **Boletim Estadual de Avaliação Epidemiológica e Operacional da hanseníase no Ceará ano 2002**, Fortaleza, 2003.

CEARÁ. Secretaria de Saude. Situação Epidemiológica de Hanseníase no Ceará. **Informe Epidemiológico de Hanseníase**, jan. 2010. Disponível em:<<http://portal.saude.ce.gov.br/saude>>. Acesso em: 1 mar. 2010.

CHIPLUNKAR, S. V.; DESHMUKH, M. V.; SAMSON, P. D.; BUTLIN, R.; BHATKI, W. S.; CHULAWALLA, R. G.; DEO, M. G.; GANGAL, S. G. Natural killer-cell-mediated and antibody-dependent cellular cytotoxicity in leprosy. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, v. 58, n. 2, p. 334-341, 1990.

COCHRANE, R. G.; DAVEY, T. F. **Leprosy in theory and practice**. 2nd ed. Bristol: Wright and Sons, 1964.

COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P.R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M-A.; RUTHERFORD, K. M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; BARRELL, B.G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n.6823, p. 1007-1011, 2001.

CONCHA, R.M.; COSSIO, T. M. L.; SALAZAR, S. I.; FICH, F. S.; PÉREZ, C. C.; GONZÁLEZ, S. B. Enfermedad de Hansen: Revisión a propósito de um caso. **Rev. Chil. Infectol.**, v.25, n.1, p.64-69, 2008.

CONVERSE, P. J.; BJUNE, G. Natural killer (NK) cell activity and reversal reaction in leprosy. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, v. 54, n. 4, p.503-509, 1986.

Cookson, w. o.; Ubhi, b.; Lawrence, r.; Abecasis, g. r.; Walley, a. j.; Cox, h. e.; Coleman, r.; Leaves, n.i.; Trembath, r.c.; Moffatt, m. f.; Harper, j. i. Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. **Nat. Genet.**, v. 27, n. 4, p. 372-373, 2001.

CRAWLEY, E.; KAY, R.; SILLIBOURNE, J.; PATEL, P.; HUTCHINSON, I.; WOO, P. Polymorphic haplotypes of interleukin- 10 5' flanking region determine variable interleukin-

10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.42, n. 6, p.1101-1108, 1999.

CREE, I. A.; COGHILL, G.; SWANSON BECK, J. Mast cells in leprosy skin lesions. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, n. 3 ,196-200, 1990.

CUNHA, M. G. S. **Episódios reacionais e relação com recidiva em doentes com hanseníase multibacilar tratados com diferentes esquemas terapêuticos.** 2001. 163 f. Tese (Doutorado em Medicina). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2001.

CUSH, J. J.; SPLAWSKI, J. B.; THOMAS, R.; MCFARLIN, J. E.; SCHULZE-KOOPS, H.; DAVIS, L. S, FUJITA, K.; LIPSKY, P. E. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**,v.38, n.1,p. 96–104, 1995.

DE VRIES, R. R.; MEHRA, N. K.; VAIDYA, M. C.; GUPTE, M. D.; MEERA KHAN, P.;VAN ROOD, J. J. HLA-linked control of susceptibility to tuberculoid leprosy and association with HLA-DR types. **Tissue Antigens**, v. 16, n.4, p. 294-304, 1980.

DE WAAL MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M. G.; TE VELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.**, v. 174, n. 4, p. 915-924, 1991.

DEL PRETE, G. F.; DE CARLI, M.; RICCI, M.; ROMAGNANI, S. Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. **J. Exp. Med.**, v.174, n. 4, p.809-813, 1991.

DERKX, B.; MARCHANT, A.; GOLDMAN, M.; BIJLMER, R.; VAN DE VENTNER, S. High levels of interleukin-10 during the initial phase of fulminant meningococcal septic shock. **J. Infect. Dis.**, v.171, p. 229–239, 1995.

DESIKAN, K.V.; MUKHERJEE, A.; RAMU,G.; TIWARI, V.D. Sequential histological study of lepromin reaction. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, v. 51, n. 4, p.473-480, 1983.

DHARMENDRA. Notes on leprosy. The Ministry of Health: Govt. of India, 1969.

DING, L.; LINSLEY, P. S.; HUANG, L. Y.; GERMAIN, R. N., SHEVACH, E. M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **J. Immunol.**, vol. 151, n. 3, p. 1224-1234, 1993.

DORNELLES, L. N.; PEREIRA-FERRARI, L.; MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 145, n.3, p. 463-468, 2006.

DZIERZYKRAY-ROGALSKI, T. Paleopathology of the Ptolemaic inhabitants of Dakhleh Oasis (Egypt). **J. Hum. Evol.**, v. 9, n.1, p. 71-74, 1980.

EHLERS, M. R.; DAFPE, M. Interactions between Mycobacterium tuberculosis and host cells: are mycobacterial sugars the key? **Trends Microbiol.**, v. 6, n.8, p.328-335, 1998.

ESKDALE, J.; KEIJSERS, V.; HUIZINGA, T.; GALLAGHER, G. Microsatellite alleles and singlenucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. **Genes Immun.**, v. 1, n.2, p.151-155, 1999.

FILLATREAU, S; SWEENIE, C. H; MCGEACHY, M. J; GRAY, D; ANDERTON S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. **Nat. Immunol.**, v. 3, n.10, p. 944-950, 2002.

FITNESS, J.; FLOYD, S.; WARNDORFF, D. K.; SICHALI, L.; MWAUNGULU, L.; CRAMPIN, A. C.; FINE, P. E.; HILL, A. V. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 3, p. 330-340, 2004.

FRANCESCHI, D. S.; MAZINI, P. S.; RUDNICK, C. C.; SELL, A. M.; TSUNETO, L. T.; RIBAS, M. L.; PEIXOTO, P. R.; VISENTAINER, J. E. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **Int. J. Infect Dis.**, v.13, n. 4, p.493-498, 2008.

FREI, K.; NADAL, D.; PFI STER, H. W.; FONTANA, A. Listeria meningitis: identification of a cerebrospinal fluid inhibitor of macrophage listericidal function as interleukin 10. **J. Exp. Med.**, v.178, n.4, p.1255-1261, 1993.

GARRED, P.; HARBOE, M.; OETTINGER, T.; KOCH, C.; SVEJGAARD, A. Dual role of mannanbinding protein in infections: another case of heterosis? **Eur. J. Immunogenet.**, v. 21, n.2, p.125-131, 1994.

GEIJTENBEEK, T. B.; ENGERING, A.; VAN KOOYK, Y. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. **J. Leukoc. Biol.**, v. 71, n. 6, p.921-931, 2002.

Geijtenbeek, t. b.; Van Vliet, s.j.; Koppel, e. a.; Sanchez-Hernandez, m.; Vandenbroucke-Grauls, c.m.; Appelmelk, b.; Van Kooyk, y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J. Exp. Med.**, v. 197, n.1, p. 7-17, 2003.

GIBSON, A. W.; EDBERG, J. C.; WU, J.; WESTENDORP, R.; HUIZINGA, T.W.; KIMBERLY, R. P. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. **J. Immunol.**, v.166, n.6, p.3915-3922, 2001.

GILLIET, M.; LIU, Y. J. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 6, p. 695-704, 2002.

GOMES, G. I.; NAHN, E. P.; SANTOS, R. K.; DA SILVA, W. D.; KIPNIS, T. L. The functional state of the complement system in leprosy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 4, p. 605-610, 2008.

GONG, J. H.; ZHANG, M.; MODLIN, R. L.; LINSLEY, P. S.; IYER, D.; LIN, Y.; BARNES, P. F. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. **Infect Immun.**, v. 64, n.3, p. 913-918, 1996.

GORODEZKY, C.; ALAEZ, C.; MUNGUÍA, A.; CRUZ, R.; VAZQUEZ, A.; CAMACHO, A.; FLORES, O.; RODRIGUEZ, M.; RODRIGUEZ, O. Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. **Tuberculosis (Edinb.)**, v. 84, n.1-2, p.82-92, 2004.

Haanen, j. b.; de Waal Malefi jt, r.; Res, p. c.; Kraakman, e. m.; Ottenhoff, t. h.; de Vries, r. r.; Spits, h. Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. **J. Exp. Med.**, v. 174, n. 3, p.583-592, 1991.

Hagge, d. a.; Ray, n. a.; Krahenbuhl, j. l.; Adams, l. b. An in vitro model for the lepromatous leprosy granuloma: fate of Mycobacterium leprae from target macrophages after interaction with normal and activated effector macrophages. **J. Immunol.**, v.72, n. 12 , p. 7771-7779, 2004.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman e Gilman**: as bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1996.

HATAGIMA, A.; OPROMOLLA, D. V.; URA, S.; FEITOSA, M. F.; BEIGUELMAN, B.; KRIEGER, H. No evidence of linkage between Mitsuda reaction and the NRAM1 locus. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, v. 69, n.2, p. 99-103, 2001.

HULSE, E. V. Leprosy and Ancient Egypt. **Lancet**, v.2, n.7785, p. 1024-1025, 1972.

HUMPHRES, R. C.; GELBER, R. H.; KRAHENBUHL, J. L. Suppressed natural killer cell activity during episodes of erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 49, n.3, p. 500-508,1982.

HUNTER, S. W.; GAYLORD, H.; BRENNAN, P.J. Structure and antigenicity of the phosphorylated antigens from the leprosy and tubercle bacilli. **J. Biol. Chem.**, v.261, n. 26, p. 12345-12351, 1986.

HURME, M.; LAHDENPOHJA, N.; SANTTILA, S. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune disease. **Ann. Med.**, v. 30, n.5, p.469-473, 1998.

ITOH, K.; HIROHATA, S. The role of IL-10 in human B-cell activation, proliferation and differentiation. **J. Immunol.**, v. 154, n. 9, p. 4341-4350, 1995.

Iyer, a. m .; Mohanty, k. k.; van Egmond, d.; Katoch, k.; Faber, w. r.; Das, p. k.; Sengupta, u. Leprosy-specific B-cells within cellular infiltrates in active leprosy lesions. **Hum. Pathol.**, v. 38, n.7, p.1065-1073, 2007.

IYER, A. M.; HATTA, M.; USMAN, R.; LUITEN, S.; OSKAM, L.; FABER, W.; GELUK, A.; DAS, P. Serum levels of interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, soluble interleukin-6 and soluble cell activation markers for monitoring response to treatment of leprosy reactions. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 150, n. 2, p.210-216, 2007.

Jamieson, s. e.; Miller, e. n.; Black, g. f.; Peacock, c. s.; Cordell, h. j.; Howson, j. m.; Shaw, m. a.; Burgner, d.; Xu, w.; Lins-Lainson, z.; Shaw, j. j.; Ramos, f.; Silveira, f.; Blackwell, j. m. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. **Genes Immun.**, v.5, n. 1, p. 46-57, 2004.

Jayalakshmi, P. Mast cells in lepromatous leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 63, n. 2, p. 291-293, 1995.

JOPLING, W. H.; MCDOUGALL, A. C. **Handbook of leprosy**. 4th ed. Oxford, England: Heinemann Professional Publishing, 1988.

KALINSKI, P.; MOSER, M. Consensual immunity: success-driven development of Thelper-1 and T-helper-2 responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 3,251-260, 2005.

KANG, T. J.; CHAE, G. T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, v. 31, n.1, p. 53-8, 2001.

KAPLAN, D. L. Biblical leprosy: an anachronism whose time has come. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 28, n.3, p. 507-510, 1993.

KAPLAN, G.; COHN, Z. A. Leprosy and cell-mediated immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 91-96, 1991.

KIM, J.; UYEMURA, K.; VAN DYKE, M. K.; LEGASPI, A. J.; REA, T. H.; SHUAI, K.; MODLIN, R. L. A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. **J. Immunol.**, v. 167, n. 2, p. 779-786, 2001.

KINDLER, V.; SAPPINO, A. P.; GRAU, G. E.; PIGUET, P. F.; VASSALLI, P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, v. 56, n. 5, p.731-740, 1989.

KING, C. L.; MEDHAT, A.; MALHOTRA, I.; NAFEH, M.; HELMY, A.; KHAUDARY, J.; IBRAHIM, S.; EL-SHERBINY, M.; ZAKY, S.; STUPI, R. J.; BRUSTOSKI, K.; SHEHATA, M.; SHATA, M. T. Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. **J. Immunol.**, v. 156, n. 12, p. 4715-4721, 1996.

KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 9, p. 697-709, 2003.

Krutzik, S. R.; Modlin, R. L. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. **Semin. Immunol.**, v. 16, n.1, p. 35-41, 2004.

Krutzik, s. r.; Ochoa, m. t.; Sieling, p. a.; Uematsu, s.; Ng, y. w.; Legaspi, a.; Liu, p. t.; Cole, s. t.; Godowski, p.j.; Maeda, y.; Sarno, e.n.; Norgard, m.v.; Brennan, p.j.; Akira, s.; Rea, t.h.; MODLIN, R. L. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat. Med.**, v. 9, n. 5, p. 525-532, 2003.

KRUTZIK, S. R.; TAN, B.; LI, H.; OCHOA, M. T.; LIU, P. T.; SHARFSTEIN, S. E.; GRAEBER, T. G.; SIELING, P. A.; LIU, Y. J.; REA, T. H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R.

L. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat. Med.**, v.11, n.6, p.653-660, 2005.

KÜHN, R.; LÖHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MÜLLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n.2, p. 263-274, 1993.

KUMAGAI, Y.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pathogen recognition by innate receptors. **J.Infect. Chemother.**, v. 14, n. 2, p.86-92, 2008.

LECHAT, M. F. The paleoepidemiology of leprosy: an overview. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, v. 67, n. 4, p. 460-470, 1999.

LEE, S. B.; KIM, B. C.; JIN, S. H.; PARK, Y. G.; KIM, S. K.; KANG, T. J.; CHAE, G. T. Missense mutations of the interleukin-12 receptor beta 1 (IL12RB1) and interferon-gamma receptor 1 (IFNGR1) genes are not associated with susceptibility to lepromatous leprosy in Korea. **Immunogenetics**, v. 55, n. 3, p. 177-181, 2003.

LEHMANN, A. K.; HALSTENEN, A.; SORNES, S.; ROKKE, O.; WAAGE, A. High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. **Infect. Immun**, v. 63, n. 6, p. 2109–2112, 1995.

LEVEE, G.; SCHURR, E.; PANDEY, J. P. tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1-beta and immunoglobulin (GM an KM) polymorphisms in leprosy. A linkage study. **Exp. Clin. Immunogenet.**, v.14, n. 2, p.160- 165, 1997.

LI, C.; CORRALIZA, I.; LANGHORNE, J. A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection in mice. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4435-4442, 1999.

LIMA COSTA, L. N. G. **Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas TNF-  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-10 em hanseníase.** Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LIMA, M. C.; PEREIRA, G. M.; RUMJANEK, F. D.; GOMES, H. M.; DUPPRE, N.; SAMPAIO, E. P.; ALVIN, I. M.; NERY, J. A.; SARNO, E. N.; PESSOLANI, M. C. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. **Scand. J. Immunol.**, v.51, n.4, p. 419-428, 2000.

LLORENTE, L.; ZOU, W.; LEVY, Y.; RICHAUD-PATIN, Y.; WIJDENES, J.; ALCOCER-VARELA, J.; MOREL-FOURRIER, B.; CLAUDE BROUET, J.; ALARCON-SEGOVIA, D.; GALANAUD, P.; EMILIE, D. Role of interleukin-10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. **J. Expl. Med.**, v. 181, n.3, p.839–844, 1995.

LÜSCHER, U.; FILGUEIRA, L.; JURETIC, A.; ZUBER, M.; LÜSCHER, N. J.; HEBERER, M.; SPAGNOLI, G. C. The pattern of cytokine gene expression in freshly excised human metastatic melanoma suggests a state of reversible anergy of tumour infiltrating lymphocytes. **Intl. J. Cancer**, v. 57, n.4, p.612–619, 1994.

- MAHANTY, S.; RAVICHANDRAN, M.; RAMAN, U.; JAYARAMAN, K.; KUMARASWAMI, V.; NUTMAN, T. B. Regulation of parasite antigen-driven immune responses by interleukin-10 (IL-10) and IL-12 in lymphatic filariasis. **Infect. Immun.**, v. 65, n.5, p. 1742-1747, 1997.
- MALHOTRA, D.; DARVISHI, K.; SOOD, S.; SHARMA, S.; GROVER, C.; RELHAN, V.; REDDY, B.S.; BAMEZAI, R.N. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. **Hum. Genet.**, v. 118, n. 2, p. 295-300, 2005.
- MARIOTTI, V.; DUTOUR, O.; BELCASTRO, M. G.; FACCHINI, F.; BRASILI, P. Probable early presence of leprosy in Europe in a Celtic skeleton of the 4th-3rd century BC. **Int. J. Osteoarchaeol.**, v. 15, n.5, p. 311–325, 2005.
- MATHESON, C. D.; VERNON, K. K.; LAHTI, A.; FRATPIETRO, R.; SPIGELMAN, M.; GIBSON, S.; GREENBLATT, C. L.; DONOGHUE, H. D. Molecular Exploration of the First-Century Tomb of the Shroud in Akeldama, Jerusalem. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8319, 2009.
- MATSUDA, M.; SALAZAR, F.; PETERSSON, M.; MASUCCI, G.; HANSSON, J.; PISA, P.; ZHANG, Q. J.; MASUCCI, M. G.; KIESSLING, R. Interleukin-10 protects target cells from tumour specific and allospecific cytotoxic T-cells by down-regulating HLA class-I expression. **J. Expl. Med.**, v.180, n. 6, p.2371–2376, 1994.
- MAURANO, F. **Tratado de Leprologia**: História da Lepra no Brasil e sua distribuição geográfica. 2. ed. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Lepra/Ministério da Educação e Saúde, 1950.
- MCGUIRK, P.; MCCANN, C.; MILLS, K. H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 2, p. 221-321, 2002.
- MEENAGH, A.; WILLIAMS, F.; ROSS, O. A.; PATTERSON, C.; GORODEZKY, C.; HAMMOND, M.; LEHENY, W. A.; MIDDLETON, D. Frequency of cytokine polymorphisms in populations from western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. **Hum. Immunol.**, v.63, n.11, p.1055-1061, 2002.
- MEISNER, S. J.; MUCKLOW, S.; WARNER, G.; SOW, S. O.; LIENHARDT, C.; HILL, A. V. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 6, p. 733-735, 2001.
- MIRA, M. T.; ALCAIS, A.; NGUYEN, V. T.; MORAES, M. O.; DI FLUMERI, C.; VU, H. T.; MAI, C. P.; NGUYEN, T. H.; NGUYEN, N. B.; PHAM, X. K.; SARNO, E. N.; ALTER, A.; MONTPETIT, A.; MORAES, M. E.; MORAES, J. R.; DORE, C.; GALLANT, C. J.; LEPAGE, P.; VERNER, A.; VAN DE VOSSE, E.; HUDSON, T. J.; ABEL, L.; SCHURR, E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, n. 6975, p.636-640, 2004.

MIRA, M. T.; ALCAIS, A.; VAN THUC, N.; THAI, V. H.; HUONG, N. T.; BA, N.N.; VERNER, A.; HUDSON, T. J.; ABEL, L.; SCHURR, E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nat. Genet.**, v. 33, n.3, p.412-415, 2003.

MISRA, N.; MURTAZA, A.; WALKER, B.; NARAYAN, N. P.; MISRA, R.S.; RAMESH, V.; SINGH, S.; COLSTON, M. J.; 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**, v. 86, n.1, p.97-103, 1995.

MONOT, M.; HONORE, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPEE, J. Y.; LACROIX, C.; SOW, S.; SPENCER, J. S.; TRUMAN, R.W.; WILLIAMS, D. L.; GELBER, R.; VIRMOND, M.; FLAGEUL, B.; CHO, S. N.; JI, B.; PANIZ-MONDOLFI, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P. E.; RASOLOFO, V.; BRENNAN, P.J.; COLE, T. On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, 2005.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 683-765, 2001.

MORAES, M. O.; CARDOSO, C. C.; VANDERBORGHT, P. R.; PACHECO, A. G. Genetics of host response in leprosy. **Lepr. Rev.**, v. 77, n. 33, p.189-202, 2006.

MORAES, M. O.; PACHECO, A. G.; SCHONKEREN, J. J.; VANDERBORGHT, P. R., NERY, J. A, SANTOS, A. R. et. al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes Immun.**, v. 5, n. 7, 592-595, 2004.

MORAES, M. O.; SANTOS, A. R.; SCHONKEREN, J. J.; VANDERBORGHT, P. R.; OTTENHOFF, T. H.; MORAES, M. E.; MORAES, J. R.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N.; HUIZINGA, T. W. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. **Immunogenetics**, v. 54, n.12, p.896-899, 2003.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, n. 7, p.2348-2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v. 17, n.3, p. 138-146, 1996.

Moubasher, a. d.; Kamel, n. a.; Zedan, h.; Raheem, d. E. A. Cytokines in leprosy. Serum cytokine profile in leprosy. **Int. J. Dermatol.**, v. 37, n.10, p.733-740, 1998.

MURRAY, P. J.; WANG, L.; ONUFRY, R. C.; TEPPER, R. I.; YOUNG, R. A. T cell derived IL-10 antagonizes macrophage function in mycobacterial infection. **J. Immunol.**, n. 158, v. 1, p.315-321, 1997.

MUTIS, T.; CORNELISSE, Y. E.; OTTENHOFF, T. H. Mycobacteria induce CD4+ T cells that are cytotoxic and display Th1-like cytokine secretion profile: heterogeneity in cytotoxic activity and cytokine secretion levels. **Eur. J. Immunol.**, v. 23, n. 9, p. 2189-2195, 1993.

NAIR, R. P.; HENSELER, T.; JENISCH, S.; STUART, P.; BICHAKJIAN, C. K.; LENK, W.; WESTPHAL, E.; GUO, S. W.; CHRISTOPHERS, E.; VOORHEES, J. J.; ELDER, J. T. Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, n. 8, p.1349-1356, 1997.

NAKAMURA, T.; LEE, R. K.; NAM, S. Y.; PODACK, E. R.; BOTTOMLY, K.; FLAVELL, R. A. Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. **J. Immunol.**, v. 158, n.6, p.2648-2653, 1997.

NATH, I.; VEMURI, N.; REDDI, A. L.; BHARADWAJ, M.; BROOKS, P.; COLSTON, M. J.; MISRA, R. S.; RAMESH, V. Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum. **Lepr. Rev.**, v. 71, Suppl. S, p.130-137, 2000.

NATH, I.; VEMURI, N.; REDDI, A. L.; JAIN, S.; BROOKS, P.; COLSTON, M. J.; MISRA, R. S.; RAMESH, V. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. **Immunol. Lett.**, v. 75, n.1, p. 69-76, 2000.

NIGOU, J.; VERCELLONE, A.; PUZO, G. New structural insights into the molecular deciphering of mycobacterial lipoglycan binding to C-type lectins: lipoarabinomannan glycoform characterization and quantification by capillary electrophoresis at the subnanomole level. **J. Mol. Biol.**, v. 299, n.5, p.1353-1362, 2000.

NIGOU, J.; ZELLE-RIESER, C.; GILLERON, M.; THURNHER, M.; PUZO, G. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. **J. Immunol.**, v.166, n.12, p. 7477-7485, 2001.

NOORDEEN, S. K. Leprosy control through multidrug therapy (MDT). **Bull. World Health Organ.**, v. 69, n. 3, p. 263-269, 1991.

O'NEILL, L. A. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. **Curr. Opin. Immunol.**, v.18, n.1, p. 3-9, 2006.

OHYAMA, H.; OGATA, K.; TAKEUCHI, K.; NAMISATO, M.; FUKUTOMI, Y.; NISHIMURA, F.; NARUISHI, H.; OHIRA, T.; HASHIMOTO, K.; LIU, T.; SUZUKI, M.; Uemura, y.; Matsushita, s. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. **J. Clin. Pathol.**, v. 58, n. 7, p. 740-743, 2005.

OLIVEIRA, R. B.; MORAES, M. O.; OLIVEIRA, E. B.; SARNO, E. N.; NERY, J. A.; SAMPAIO, E. P. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. **J. Leukoc. Biol.**, v.65, n.3, p.364-371, 1999.

OPDAL, S. H. IL-10 gene polymorphisms in infectious disease and AIDS. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol.**, v. 42, n.1, p.48-52, 2004.

OPROMOLLA, D. V. A. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, Instituto Lauro de Souza Lima, 2000.

PEREIRA, A. C.; BRITO-DE-SOUZA, V. N.; CARDOSO, C. C.; DIAS-BAPTISTA, I. M.; PARELLI, F. P.; VENTURINI, J.; VILLANI-MORENO, F. R.; PACHECO, A. G.; MORAES, M. O. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. **Genes Immun.**, v.10, n.2, p. 174-180, 2009.

PEREZ, L.; ORTE, J.; BRIEVA, J. A. Terminal differentiation of spontaneous rheumatoid factor-secreting B-cells from rheumatoid arthritis patients depends on endogenous interleukin-10. **Arthritis Rheum.**, v.38, n. 12, p.1771-1776, 1995.

PFALTZGRAFF, R. E.; RAMU, G. **Clinical leprosy**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Churchill Livingstone, 1994.

PRABHU ANAND, S.; SELVARAJ, P.; JAWAHAR, M. S.; ADHILAKSHMI, A. R.; NARAYANAN, P. R. Interleukin-12B & interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **Indian J. Med. Res.**, v.126, n.2, p.135-138, 2007.

PULENDRAN, B. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. **Immunol. Res.**, v. 29, n. 1-3 , p.187-196, 2004.

Quah, b. j.; O'Neill, h. c. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 9, n. 3 ,p.643-654, 2005.

Quesniaux, V.; Fremont, C.; Jacobs, M.; Parida, S.; Nicolle, D.; Yermeev, V.; Bihl, F.; Erard, F.; Botha, T.; Drennan, M.; Soler, M. N.; Le Bert, M.; Schnyder, B.; Ryffel, B. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. **Microbes. Infect.**, v.6, n.10, p. 946-959, 2004.

RANI, R.; FERNANDEZ-VINA, M. A.; ZAHEER, S. A.; BEENA, K. R.; STASTNY, P. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from north India. **Tissue Antigens**, v. 42, n.3, p.133-137, 1993.

RANJBAR, S.; LY, N.; THIM, S.; REYNES, J. M.; GOLDFELD, A. E. Mycobacterium tuberculosis recall antigens suppress HIV-1 replication in anergic donor cells via CD8+ T cell expansion and increased IL-10 levels. **J. Immunol.**, v. 172, n. 3, p. 1953-1959, 2004.

RAWCLIFFE, C. **Leprosy in medieval England**. Woodbridge: Boydell Press, 2006.

REES, R. F. W. **The microbiology of leprosy**. In: HASTINGS, R. C. (Ed.). *Leprosy*. 1st ed. New York: Churchill Livingstone, 1985. p. 31- 52.

REES, R. J. W.; YOUNG, D. B. **The microbiology of leprosy**. In: HASTINGS, R. C. *Leprosy*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p. 48-53.

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

REYNARD, M. P.; TURNER, D.; NAVARRETE, C. V. Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin- 10, interferon-gamma and

- interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from the UK. **Eur. J. Immunogenet.**, v. 27, n.4, p. 241-249, 2000.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, v.34, n. 3, p. 255-73, 1966.
- RINCON, M.; FLAVELL, R.A. T-cell subsets: transcriptional control in the Th1/Th2 decision. **Curr. Biol.**, v. 7, n.11, p. 29-32, 1997.
- ROBERTS, C.; MANCHESTER, K. **The Archaeology of disease**. 3st ed. Ithaca: Cornell University Press, 2005.
- ROGER, M.; LEVEE, G.; CHANTEAU, S.; GICQUEL, B.; SCHURR, E. No evidence for linkage between leprosy susceptibility and the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene in French Polynesia. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, v. 65, n. 2, p.197-202, 1997.
- ROUSSET, F.; GARCIA, E.; DEFRANCE, T.; PÉRONNE, C.; VEZZIO, N.; HSU, D. H.; KASTELEIN, R.; MOORE, K. W.; BANCHEREAU, J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 89, n.5, p.1890–1893, 1992.
- Roy, s.; Frodsham, a.; Saha, b.; Hazra, s. k.; Mascie-Taylor, c. g.; Hill, a.v. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **J. Infect. Dis.**, v. 179, n.1, p.187-191, 1999.
- Roy, s.; McGuire, w.; Mascie-Taylor, c. g.; Saha, b.; Hazra, s. k.; Hill, a. v.; Kwiatkowski, d. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J. Infect. Dis.**, v.176, n. 2, p.530-532, 1997.
- SALGAME, P.; ABRAMS, J. S.; CLAYBERGER, C.; GOLDSTEIN, H.; CONVIT, J.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science**, v. 254, n.5029, p. 279-282, 1991.
- Santos, A. R.; Suffys, P. N.; Vanderborght, P. R.; Moraes, M. O.; Vieira, L. M.; Cabello, P. H.; Bakker, A. M.; Matos, H. J.; Huizinga, T. W.; Ottenhoff, T. H.; Sampaio, E. P.; Sarno, E. N. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n.11, p.1687–1691, 2002.
- Santos, a.r.; Almeida, a. s.; Suffys, p. n.; Moraes, m. o.; Filho, v. f.; Mattos, h. j.; Nery, j. a.; Cabello, p. h.; Sampaio, e. p.; Sarno, e. n. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, v. 68, n. 3, p. 325-327, 2000.
- SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 3, p. 170-181, 2010.
- SCHAUF, V.; RYAN, S.; SCOLLARD, D.; JONASSON, O.; BROWN, A.; NELSON, K.; SMITH, T.; VITHAYASAI, V. Leprosy associated with HLA-DR2 and DQw1 in the population of northern Thailand. **Tissue Antigens**, v. 26, n. 4, p. 243-247, 1985.

SCHEEL-TOELLNER, D.; RICHTER, E.; TOELLNER, K. M.; REILING, N.; WACKER, H. H.; FLAD, H. D.; GERDES, J. CD26 expression in leprosy and other granulomatous diseases correlates with the production of interferon-gamma. **Lab. Invest.**, v. 73, n.5, p. 685-690, 1995.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A. A role for natural antibody in the pathogenesis of leprosy: antibody in nonimmune serum mediates C3 fixation to the Mycobacterium leprae surface and hence phagocytosis by human mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.**, v. 62, n.1, p. 280-289, 1994.

SEHGAL, V. N.; AGGARWAL, A.; SRIVASTAVA, G.; SHARMA, N.; SHARMA, S. Evolution of histoid leprosy (de novo) in lepromatous (multibacillary) leprosy. **Int. J. Dermatol.**, v. 44, n.7, p.576-578, 2005.

SHANKARKUMAR, U.; GHOSH, K.; BADAKERE, S.; MOHANTY, D. Novel HLA Class I Alleles Associated with Indian Leprosy Patients. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2003, n. 3, p.208-211, 2003.

SHAW, M. A.; DONALDSON, I. J.; COLLINS, A.; PEACOCK, C. S.; LINS-LAINSON, Z.; SHAW, J. J.; RAMOS, F.; SILVEIRA, F.; BLACKWELL, J. M. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. **Genes Immun.**, v. 2, n.4, p. 96-204, 2001.

SHAW, M. A.; DONALDSON, I. J.; COLLINS, A.; PEACOCK, C. S.; LINS-LAINSON, Z.; SHAW, J. J.; RAMOS, F.; SILVEIRA, F.; BLACKWELL, J. M. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. **Genes Immun.**, v. 2, n.4, p.196-204, 2001.

SIBLEY, L. D.; KRAHENBUHL, J. L. Mycobacterium leprae-burdened macrophages are refractory to activation by gamma interferon. **Infect. Immun.**, v. 55, n.2, p.446-450, 1987.

SIDDIQUI, M. R.; MEISNER, S.; TOSH, K.; BALAKRISHNAN, K.; GHEI, S.; FISHER, S. E.; GOLDING, M.; SHANKER NARAYAN, N. P.; SITARAMAN, T.; SENGUPTA, U.; PITCHAPPAN, R.; HILL, A. V. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nat. Genet.**, v. 27, n. 4, p. 439-441, 2001.

SIELING, P. A.; ABRAMS, J. S.; YAMAMURA, M.; SALGAME, P.; BLOOM, B. R.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. **J. Immunol.**, v. 150, n. 12, p. 5501-5510, 1993.

SKAMENE, E.; SCHURR, E.; GROS, P. Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. **Annu. Rev. Med.**, v. 49, p. 275-287, 1998.

SOILLEUX, E. J.; SARNO, E. N.; HERNANDEZ, M. O.; MOSELEY, E.; HORSLEY, J.; LOPES, U. G.; GODDARD, M. J.; VOWLER, S.L.; COLEMAN, N.; SHATTOCK, R. J.; SAMPAIO, E. P. DC-SIGN association with the Th2 environment of lepromatous lesions: cause or effect? **J. Pathol.**, v. 209, n. 2, p.182-189, 2006.

- STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 685-711, 2003.
- TAILLEUX, L.; MAEDA, N.; NIGOU, J.; GICQUEL, B.; O. NEYROLLES, O. How is the phagocyte lectin keyboard played? Master class lesson by *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 6, p.259-263, 2003.
- TALHARI, S.; NEVES, R. G. **Dermatologia tropical: hanseníase**. 3. ed. Manaus, AM: Tropical, 1997.
- TAN, S. Y.; GRAHAM, C. Armauer Hansen (1841-1912): discoverer of the cause of leprosy. **Singapore Med. J.**, v. 49, n.7, p. 520-521, 2008.
- THYE, T.; BROWNE, E. N.; CHINBUAH, M. A.; GYAPONG, J.; OSEI, I.; OWUSU-DABO, E.; BRATTIG, N. W.; NIEMANN, S.; RÜSCH-GERDES, S.; HORSTMANN, R. D.; MEYER, C. G. IL10 haplotype associated with tuberculin skin test response but not with pulmonary TB. **PLoS One**, v.4, n. 5, e5420, 2009.
- TOSH, K.; MEISNER, S.; SIDDIQUI, MR.; BALAKRISHNAN, K.; GHEI, S.; GOLDING, M.; SENGUPTA, U.; PITCHAPPAN, R. M.; HILL, A.V. A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. **J. Infect. Dis.**, v.186, n. 8, p.1190-1193, 2002.
- TREMBATH, R. C.; CLOUGH, R. L.; ROSBOTHAM, J. L.; JONES, A. B.; CAMP, R. D.; FRODSHAM, A.; BROWNE, J.; BARBER, R.; TERWILLIGER, J.; LATHROP, G. M.; BARKER, J.N. Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. **Hum. Mol. Genet.**, v. 6, n.5, p. 813-820, 1997.
- TURNER, D. M.; WILLIAMS, D. M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. An investigation of polymorphism in the Interleukin-10 gene. **Eur. J. Immunogenet.**, v. 24, n.1, p.1-8, 1997.
- UNANUE, E. **Innate immunity in bacterial infections**. American Society for Microbiology, Washington DC, 2002.
- VANDEBORGHT, P. R.; MATOS, H. J.; SALLES, A. M.; VASCONCELOS, S. E.; SILVA-FILHO, V. F.; HUIZINGA, T. W.; OTTENHOFF, T. H.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N.; SANTOS, A. R.; MORAES, M. O. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in TNF $\alpha$  promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 72, n. 2, p. 143-148, 2004.
- VEJBAESYA, S.; MAHAISAVARIYA, P.; LUANGTRAKOOL, P.; SERMDUANGPRATEEP, C. TNF  $\alpha$  and NRAM1 polymorphisms in leprosy. **J. Med. Assoc. Thai.**, v.90, n.6, p.1188-1192, 2007.
- VERHAGEN, C. E.; VAN DER POUW KRAAN, T. C.; BUFFING, A. A.; CHAND, M. A.; FABER, W. R.; AARDEN, L. A.; DAS, P. K. Type 1- and type 2-like lesional skin-derived *Mycobacterium leprae*-responsive T cell clones are characterized by coexpression of IFN-

gamma/ TNF-alpha and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. **J. Immunol.**, v. 160, n. 5, p. 2380-2387, 1998.

VERHAGEN, C. E.; WIERENGA, E. A.; BUFFING, A. A.; CHAND, M. A.; FABER W. R.; DAS, P. K. Reversal reaction in borderline leprosy is associated with a polarized shift to type 1-like Mycobacterium leprae T cell reactivity in lesional skin: a follow-up study. **J. Immunol.**, v. 159, n. 9, p. 4474-4483, 1997.

VERRECK, F. A.; DE BOER, T.; LANGENBERG, D. M.; HOEVE, M. A.; KRAMER, M.; VAISBERG, E.; KASTELEIN, R.; KOLK, A.; DE WAAL-MALEFYT, R.; OTTENHOFF, T. H. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 101, n. 13, p. 4560-4565, 2004.

VISENTAINER, J. E.; TSUNETO, L. T.; SERRA, M. F.; PEIXOTO, P. R.; PETZL-ERLER, M. L. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 1, p.51-59, 1997.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. The clinical and immunological features of leprosy. **Br. Med. Bull.**, p.103-121, 2006.

WESTENDORP, R. G. J.; LANGERMANS, J. A. M.; HUIZINGA, T. W. G.; ELOUALI, A. H.; VERWEIJ, C. L.; VANDENBROUCKE, J. P. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet**, v. 349, n. 9046, p. 170-173, 1997.

WHO. **Expert Committee on Leprosy**. Geneva, 1998. (World Health Organ Tech. Rep. Ser. 874).

WHO. **Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities**. Geneva, 2005.

WIBAWA, T.; SOEBONO, H.; MATSUO, M. Association of a missense mutation of the laminin alpha2 gene with tuberculoid type of leprosy in Indonesian patients. **Trop. Med. Int. Health**, v. 7, n.7, p. 631-636, 2002.

WILSON, A. G.; DI GIOVINE, F. S.; BLAKEMORE, A. I.; DUFF, G. W. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Hum.Mol. Genet.**, v. 1, n. 5, p.353, 1992.

YAMAMURA, M. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 255, n. 3, p.12, 1992.

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**, v. 254, n.5029, p. 277-279, 1991.

YAMANOUCHI, A. A.; CARON, C. R.; SHIWAKU, D. T.; SOARES, F. B.; NICOLODELLI, M. A.; ADUR, R. C.; TAMURA, S. Y. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. **An. Bras. Dermatol.**, v.68, n.6, p.396-404, 1993.

ZODPEY, S. P. Protective effect of bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccine in the prevention of leprosy: a meta-analysis. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, v. 73, n.2, p. 86-93, 2007.

## ANEXO A - DADOS DOS CASOS DE HANSENÍASE

CASO	IL10(pg/mL)	FORMA	IDADE	SEXO
1	17,048	MHT	15	2
2	21,226	MHT	37	2
3	6,417	MHBT	42	2
4	11,904	MHI	25	2
9	2	MHBT	65	1
10	36,972	MHBT	29	2
12	39,115	MHT	15	2
13	28,636	MHBT	18	2
14	12,933	MHI	17	2
16	7,106	MHT	25	2
18	38,838	MHV	63	1
19	10,609	MHI	86	1
33	11,904	MHBT	18	1
38	21,226	MHI	44	1
40	11,01	MHV	41	1
41	15,742	MHI	21	1
43	21,177	MHI	35	1
47	38,2	MHI	15	1
49	13,606	MHI	36	2
50	15,372	MHBV	23	1
62	7,854	MHI	66	2
74	38,529	MHBV	62	2
77	4,956	MHT	44	1
111	36,34	MHBT	55	1
122	16,649	MHI	38	1
125	31,136	MHT	31	1
129	28,964	MHI	20	2
134	14,046	MHBT	72	1
135	11,748	MHBT	52	1
137	18,413	MHBT	23	1
139	15,903	MHBT	45	1
141	51,421	MHI	21	2
150	10,656	MHV	82	1
153	17,174	MHBV	23	1

154	15,356	MHV	17	1
155	5,381	MHBT	59	2
158	8,443	MHI	24	2
161	17,638	MHI	17	2
165	6,169	MHV	53	1
167	14,996	MHV	59	1
169	14,996	MHV	70	1
171	8,321	MHT	67	1
172	7,791	MHBV	88	1
173	6,372	MHBT	57	2
174	17,648	MHV	21	1
175	10,163	MHBT	22	2
178	16,119	MHT	70	2
179	8,781	MHT	25	1
180	6,653	MHBV	23	1
181	9,112	MHV	61	2
183	27,978	MHT	42	2
185	6,544	MHV	50	2
189	5,599	MHV	35	1
191	11,194	MHV	46	1
192	5,264	MHI	26	2
193	7,625	MHI	50	2
201	10,298	MHBT	60	2
202	9,121	MHI	40	1
205	7,022	MHBT	64	2
206	10,298	MHT	64	2
207	6,653	MHT	84	1
213	5,929	MHT	17	2
214	8,747	MHI	23	1
226	5,145	MHT	32	2
227	4,579		67	1
229	5,604	MHV	55	1
236	2,236	MHT	29	2

<b>237</b>	<b>2,236</b>	<b>MHV</b>	<b>23</b>	<b>2</b>
<b>238</b>	<b>10,648</b>		<b>38</b>	<b>2</b>
<b>239</b>	<b>5,219</b>		<b>56</b>	<b>2</b>
<b>240</b>	<b>2,236</b>	<b>MHV</b>	<b>64</b>	<b>1</b>
<b>257</b>	<b>6,067</b>	<b>MHI</b>	<b>33</b>	<b>1</b>
<b>258</b>	<b>3,464</b>	<b>MHBT</b>	<b>32</b>	<b>1</b>
<b>260</b>	<b>7,029</b>	<b>MHV</b>	<b>29</b>	<b>1</b>
<b>261</b>	<b>4,253</b>	<b>MHV</b>	<b>63</b>	<b>1</b>
<b>263</b>	<b>11,207</b>		<b>50</b>	<b>1</b>
<b>264</b>	<b>4,253</b>		<b>19</b>	<b>2</b>

## ANEXO B - DADOS DOS CONTACTANTES DE HANSENÍASE

CONTACTANTE	IL10(pg/mL)	FORMA	IDADE	SEXO
01.02	10,672	MHT	43	1
03.02	14,334	MHBT	16	1
10.02	15,951	MHT	34	1
111.5	11,34	MHBT	29	1
111-3	15,058	MHBT	46	1
14.02	12,681	MHI	63	1
141-4	11,926	MHI	15	1
147-6	5,599		68	1
159-5	3,031		24	1
167-3	9,914	MHV	20	1
169-3	7,036	MHV	43	1
175-2	11,398	MHBV	35	1
181.02	10,762		63	1
190-2	17,634	MHI	22	1
212-3	35,664		15	1
228-5	19,121		67	1
253-3	9,799	MHBT	36	1
257-2	2	MHI	25	1
260.05	38,846		46	1
74-15	1,537	MHBV	73	1
74-20	13,818	MHBV	69	1
02.03	6,717	MHT	74	2
02.04	19,637	MHT	30	2
09.02	15,951	MHBT	15	2
111.02	5,541	MHBT	53	2
114-4	8,798	MHBT	20	2
12.02	10,162	MHT	33	2
129.02	9,194	MHI	15	2
13.02	4,662	MHBT	33	2
134.02	18,948	MHBT	69	2
135.02	28,596	MHBT	55	2
137.02	27,899	MHI	50	2
139.02	1,407	MHBT	42	2
141-2	15,722	MHI	42	2

141-3	8,747	MHI	77	2
141-5	31,991	MHI	19	2
150-2	8,205	MHV	17	2
150-3	6,447	MHV	48	2
159-2	2,267		21	2
161-2	3,031	MHI	25	2
167-2	2,809	MHV	48	2
169-2	11,72	MHV	71	2
171.02	6,752		57	2
172-2	7,062	MHBV	82	2
173-2	23,044	MHBT	75	2
173-3	11,716	MHBT	24	2
173-4	11,413	MHBT	42	2
173-5	10,147	MHBT	20	2
175-4	3,24	MHBV	18	2
178-3	11,082	MHT	18	2
18.02	20,658	MHV	55	2
180-2	1,68	MHBV	41	2
180-3	18,956	MHBV	20	2
189-2	14,306	MHV	59	2
189-3	6,741	MHV	59	2
190-3	4,954	MHI	18	2
207.07	22,598	MHT	18	2
212-2	23,629		32	2
224-2	19,834		64	2
253-2	9,763	MHBT	34	2
253-2	9,763	MHBT	18	2
258.02	15,535	MHBT	28	2
258.02	15,535	MHBT	19	2
261.02	35,08	MHV	29	2
263.02	16,221		24	2
38.02	16,279	MHI	43	2
40.02	11,137	MHV	39	2
43.02	5,837	MHI	36	2
47.02	6,437	MHI	33	2

<b>74-17</b>	<b>3,826</b>	<b>MHBV</b>	<b>77</b>	<b>2</b>
<b>74-18</b>	<b>5,127</b>	<b>MHBV</b>	<b>79</b>	<b>2</b>
<b>74-23</b>	<b>8,167</b>	<b>MHBV</b>	<b>52</b>	<b>2</b>
<b>90-2</b>	<b>278,6</b>	<b>MHV</b>	<b>47</b>	<b>2</b>
<b>90-3</b>	<b>8,535</b>	<b>MHV</b>	<b>25</b>	<b>2</b>

## ANEXO C - DADOS DOS CONTROLES

CONTROLE	IL-10(pg/mL)	IDADE	SEXO
97	13,19	28	2
98	247,731	45	1
103	11,501	43	1
105	9,408	22	1
106	16,119	18	1
107	8,535	20	1
108	9,598	24	1
111	7,049	21	1
113	4,513	67	1
117	6,319	63	1
231	8,557	52	1
232	7,292	43	1
233	8,105	22	1
234	4,956	21	1
236	8,813	21	1
237	8,306	20	1
239	12,334	18	1
286	11,337	20	1
99	7,292	36	2
100	5,845	25	2
102	19,132	60	2
104	18,348	23	2
109	7,799	43	2
110	6,852	36	2
112	8,298	22	2
115	11,221	62	2
225	8,078	45	2
228	9,072	23	2
229	5,615	65	2
230	8,306	56	2
235	11,775	63	2