

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**ANA LÚCIA OSÓRIO MAROCLO DE SOUSA**

---

---

**Marcadores Moleculares Imunológicos e Genéticos das Reações**  
**Hansênicas**

---

---

**Goiânia**

**2009**





## Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

11. **Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**  
12. **Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor(a):	ANA LUCIA OSÓRIO MAROCLO DE SOUSA		
CPF:	394.561.451-15	E-mail:	<a href="mailto:anamaroclo@gmail.com">anamaroclo@gmail.com</a>
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Vínculo Empregatício do autor	Secretaria Estadual de Saúde e Secretaria Municipal de Saúde		
Agência de fomento:	-	Sigla:	-
País:	-	UF:	-
CNPJ:	-		
Título:	Marcadores moleculares, imunológicos e genéticos das reações hansênicas		
Palavras-chave:	Hanseníase, marcadores, reações, ML-PCR, fatores plasmáticos, tagSNPs		
Título em outra língua:			
Palavras-chave em outra língua:			
Área de concentração:	Imunologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	08/05/2009		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública		
Orientador(a):	Mariane Martins de Araújo Stefani		
CPF:	260.258.841-53	E-mail:	<a href="mailto:mariane.stefani@pq.cnpq.br">mariane.stefani@pq.cnpq.br</a>
Co-orientador(a):	Celina Maria Turchi Martelli		
CPF:	781.484.727-34	E-mail:	<a href="mailto:celina@pq.cnpq.br">celina@pq.cnpq.br</a>

### 3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup>       total       parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

Outras restrições: \_\_\_\_\_

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 22/12/2010

Assinatura da autora

**ANA LÚCIA OSÓRIO MAROCLO DE SOUSA**

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

---

---

**Marcadores Moleculares, Imunológicos e Genéticos das Reações  
Hansênicas**

---

---

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientadora: Mariane Martins de Araújo Stefani

Co-orientadora: Celina Maria Turchi Martelli

**Goiânia**

**2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

S725m      Sousa, Ana Lúcia Osório Maroelo de.  
Marcadores moleculares, imunológicos e genéticos das reações  
hansênicas [manuscrito] / Ana Lúcia Osório Maroelo de Sousa. –  
2009.

94 f. : figs., tabs.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariane Martins de Araújo Stefani.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,  
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.  
Bibliografia.

1. Hanseníase. 2. Marcadores moleculares. 3. Reações  
hansênicas. 4. ML-PCR. 5. Fatores plasmáticos. I. Título.

CDU: 616-002.73

**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública  
da Universidade Federal de Goiás**

## **BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluna: ANA LÚCIA OSÓRIO MAROCLO DE SOUSA**

---

**Orientadora: MARIANE MARTINS DE ARAÚJO STEFANI**

---

**Co-orientadora: CELINA MARIA TURCHI MARTELLI**

---

### **Membros:**

- 1. Prof. Dr. Milton Ozório Moraes – FIOCRUZ/RJ**
- 2. Prof. Dr. Marcelo Távora Mira – PUC/PR**
- 3. Prof. Dr. João Alves de Araújo Filho – IPTSP/UFG**
- 4. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Gisner Alves de Souza Pereira – Unievangélica/Anápolis/GO**
- 5. Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Mariane Martins de Araújo Stefani - Orientadora**

**Data:08/05/2009**

**Aos meus pais José e Hercília**  
**Ao meu marido Juarez**  
**e aos meus filhos André, Daniel e Isabela**

**“De tudo ficaram 3 coisas:**

- a certeza de que estava sempre começando**
- a certeza de que era preciso continuar e**
- a certeza de que seria interrompido antes de terminar**

**Fazer da interrupção um caminho novo,**

**Fazer da queda um passo de dança,**

**Do medo uma escada,**

**Do sonho uma ponte,**

**Da procura um encontro”**

*Fernando Sabino*

**Se não houver frutos,**

**Valeu a beleza das flores.**

**Se não houver flores,**

**Valeu a sombra das folhas**

**Se não houver folhas,**

**Valeu a intenção da semente.**

*Henfil*



## AGRADECIMENTOS

---

À DEUS, por não me permitir desistir.

Aos meus pais José Maroclo de Miranda e Hercília Osório Maroclo, exemplos de retidão e determinação, nos quais eu sempre posso confiar e contar com o apoio incondicional.

Ao meu marido Juarez Antônio de Sousa pela paciência nos momentos de estresse, pelo estímulo e dedicação. Mais do que agradecer por isso, peço desculpas pelos excessos.

Aos meus filhos André, Daniel e Isabela por suportarem as minhas ausências freqüentes e se sentirem compensados com o pouco tempo dedicado a eles. Agora meu colo é só de vocês.

Aos meus irmãos Ana Valéria, Marcus Vinícius e Paulo Henrique pelo companheirismo e confiança e aos meus cunhados Vicente, Danielle e Edith por também serem meus irmãos.

Aos meus queridos avós Geralda e Pedro Osório que aos 97 anos são os exemplos vivos de união, determinação e sabedoria.

À Antônia Divina dos Santos “Preta”, pela dedicação aos meus filhos, me dando a tranquilidade necessária para os longos períodos de minha ausência.

À minha querida orientadora, amiga, companheira e conselheira Mariane Martins de Araújo Stefani, pela confiança em me entregar um grande desafio nas mãos, pelo incentivo, apoio e segurança que me transmitiu durante toda esta jornada.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Celina Maria Turchi Martelli, co-orientadora desta tese, pela transmissão dos conhecimentos, pelo carinho e pela confiança.

Ao Prof. Dr. Marcelo Távora Mira pela receptividade na PUC-PR, pela dedicação na realização de toda a parte genética do estudo e pelas importantes considerações em sua participação na banca de defesa desta tese.

À Dra Ilma Modanez Silva pelo grande auxílio no recrutamento dos pacientes e acompanhamento no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica, em Goiânia.

Ao Prof. Maurício Barcelos Costa, pela amizade, pela prontidão na realização dos exames histopatológicos dos pacientes estudados e pelo esclarecimento de minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. João Alves de Araújo Filho, membro da banca de qualificação e de defesa de doutorado, pelas importantes considerações e sugestões, essenciais ao enriquecimento desta tese.

À Profª Drª Maria de Fátima Costa Alves, pela contribuição como membro da banca de minha qualificação de doutorado.

Ao Prof Dr Milton Ozório Moraes, pelas valiosas considerações como membro da banca de defesa desta tese.

À Profª Drª Gisner Alves de Souza Pereira, pela amizade, estímulo e contribuição como membro da banca de defesa desta tese.

À Prof. Dra Jackeline Gomes Guerra pelo incentivo, auxílio no recrutamento e acompanhamento dos pacientes e pela amizade.

À técnica de enfermagem Maria Divina Silva, minha companheira de trabalho no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica, pela amizade e capacidade em desatar todos os nós no decorrer deste estudo.

Aos profissionais Livia, Terapeuta Ocupacional, Enf. Denismar, Enf. Izabel e em especial à Enfermeira Alessandra Policena Rosa Peres pela organização, dedicação e competência na realização das avaliações neurológicas e coleta de sangue dos pacientes incluídos no estudo.

Aos colegas Lucas Henrique Sampaio e Adriano Grassi pelo companheirismo e auxílio nas coletas de sangue durante o recrutamento dos pacientes.

Ao amigo, mestrando em Curitiba, Vinícius Fava pela receptividade no laboratório de Genética na PUC-PR, por todo o esclarecimento, transmissão de conhecimentos e realização da parte genética sob supervisão do Prof. Dr. Marcelo Mira.

Aos diretores e ex-diretores do Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica Dra Maria, Juliane, Dr Paulo Afonso, Dr Romélio, Dra Ana Carolina e em especial ao Dr Antônio Eduardo Rezende de Carvalho e Dra Ana Cecília Coelho Melo, que entenderam a importância do estudo realizado neste centro e me deram suporte para seguir em frente.

Às amigas e colegas de profissão e trabalho Dra Maria da Glória e Maria Ângela pelo encaminhamento dos pacientes para participação no estudo.

Às enfermeiras Divina, Erondina e Susley pelo grande auxílio no encaminhamento dos pacientes incluídos no estudo e nas avaliações neurológicas inclusive ajudando no treinamento de nossa equipe.

Aos demais funcionários do Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica pelo encaminhamento dos pacientes para o estudo.

À todos os colegas do Laboratório de Imunologia do IPTSP: Ludmila Paula Vaz Cardoso, Keila Correa Alcântara, Alexsander da Silveira, Regiane Morillas, Mônica Nogueira Guarda Reis, pela amizade, receptividade, incentivo e pela colaboração na etapa laboratorial realizada em Goiânia.

À toda equipe do Laboratório de Genética da PUC do Paraná pela acolhida calorosa e competência na realização dos exames.

Ao Sr João Borges Peres Júnior pela paciência na digitação dos dados e formatação da tese.

À Coordenadora do Laboratório Prof<sup>a</sup> Margarida Dobler Komma – IPTSP/UFG, Biomédica Sueli Meira da Silva Dias pela receptividade durante a coleta de sangue dos pacientes.

Aos funcionários do Laboratório Prof<sup>a</sup> Margarida Dobler Komma – IPTSP/UFG, Luismar Pereira Cardoso, Ester de Moraes, Elcy Pereira de Jesus, Naira Andrija Alves e Klaudianne Telles Silvestre pelo auxílio e coleta do sangue dos pacientes.

À todos os pacientes participantes deste trabalho, pela confiança em nós depositada para a realização dos exames, condução do tratamento, acompanhamento e por aceitarem ser estudados em prol do avanço da medicina.

## SUMÁRIO

---

---

Agradecimentos .....	vii
Sumário.....	x
Tabelas e Figuras.....	xiii
Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	xiv
Apresentação .....	xix
Organização da Tese .....	xxiii
Resumo .....	xxiv
Abstract .....	xxvi
1.Introdução .....	1
Definição.....	1
História Natural .....	1
Classificação .....	3
Aspectos Imunológicos .....	3
Exames Complementares .....	4
Tratamento .....	6
Reações Hansênicas .....	6
Reação Tipo 1 .....	7
Reação Tipo 2 .....	10
Aspectos Genéticos do Hospedeiro e do Patógeno .....	14
2.Justificativa .....	23
3.Objetivos .....	24
4. Artigos .....	25

<b>Artigo 1:</b> <i>Mycobacterium leprae</i> DNA associated with type 1 leprosy reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose Rifampin, Ofloxacin e Minocycline.....	26
Abstract.....	28
Introduction .....	28
Materials and Methods .....	29
Results .....	32
Discussion .....	34
References .....	37
Table 1.....	40
Figure 1.....	41
<b>Artigo 2:</b> Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: A preliminary report.....	43
Abstract.....	45
Background.....	46
Methods .....	47
Results .....	49
Discussion .....	51
Conclusions .....	53
References .....	55
Table 1.....	59
Figure 1.....	61
Figure 2.....	62
<b>Artigo 3:</b> Genetic and serologic evidences implicate <i>IL6</i> as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction .....	63
Abstract.....	66

Introduction.....	66
Results and Discussion .....	68
References .....	71
Table 1.....	74
Table 2.....	75
Figure 1.....	76
Figure 2.....	77
5. Resumo dos Artigos/Conclusões.....	78
Referências Bibliográficas.....	80
Anexos.....	94

## TABELAS E FIGURAS

Figura 1 – Espectro clínico-imunopatológico da hanseníase – Adaptado de Jacobson e Krahenbuhl, 1999 .....	2
Figura 2 – Imunopatogenia das reações hansênicas.....	8
Figura 3 – Paciente em reação tipo 1 .....	9
Figura 4 – Paciente em reação tipo 2 .....	12
Tabela 1 – Resumo dos principais estudos genéticos de susceptibilidade à hanseníase <i>per se</i> e reações hansênicas .....	17
Tabela 2 – Resumo dos principais estudos sobre HLA e hanseníase .....	18

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AD</b>	Allelic discrimination assay
<b>AFB</b>	acid fast bacilli
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome – Síndrome da Imunodeficiência adquirida
<b>AR-JP</b>	parkinsonismo juvenil autossômico recessivo
<b>BAAR</b>	bacilos álcool-ácido-resistentes
<b>BB</b>	hanseníase borderline borderline
<b>BCG</b>	bacilo Calmette-Guerrin
<b>bFGF</b>	basic fibroblast grow factor – fator básico de crescimento derivado dos fibroblastos
<b>BI</b>	bacterial index
<b>BL</b>	hanseníase borderline lepromatosa
<b>BT</b>	hanseníase borderline tuberculóide
<b>CCL 11</b>	quimiocina CCL 11
<b>CEPMHA</b>	Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CONEP</b>	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
<b>CRDT</b>	Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica
<b>CXCL10/IP10CXCL</b>	Quimiocina CXCL10-interferon-gamma-inducible Protein 10 – Proteína 10 induzível por interferon
<b>DbSNP-NCBI</b>	Single Nucleotide Polymorphism database – National Center for Biotechnology Information



<b>DECIT</b>	Departamento de Ciência e Tecnologia
<b>dp</b>	desvio padrão
<b>EDTA</b>	Ethylenediamine tetra acetic acid - ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	Imuno ensaio enzimático
<b>ENL/ENH</b>	Eritema Nodosum Leprosum – eritema nodoso hansênico
<b>F</b>	sexo feminino
<b>FUAM</b>	Fundação Alfredo da Matta
<b>FUNASA</b>	Fundação Nacional de Saúde
<b>G6PD</b>	glicose-6-fosfato desidrogenase
<b>G-CSF</b>	granulocyte-colony stimulating factor – fator estimulante de colônias de granulócitos
<b>GIF</b>	grau de incapacidade física
<b>GM-CSF</b>	granulocyte macrophage-colony stimulating factor – fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
<b>HAART</b>	highly active anti retroviral therapy – terapêutica anti-retroviral altamente potente
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>HIV</b>	human immunodeficiency vírus - vírus da imunodeficiência humana
<b>HLA</b>	Human leucocyte antigens - antígenos leucocitários de histocompatibilidade
<b>HR</b>	hazard ratio
<b>IB</b>	índice baciloscópio
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>I</b>	hanseníase indeterminada

<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1RA</b>	antagonista do receptor da IL1
<b>IP-10</b>	IFN-inducible protein 10 (proteína 10 induzível por interferon)
<b>IPTSP</b>	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
<b>LD</b>	desequilíbrio de ligação
<b>LL</b>	hanseníase lepromatosa lepromatosa
<b>LTA</b>	Linfotoxina alfa
<b>M</b>	sexo masculino
<b>MB</b>	hanseníase multibacilar
<b>MCP1</b>	monocytes chemoattractant protein 1 – proteína1 quimiotática de monócitos
<b>MCT</b>	Ministério da Ciência e Tecnologia
<b>MDT</b>	multidrogaterapia
<b>MICA</b>	MHC classe I chain-related genes A
<b>MICB</b>	MHC classe I chain-related genes B
<b>MIP</b>	macrophage inflammatory protein – proteína inflamatória macrofágica
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex – complexo de histocompatibilidade principal
<b>MHT</b>	hanseníase tuberculóide
<b>MHV</b>	hanseníase virchowiana
<b><i>M. leprae</i></b>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<b>ML-PCR</b>	reação em cadeia da polymerase para <i>M. leprae</i>
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b><i>M. tuberculosis</i></b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NHDP/USA</b>	National Hansen’s Disease Program
<b><i>NRAMP1</i></b>	natural resistance-associated macrophage protein

<b>OD</b>	optical density
<b>OR</b>	odds ratio – razões de chances
<b>PACRG</b>	gene co-regulado com parquina
<b>PARK2</b>	parquina
<b>PB</b>	paucibacilar
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction (reação em cadeia da polymerase)
<b>PDGF-BB</b>	platelet-derived growth factor BB – fator de crescimento-BB derivado das plaquetas
<b>PGL-1</b>	antígeno fenoglicolípido I do <i>M. leprae</i>
<b>PQT</b>	poliquimioterapia
<b>PR</b>	Paraná
<b>PUC</b>	Pontifícia Universidade Católica
<b>RANTES</b>	regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted – fator regulado por ativação expresso e secretado por células T normais
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>ROM</b>	Rifampicina + Ofloxacina + Minociclina
<b>RR</b>	reação reversa
<b>RT1</b>	Reação Tipo 1
<b>RT2</b>	Reação Tipo 2
<b>SAS</b>	Secretaria de Atenção à Saúde
<b>SCTIE</b>	Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos
<b>SD</b>	Standard deviation – desvio padrão
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>SLC11A1</b>	solute carrier family11member1
<b>SMS</b>	Secretaria Municipal de Saúde
<b>SNPs</b>	single nucleotide polymorphisms – polimorfismo de base única

<b>SPSS</b>	statistical program for social science
<b>SSL-PB</b>	single skin lesion paucibacillary – lesão única de pele paucibacilar
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>SVS</b>	Secretaria de Vigilância em Saúde
<b>T1R</b>	leprosy type 1 reaction
<b>T2R</b>	leprosy type 2 reaction
<b>TAP2</b>	transporter associated antigen processing molecule 2
<b>TCLE</b>	termo de consentimento livre e esclarecido
<b>TDR</b>	Tropical Diseases Research and Training
<b>TH1</b>	linfócitos T helper tipo 1
<b>TH2</b>	linfócitos T helper tipo2
<b>TLR</b>	receptores toll like
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor – $\alpha$ – fator de necrose tumoral – $\alpha$
<b>TT</b>	hanseníase tuberculóide
<b>UFG</b>	Universidade Federal de Goiás
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor – fator de crescimento do endotélio vascular
<b>VDR</b>	receptor de vitamina D
<b>WER</b>	weekly epidemiological report
<b>WHO / OMS</b>	World Health Organization / Organização Mundial da Saúde

## APRESENTAÇÃO

O estudo aprofundado da hanseníase tem sido um tema do meu interesse desde a conclusão da minha especialização em Dermatologia em 1997 pela Universidade Federal de Goiás. Nesta época fui convidada pela professora doutora Celina Maria Turchi Martelli para fazer parte de uma equipe de pesquisa sobre diversas abordagens da hanseníase. Ingressei, então, em um estudo multicêntrico para avaliar a utilização da dose única de ROM (rifampicina, ofloxacina e minociclina) em pacientes com hanseníase paucibacilar com lesão única de pele, estudo este financiado pelo TDR/WHO.

Neste projeto atuei como dermatologista responsável pelo recrutamento dos pacientes no Centro de Saúde Juarez Barbosa da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás, em Goiânia, hoje, devido à municipalização da saúde, transferidas as suas atividades para o Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica. Os pacientes recrutados para este estudo foram acompanhados clinicamente por 3 anos. Além de Goiás, também foram recrutados pacientes em centros de referência na cidade de Manaus-AM, Ariquemes-RO, Porto Velho-RO e Rio de Janeiro-RJ, sob coordenação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Durante este projeto, tive a oportunidade de participar de um treinamento no Instituto Alfredo da Matta na cidade de Manaus, importante centro de referência em hanseníase da região norte do país. Este estudo multicêntrico resultou em várias dissertações de mestrado e publicações (Martelli et al, 2000; Costa et al, 2001; Stefani et al, 2003; Sacchetim, 2004; Sousa et al, 2007; Gomes et al, 2008).

Como parte deste projeto, sob a orientação das Professoras Doutoras Mariane Martins de Araújo Stefani e Celina Maria Turchi Martelli, desenvolvemos um estudo de coorte que incluiu a detecção de DNA de *Mycobacterium leprae* por reação em cadeia da polimerase (ML-PCR) em lesões de pele. Ao diagnóstico, os pacientes foram submetidos à biópsia de pele e acompanhados clinicamente por 3 anos, para avaliar a ocorrência de eventos desfavoráveis, principalmente reação hansênica tipo 1. Nesta investigação avaliamos a associação da positividade do ML-PCR com a ocorrência do episódio reacional. Em 2001, resultados preliminares deste estudo foram apresentados no “56º

Congresso Brasileiro de Dermatologia”. Este tema livre intitulado “Fatores prognósticos de evolução clínica de pacientes paucibacilares de hanseníase tratados com dose única de rifampicina, ofloxacina e minociclina: coorte multicêntrica recrutada em três regiões do Brasil” obteve o 2º lugar na premiação. Este estudo foi concluído em dezembro de 2002 com a minha defesa de mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública, área de concentração em epidemiologia, na Universidade Federal de Goiás.

Em julho de 2004 minha dissertação de mestrado foi agraciada com o Prêmio Academia Goiana de Medicina como o melhor trabalho científico desenvolvido por médico radicado em Goiás no mesmo ano.

Em 2005 ingressei, por meio de concurso, no serviço público municipal, lotada como dermatologista no Programa de Hanseníase do Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica da Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia e participei do recrutamento e acompanhamento dos pacientes incluídos no estudo para avaliar “Alterações endócrinas como fatores de risco para reações hansênicas”, financiado pelo American Leprosy Missions e do “Estudo dos Marcadores Imunológicos de Reações Hansênicas”, juntamente com a Dra Jackeline Gomes Guerra. Este último estudo resultou na tese de Doutorado da Dra Jackeline na Universidade Federal do Rio de Janeiro sob orientação das Profs Dras Maria Leide W. de Oliveira e Mariane Martins de Araújo Stefani (Guerra, 2007). Este estudo avaliou várias citocinas plasmáticas em pacientes com reações hansênicas tipo 1 e 2 (Stefani et al, 2009).

O meu interesse especial e estudo sobre hanseníase propiciou diversos convites para ministrar conferências: “Diagnóstico da Hanseníase” durante a VIII Jornada Médica do Vale do Araguaia na cidade de Barra do Garças, no Mato Grosso, em 2006; “Hanseníase”, durante o IX Congresso de Clínica Médica do Estado de Goiás, 2006; “Manifestações Sistêmicas da Hanseníase Virchowiana” durante a Jornada de Hanseníase na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, 2006. Além disso, apresentei como co-autora vários temas livres em eventos científicos nacionais e internacionais.

Dando continuidade à linha de pesquisa sobre marcadores em reações hansênicas, iniciamos estudo sobre marcadores genéticos nas reações hansênicas. Este estudo envolveu o recrutamento de novos participantes para alcançarmos uma amostragem representativa para um estudo genético. Iniciei, desta forma, em agosto de 2006, sob orientação da Profª. Drª Mariane Martins de Araújo Stefani, minha trajetória no programa de pós- graduação,

nível doutorado, em Medicina Tropical e Saúde Pública, na área de concentração em Imunologia. O recrutamento dos pacientes, a coleta de material biológico e o acompanhamento clínico foram feitos em Goiânia. Os experimentos relacionados ao estudo genético foram realizados na PUC do Paraná, sob a coordenação do Prof. Dr. Marcelo Mira.

Esta tese de doutorado é apresentada no formato de artigos científicos relacionados a uma única área de investigação. O primeiro artigo apresentado nesta tese do qual sou primeira autora (Sousa et al, 2007), intitula-se “*Mycobacterium leprae* DNA Associated with Type 1 Reactions in Single Lesion Paucibacillary Leprosy Treated with Single Dose Rifampin, Ofloxacin, and Minocycline” e foi publicado em 2007 no periódico “The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene”. O segundo artigo que compõe esta tese “Potential Plasma Markers of Type 1 and Type 2 Leprosy Reactions: A Preliminary Report” abordou marcadores imunológicos de reações hansênicas e foi publicado no BMC Infectious Diseases (Stefani et al, 2009).

Durante a realização desta tese participei de outros projetos do grupo de pesquisa da UFG em parceria com o “Infectious Diseases Research Institute”- IDRI de Seattle/EUA. Como resultado em 2008 publicamos artigo intitulado “Antigen-Specific T-Cell Responses of Leprosy Patients” no Clinical and Vaccine Immunology sobre a identificação de potenciais antígenos candidatos para o diagnósticolaboratorial da hanseníase baseado em testes de imunidade celular mediante detecção de interferon gamma (Duthie et al, 2008).

A escolha do tema do terceiro artigo intitulado “Genetic and serologic evidences implicate *IL6* as a susceptibility gene for leprosy type 2 reaction” foi baseada em uma lacuna do conhecimento a respeito de marcadores genéticos associados a predisposição para o desenvolvimento de reações hansênicas. As reações hansênicas tipo 1 e tipo 2 representam o maior complicador no manejo clínico, pois acometem um percentual significativo dos pacientes com hanseníase e podem resultar em dano neural e incapacidades físicas irreversíveis.

Eleger a hanseníase como tema de estudo, por se tratar de uma doença tão complexa, não foi uma tarefa fácil. Conhecer, aprender e me familiarizar com assuntos referentes a este campo, desde a área básica de biologia molecular, imunologia e genética, representaram enorme desafio e aprendizado para mim, uma dermatologista clínica. Esta trajetória, no entanto, foi fundamental para o meu crescimento e amadurecimento

profissional, proporcionando-me a oportunidade de tentar entender a aplicabilidade de novas ferramentas para diagnóstico e prognóstico da hanseníase.



## ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese de doutorado será apresentada inicialmente com uma introdução contendo uma abordagem geral acerca da hanseníase, desde a epidemiologia, aspectos clínicos, moleculares, imunológicos e genéticos e, além da introdução, inclui 3 artigos científicos. O primeiro e o segundo já publicados (Sousa et al, 2007; Stefani et al, 2009) e o terceiro a ser submetido para publicação.

O primeiro artigo se refere à parte de biologia molecular com a detecção do DNA de *M. leprae* em pacientes paucibacilares com lesão única e a ocorrência de reação hansênica tipo 1.

O segundo artigo discorre sobre os marcadores imunológicos de reações hansênicas, numa avaliação simultânea de 27 citocinas plasmáticas.

O terceiro e último artigo aborda sobre marcadores genéticos de reações hansênicas em um estudo de caso controle aninhado, realizado em parceria com o Dr Marcelo Mira no Laboratório de Genética da PUC do Paraná.

## RESUMO

As reações hansênicas do tipo 1 (RT1) e do tipo 2 (RT2) representam complicações no manejo clínico dos pacientes com hanseníase pois podem causar dano neural e conseqüentemente deformidades e incapacidades irreversíveis. Esta tese, apresentada sob a forma de artigo/manuscrito, abordou a identificação de potenciais marcadores para o diagnóstico e prognóstico das reações hansênicas.

O primeiro estudo investigou uma coorte multicêntrica de pacientes com lesão única de hanseníase paucibacilar que é considerada a manifestação clínica mais precoce da doença. No momento do diagnóstico os pacientes com lesão única foram submetidos à biópsia de pele para exame histopatológico e para detecção de DNA de *Mycobacterium leprae* por Reação em Cadeia da Polimerase (ML-PCR). Após o diagnóstico os pacientes foram tratados com dose única de ROM (Rifampicina, Ofloxacina e Minociclina) e acompanhados clinicamente por 3 anos, Durante o acompanhamento, em torno de 15% dos pacientes desenvolveu reação hansênica tipo 1. Em análise multivariada, idade  $\geq 40$  anos e positividade ao DNA do *M. leprae* por ML-PCR mostraram associação com a ocorrência de reação tipo 1.

Visando identificar potenciais marcadores circulantes associados com hanseníase reacional, no segundo estudo, 27 citocinas/quimiocinas/fatores de crescimento plasmáticos foram quantificados simultaneamente por ensaio multiplex. Mediante estudo de caso-controle aninhado comparamos os níveis destes fatores em pacientes com RT1 e RT2 e em pacientes com hanseníase sem reação hansênica. Estes pacientes foram pareados por sexo, grupo etário (+/- 5 anos) e por classificação histopatológica. Diferença significativa nos níveis plasmáticos de CXCL10 ( $p=0,004$ ) e de IL6 ( $p=0,013$ ) foi observada em pacientes com RT1 comparados com controles sem reação. Níveis de IL7 ( $p=0,039$ ) e PDGF-BB ( $p=0,041$ ) estavam aumentados em pacientes com RT2 e o aumento do nível de IL6 foi marginalmente significativo ( $p=0,05$ ). Esta análise dos biomarcadores plasmáticos indicou que CXCL10, IL6 e IL7 podem representar potenciais marcadores plasmáticos de reações hansênicas.

O terceiro estudo avaliou a influência do polimorfismo de base única (single nucleotide polymorphism/SNP) no *gene da IL6* e o desenvolvimento de reações hansênicas. Estudo tipo caso-controle aninhado foi desenvolvido a partir de uma coorte de 409 pacientes com hanseníase, recrutados em Goiânia-GO. Estes pacientes foram monitorados quanto à ocorrência de episódios reacionais tipo 1 e tipo 2 durante a poliquimioterapia. Foram observadas evidências positivas de associação entre RT2 e os marcadores do gene da *IL6* tag SNP rs 2069832 ( $p=0,002$ ), rs 2069840 ( $p=0,027$ ) e rs 2069845 ( $p=0,044$ ). Estes marcadores capturam a informação completa do locus do gene da *IL6*. Também foi observada associação entre RT2 e a variante funcional do gene da *IL6*- rs 1800795 ( $p=0,005$ ). Além disso, níveis plasmáticos de IL6 de pacientes de hanseníase com RT2 e controles sem reação correlacionaram com diferentes genótipos de IL6. Nenhuma associação foi observada entre variantes do gene da *IL6* e RT1. A descrição de fatores genéticos preditivos de reações hansênicas pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias preventivas contra estes eventos incapacitantes.

## ABSTRACT

Type 1 (T1R) and Type 2 (T2R) leprosy reactions are complications in the clinical management of leprosy patients because they can lead to neural damage and impairment, resulting in irreversible deformities and disabilities. This thesis, presented as research article/manuscript has investigated potential markers for the diagnosis and prognosis of leprosy reactions.

In the first study, we evaluated a multicentric cohort of leprosy patients with single skin lesion which is considered the earliest clinical manifestation of the disease. In this study, at the moment of diagnosis a skin biopsy was collected for histopathology and for the investigation of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction (ML-PCR). After diagnosis patients were treated with single dose of Rifampicin, Ofloxacin and Minocyclin (ROM) and were clinically monitored during 3 years. During follow up, around 15% of patients developed T1R. In multivariate analysis, age  $\geq 40$  years and ML-PCR positivity were associated with T1 manifestation.

The second study aimed to identify potential circulating markers associated with leprosy reactions. Plasma levels of 27 cytokines/chemokines/growth factors were quantified by multiplex assay. A nested case control study compared the levels of these factors in leprosy patients with or without T1R and T2R. Leprosy patients were paired by sex, age group ( $\pm 5$  years) and histopathological classification. Significant differences in plasma levels of CXCL10 ( $p=0.004$ ) and IL6 ( $p=0.013$ ) were observed in patients with T1R compared with controls without reaction. IL7 levels ( $p=0.039$ ) and PDGF-BB ( $p=0.041$ ) were increased in T2R and marginally significant for IL6 ( $p=0.05$ ). This investigation indicated that CXCL10, IL6 and IL7 may represent potential plasma biomarkers of leprosy reactions.

The third study investigated the influence of single nucleotide polymorphism (SNP) in the *IL6* gene and the development of leprosy reactions. For this purpose a nested case control study was performed based on a cohort of 409 leprosy patients recruited in

Goiânia-GO. After leprosy diagnosis patients were monitored during multidrug therapy regarding the appearance of leprosy T1R and T2R. Evidences of positive associations were observed for leprosy T2R and tag SNPs markers- rs 2069832 (p=0.002), rs 2069840 (p=0.027) and rs 2069845 (p=0.044). These *IL6 gene* tag SNPs capture information of the whole gene locus. Positive association with T2R was also seen for the functional variant of *IL6 gene*- tag SNP rs 1800795 (p=0.005). Additionally, IL6 plasma levels among TR2 patients and controls without reaction correlated with different IL6 genotypes. No association was observed between *IL6 gene* variants and leprosy T1R. The description of genetic predictive factors of leprosy reactions may contribute to the development of preventive strategies against these leprosy incapacitating events.



# 1 INTRODUÇÃO

## Definição

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR) típico, intracelular obrigatório, de crescimento lento e não cultivável *in vitro*, o que dificulta as pesquisas sobre transmissão, prevenção da doença e das deformidades por ela provocadas (Azulay & Azulay, 1997; Sampaio & Rivitti, 1998; Talhari et al, 2006).

A hanseníase afeta globalmente cerca de 255 mil pessoas por ano, principalmente na Ásia, na África e em algumas regiões da América, entre elas o Brasil, que é o país com maior endemicidade do mundo. No início do ano de 2007 a prevalência de hanseníase no Brasil era de 45.847 casos o que corresponde a 2,4 casos por 10 mil habitantes (WER, 2008). Em Goiás a prevalência em 2007 foi de 1,4 casos por 10 mil habitantes (SINAN/SVS/MS, 2009).

## História Natural

A hanseníase é uma doença com período de incubação, geralmente longo, podendo variar de 2 a 10 anos em média. Acredita-se que a principal forma de transmissão da hanseníase seja através das vias aéreas respiratórias de pacientes multibacilares. Após o contato com o bacilo, na dependência da imunidade do hospedeiro, a maioria dos indivíduos expostos e infectados apresenta cura espontânea. Os indivíduos que adoecem, podem desenvolver a forma indeterminada, não granulomatosa da doença, ou as formas polares tuberculóide (TT) ou lepromatosa/virchowiana (LL) ou as formas intermediárias borderlines, consideradas imunologicamente instáveis (Foss, 1999; Jacobson & Krahenbuhl, 1999; Scollard et al, 2006).

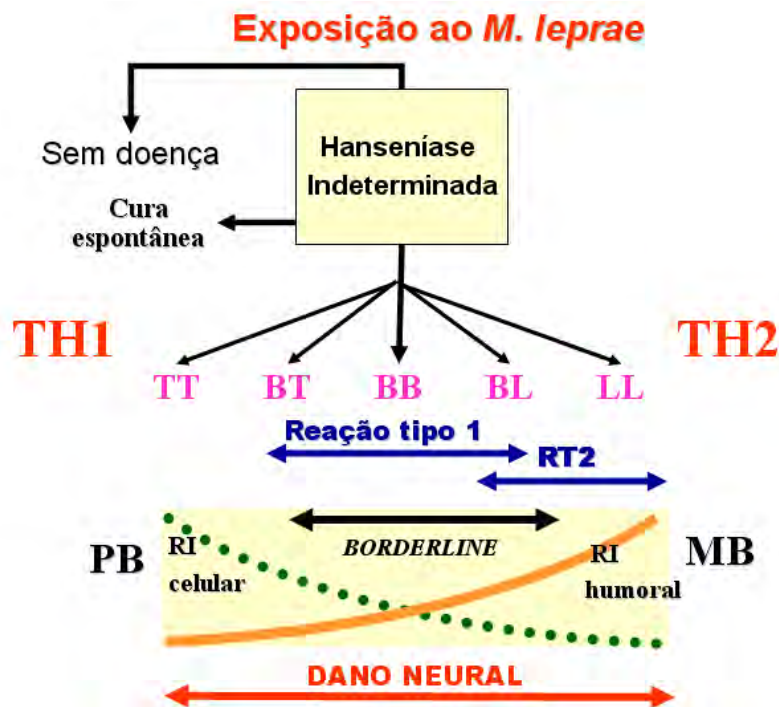


Figura 1. Espectro clínico-imunopatológico da hanseníase.

Adaptado de Jacobson e Krahenbuhl, 1999

O bacilo *M. leprae* tem afinidade pelos macrófagos e pelas células de Schwann da bainha de mielina dos nervos periféricos, o que explica a patogênese do dano neural e das incapacidades físicas permanentes (Croft et al, 2000; Rambukkana, 2000; Sarno e Pessolani, 2001; Lockwood, 2002; Scollard et al, 2006).

A hanseníase pode apresentar várias formas de manifestações clínicas. Ao exame dermatoneurológico os pacientes com forma tuberculóide e borderline apresentam uma ou poucas lesões, respectivamente, bem definidas, eritematosas ou hipocrômicas, com sensibilidade diminuída ou ausente, diminuição da sudorese local, rarefação de pelos, com ou sem comprometimento dos troncos nervosos periféricos. Os pacientes com forma lepromatosa ou virchowiana (LL) apresentam infiltração difusa, madarose, nódulos ou



tubérculos, lesões de mucosa e manifestações sistêmicas (Azulay & Azulay, 1997; Sampaio e Rivitti, 1998; Talhari et al, 2006).

## **Classificação**

A classificação de Madri, estabelecida no Congresso de Havana e Madri, baseia-se em conceitos de resistência natural ao bacilo, no estado evolutivo, na imunidade específica (através do teste de Mitsuda), nas manifestações clínicas, na baciloscopia e no exame histopatológico. Os pacientes são divididos em tipos polares e estáveis (tuberculóides e virchowianos) e grupos imunologicamente instáveis (indeterminado e dimorfo) (Sampaio e Rivitti, 1998; Talhari et al, 2006).

A classificação de Ridley e Jopling, muito utilizada em estudos científicos, baseia-se em características clínicas, imunológicas e histopatológicas. Há manutenção da forma indeterminada, além dos tipos polares estáveis (tuberculóide e virchowiano) e dos interpolares, imunologicamente instáveis dimorfos ou borderline tuberculóide (BT), dimorfo dimorfo (BB) e dimorfo virchowiano (BL) (Ridley & Jopling, 1966).

Para fins de tratamento, a organização mundial de saúde (OMS) indica o uso da classificação operacional baseada na contagem do número de lesões que o paciente apresenta. Pacientes que apresentam de 1 a 5 lesões e até um tronco nervoso periférico espessado, baciloscopia negativa, são classificados como paucibacilares. Pacientes com mais de 5 lesões e/ou mais de 1 tronco nervoso espessado e/ou baciloscopia positiva, são classificados como multibacilares (WHO, 2009a).

## **Aspectos Imunológicos**

Do ponto de vista imunológico, em seres humanos, a primeira linha de interação do *M. leprae* é representada por receptores do hospedeiro que reconhecem padrões de micobactérias, os receptores Toll-like (TLR) em células fagocitárias, principalmente TLR-2, que são ativados por lipoproteínas do *M. leprae*. A capacidade de iniciar uma resposta imune protetora está diretamente associada à secreção das interleucinas (IL) 12/23 e à

diferenciação de macrófagos tipo 1 e de células dendríticas (Verreck et al 2004; Krutzik et al 2005). A resposta imune protetora na hanseníase é de base celular na qual é destacado o papel dos linfócitos T e dos macrófagos que, ativados via citocinas, principalmente IFN $\gamma$  adquirem potencial de eliminar os bacilos (Scollard et al, 2006, revisão).

Na forma polar paucibacilar TT os pacientes apresentam uma maior resistência ao crescimento e disseminação do bacilo, devido a resposta imune do tipo Th1 ou resposta imune celular caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-12 (Yamamura et al, 1991; Modlin, 1994; Spelberg et al, 2001; Stefani et al, 2003; Scollard et al, 2006). O TNF $\alpha$  é uma citocina muito importante envolvida na regulação de doenças causadas por micobacterias (Kindler et al 1989). Nos pacientes paucibacilares há formação de granulomas de células epitelióides com lesões bem delimitadas, controlando replicação do bacilo, e os níveis de anticorpos anti-PGL-I geralmente são baixos ou indetectáveis. (Foss, 1999; Jacobson & Krahenbuhl, 1999; Stefani et al, 2003).

Os pacientes multibacilares do pólo LL não apresentam resistência ao crescimento e disseminação do patógeno. Apresentam exacerbação da resposta imune do tipo Th2 ou humoral, possuem altos índices baciloscópicos, alta produção de anticorpos anti-PGL-I e doença disseminada (Foss, 1999; Jacobson & Krahenbuhl, 1999). Como o *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, os anticorpos não tem papel protetor.

## **Exames complementares**

A baciloscopia é método auxiliar de diagnóstico, coletada em amostras de linfa de lesões, lóbulos de orelhas, cotovelos e/ou joelhos (Jacobson & Krahenbuhl, 1999), coradas pela técnica de Ziehl-Nielsen e cujos resultados são expressos pela média do índice baciloscópico – IB (Ponnighaus et al, 1987). A baciloscopia não vem sendo utilizada de forma rotineira nos programas de controle da hanseníase.

O exame histopatológico de lesões de pele não é preconizado para diagnóstico pelo Programa Nacional de Controle da Hanseníase, porém, para casos de diagnóstico duvidoso, pode ser de grande valor e auxilia no diagnóstico de certeza e classificação da doença (McDougall et al, 1987; Job, 1998; Costa et al, 2001). Pacientes com formas TT apresentam, ao exame histopatológico, granulomas bem formados, com células

epitelióides, infiltrado inflamatório perianexial e perineural. Nas formas borderlines os granulomas são mais frouxos e podem apresentar poucos ou muitos bacilos na dependência do espectro ao qual estará se direcionando. Na forma LL o infiltrado inflamatório apresenta histiócitos espumosos ou células de Virchow repletas de bacilos corados pela coloração de Fite-Faraco, não há formação de granulomas e apresentam faixa de colágeno preservado entre a epiderme retificada e o infiltrado na derme, a faixa de Unna (Ridley & Jopling, 1966; Lever & Lever, 1991; Costa et al, 2001).

Os anticorpos anti PGL-I são específicos para o antígeno glicolipídico fenólico (PGL-I) específico da parede do *M. leprae* e são principalmente da classe IgM. Estes anticorpos não apresentam reação cruzada com antígenos do *M. tuberculosis* ou com antígenos de nenhuma outra micobactéria descrita. Estudo realizado por Cho e colaboradores (1992), sugeriu que uma alta prevalência dos anticorpos anti- PGL-I da classe IgM entre crianças poderia indicar transmissão do *M. leprae*, resultando em um aumento na incidência da hanseníase na população. A utilização da sorologia anti-PGL-I em campo revelou que a soropositividade reflete o índice baciloscópio, ou seja, paciente com índice baciloscópio positivo apresenta resultado de anti PGL-I positivo, porém, apresenta baixa positividade entre os pacientes paucibacilares e as formas precoces da doença (Klatser, 2000). Sorologia anti-PGL-I foi desenvolvida no formato de teste rápido-teste ML flow e demonstrou ser um método simples, específico, que pode ser usado em campo. O emprego do teste rápido ML Flow demonstrou que a positividade ao PGL-I pode contribuir para diferenciação entre as formas paucibacilares e multibacilares da doença, principalmente em locais onde a baciloscopia de linfa não está disponível. Esta nova ferramenta de classificação de hanseníase PB e MB pode contribuir para os programas de eliminação visto que estas formas são tratadas com esquemas diferentes por tempos distintos e apresentam comportamentos diversos quanto ao risco de reação, de dano neural, de recidivas e de incapacidades (Bührer-Sékula et al 2007).

## **Tratamento**

A poliquimioterapia (PQT) vem sendo usada de forma efetiva na cura da doença e na capacidade de tornar o paciente não infectante após um tratamento considerado de curta duração. A combinação de 3 drogas: rifampicina, dapsona e clofazimina, vem sendo

recomendada desde 1981 pelo Grupo de Estudo de Quimioterapia em Hanseníase (Report of the International Leprosy Association Technical Fórum, 2002). A rifampicina é a droga bactericida mais efetiva contra o *M. leprae*, sendo que a primeira dose parece capaz de eliminar até 99,99% dos bacilos viáveis de um indivíduo, impedindo a transmissão. A rifampicina deve ser administrada em associação com outras drogas para evitar o risco de resistência bacteriana. A dapsona é uma droga bem tolerada e estima-se que, associada à clofazimina, 99,99% dos bacilos são destruídos após 3 à 4 meses de uso. O primeiro ensaio terapêutico com a droga foi realizado em 1941 (Jacobson & Trautman, 1971). A clofazimina apresenta discreta ação bactericida, e contribui para inibir a multiplicação do bacilo e tem importante ação anti-inflamatória. A clofazimina atua lentamente, matando 99% dos microorganismos em cerca de 5 meses (Ji et al, 1996). O regime terapêutico para a forma multibacilar consiste em 12 doses de rifampicina e clofazimina administradas mensalmente de forma supervisionada e no uso diário de clofazimina e dapsona podendo ser concluído em até 18 meses. Para o esquema terapêutico para a forma paucibacilar a recomendação é de 6 doses de rifampicina supervisionada mensalmente e dapsona diariamente podendo ser concluído em até 9 meses (Talhari & Neves, 2006; Sampaio & Riviti, 1998; Lechat, 2001; WHO, 2009b).

## **Reações Hansênicas**

No curso crônico da doença, podem ocorrer episódios inflamatórios agudos ou subagudos, denominados reações hansênicas, que podem levar ao dano neural, as deformidades e conseqüentemente às incapacidades, em uma parcela economicamente ativa da população (Sehgal, 1987; Rose & Waters, 1991; Bexx Bleumink et al, 1992; Lockwood et al, 1993; Walker & Lockwood, 2008). As reações hansênicas podem ocorrer antes, durante e mesmo após a alta por cura pelo uso da poliquimioterapia pelo tempo preconizado pela OMS (Jacob et al, 2008).

As reações tipo 1 e tipo 2 são condições distintas que ocorrem separadamente mas podem surgir em momentos diferentes no mesmo paciente e ambas podem resultar em perda definitiva da função neural (Rea & Sieling, 1998; Scollard et al, 2006). O dano neural é definido como qualquer redução na função sensorial ou motora do nervo. A

neurite (inflamação do tronco nervoso periférico) pode ou não ser acompanhada por dano neural clinicamente detectável (Kahawita et al, 2008).

As reações tipo 1 ou tipo 2 juntas podem acometer de 30 a 50% dos pacientes (Becx Bleumink & Berhe, 1992; Scollard et al 1994; Kumar et al, 2004). A neuropatia silenciosa foi um termo proposto para descrever a ocorrência do dano neural na ausência de sintomatologia dolorosa (van Brakel & Khawas 1994). As taxas de prevalência de reações tipo 1 variam de acordo com a população. Em uma população de pacientes brasileiros do Rio de Janeiro com baciloscopia positiva, 26% apresentaram reação tipo 1 durante o período de 2 anos de tratamento com PQT (Nery et al, 1998). Em um estudo retrospectivo feito em um centro de referência no Nepal em pacientes com forma borderline 30% desenvolveram reação tipo 1, com média de acompanhamento de 21 meses (van Brakel et al, 1994). Neste estudo, a metade dos indivíduos que tiveram reação tipo 1 apresentou dano neural. Em uma coorte de pacientes multibacilares recrutados em dois centros de referência na Índia e acompanhados por 2 anos, observou-se taxa de 19,8% de reação tipo 1 na primeira avaliação (van Brakel et al, 2005). Estudo prospectivo em 337 pacientes vietnamitas com hanseníase detectou taxa de 29,1% de reação tipo 1 (Ranque et al, 2007).

## **Reação Tipo 1**

A reação tipo 1 ou reação reversa ocorre geralmente em pacientes paucibacilares, principalmente nas formas borderlines, devido à instabilidade imunológica (Grugni et al, 1990; Roche et al, 1991; Lienhardt & Fine, 1994; Pimentel et al, 1996; Sauderson et al, 2000). Entretanto, pacientes com formas polares também podem apresentar reação tipo 1, associada a uma exacerbação da resposta imune celular tipo Th1, com predominância de expressão de citocinas IL-2, IFN $\gamma$  e IL-12 (Barnetson et al, 1976; Little et al, 2001; Stefani et al, 2003). O início da reação tipo 1 pode ser abrupto e esta é freqüentemente recorrente (van Brakel et al, 1994). O tratamento de escolha para reação tipo 1 é a corticoterapia sistêmica .

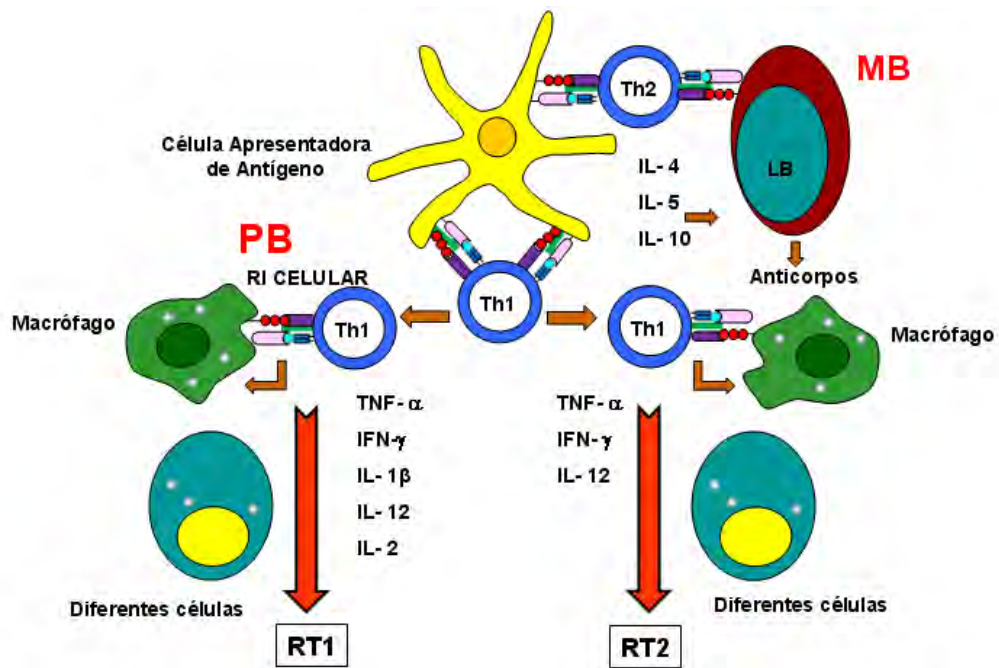


Figura 2: Imunopatogenia das reações hansênicas

A reação tipo 1 manifesta-se clinicamente por surgimento de novas lesões ou exacerbação das lesões pré-existentes com eritema, infiltração, calor local e dor, podendo chegar à necrose e ulceração ou inflamação aguda dos nervos ou ambos (Pfaltzgraff & Ramu, 1994). Simultaneamente podem ocorrer neurites e conseqüentemente paralisias e incapacidades (Scollard, 1994; Van Brakel & Khawas, 1994; Sampaio & Riviti, 1998; Talhari et al 2006). Edema de pés, mãos e face também pode ser característico de reação hansênica tipo 1, mas os sintomas sistêmicos são raros. A reação tipo 1 raramente ocorre vários anos após o término do tratamento com PQT (De Rijk et al, 1994).



Figura 3: Paciente em reação tipo 1

As reações tipo 1 são reações mediada por células T (Modlin & Rea, 1994). Suas características histopatológicas são: edema, aumento do número de linfócitos na derme e perda da organização do granuloma. Com o tempo há um aumento do número de células gigantes tipo Langerhans (Job, 1994). Antígenos de *M. leprae* foram demonstrados em

nervos e pele de pacientes com reação tipo 1 localizados nas células de Schwann e macrófagos (Lockwood et al, 2002).

Os principais fatores de risco para a ocorrência de reação tipo 1 são: formas borderlines imunologicamente instáveis da hanseníase (Lienhardt & Fine, 1994); maior número de lesões; idade mais avançada; índice baciloscópico mais alto (Kumar et al 2004; Ranque et al, 2007); grau de incapacidade física 1 ou 2 ao diagnóstico (Schreuder 1998); ocorrência de reação após início da PQT, ou durante o tratamento (van Brakel et al, 1994; de Rijk et al, 1994; Saunderson et al, 2000), puerpério (Lockwood & Sinha 1999); sorologia anti-PGL-I positiva (Roche et al, 1991; Stefani et al, 1998) e uso de infliximab para tratamento de outras doenças (ex: Doença de Crohn, artrite reumatóide e psoríase) (Scollard et al, 2006).

O infliximab é um inibidor de TNF $\alpha$ , capaz de ativar infecção latente pelo *M. leprae* ou *M. tuberculosis* em pacientes que desenvolveram tuberculose pulmonar ou hanseníase (Keane J 2004; Scollard et al, 2006). O TNF $\alpha$  tem papel crítico na granulogênese e no controle da infecção por micobactéria prevenindo a sua disseminação. Pacientes apresentando co-infecção HIV-hanseníase, após a introdução de HAART (Highly Active Anti Retroviral Therapy) podem apresentar reação reversa devido à Síndrome de Reconstituição Imune que consiste em uma reorganização da imunidade. Esta síndrome é ocorre da 4<sup>a</sup> à 24<sup>a</sup> semana após a introdução da terapia anti-retroviral devido ao aumento das células CD4<sup>+</sup> (Pereira et al, 2004; Ustianowski et al, 2006). Em estudo de pacientes com lesão única de hanseníase tratados com esquema de dose única ROM e acompanhados por 3 anos, o aumento da idade e a positividade ao DNA de *M. leprae* detectado por PCR em biópsias de pele, estiveram associados à maior chance de ocorrência de reação hansênica tipo 1 (Sousa et al, 2007).

## **Reação Tipo 2**

O eritema nodoso hansênico (ENH), manifestação mais comum da reação tipo 2, ocorre principalmente em pacientes multibacilares (BL e LL) e é considerado importante causa de morbidade entre os pacientes com hanseníase. Caso não tratada prontamente e adequadamente, a reação tipo 2 pode ocasionar em dano neural, paralisias e deformidades.



Antes da introdução da PQT mais de 50% das formas LL e 25% dos BL tratados com monoterapia com sulfona desenvolviam reação tipo 2 durante a evolução da doença (Pfaltzgraff & Bryceson, 1985). Após a introdução da PQT, provavelmente devido ao efeito anti-inflamatório da clofazimina incluída ao esquema terapêutico, observou-se declínio da frequência e gravidade de reação tipo 2 (Cellona et al, 1986). A maioria dos pacientes com eritema nodoso hansênico desenvolve múltiplos episódios durante anos (Kumar et al, 2004; Scollard et al, 2006). Estudo de coorte desenvolvido durante 11 anos na Índia mostrou que menos de 10% dos pacientes tiveram apenas um único episódio de eritema nodoso hansênico e 62,5% tiveram eritema nodoso crônico (Pocaterra et al 2006).

A reação tipo 2 corresponde a um aumento transitório da imunidade celular tipo Th1 (Mshana et al, 1982; Wallac et al, 1982; Modlin et al, 1985; Vázquez-Botet & Sánchez, 1987) e alterações da imunidade humoral. Imunocomplexos são importantes na patogênese do eritema nodoso hansênico (Drutz & Gutman, 1963; Wemambu et al 1969; Ridley & Ridley, 1983). Altos níveis de TNF $\alpha$  circulante foram encontrados em alguns pacientes com ENH (Sarno et al, 1991). A principal subpopulação de células T nas lesões do eritema nodoso é a célula T CD4+ em contraste com a hanseníase lepromatosa que tem predomínio de células T CD8+ (Modlin et al, 1986). TNF $\alpha$  e IL-6 também foram detectados em lesões de eritema nodoso enquanto a IL-4 esteve ausente ou baixa (Moraes et al 1999; Teles et al, 2002).

O ENH manifesta-se clinicamente por nódulos eritematosos dolorosos disseminados ou pápulas superficiais ou profundas ou ainda por formas ulceradas, necróticas, pustulares e bolhosas. Alguns nódulos podem persistir como uma paniculite dolorosa crônica levando à fibrose (Pfaltzgraff & Ramu, 1994). Geralmente o ENH vem acompanhado de sintomas gerais como febre, mal-estar, náuseas, vômitos e mialgia (Sampaio & Rivitti, 1998; Guerra et al 2002; Talhari et al, 2006). Edema periférico e proteinúria transitória, irite, episclerite, fotofobia, lacrimejamento, orquite, linfadenopatia, organomegalia, envolvimento de articulações, dactilite e dor óssea principalmente na tíbia podem estar presentes no ENH. Pode ocorrer neurite, porém, menos dramática que na reação tipo 1 (Pfaltzgraff et al, 1985).



Figura 4 – Paciente em reação tipo 2

O eritema nodoso hansênico pode ser classificado como leve moderado e grave para fins de tratamento. No ENH leve os pacientes apresentam menos de 10 nódulos por segmento corporal comprometido, localizados mais frequentemente nos membros inferiores, pouco dolorosos à palpação, sinais e sintomas sistêmicos ausentes ou de leve intensidade. No ENH moderado, os pacientes apresentam de 10 a 20 nódulos por segmento corporal comprometido, necessariamente mais de um, dolorosos à palpação, associados à febre de moderada intensidade ( $<38,4^{\circ}\text{C}$ ), com discreta sintomatologia sistêmica, podendo haver comprometimento de cadeia de linfonodos local e/ou regional. Na forma grave de ENH estão presentes mais de 20 nódulos por segmento corporal comprometido, dolorosos espontaneamente, podendo haver lesões ulceradas, acometendo geralmente grande área do tegumento, acompanhado de sintomatologia sistêmica exuberante como febre alta ( $>38,5^{\circ}\text{C}$ ), artralgias, calafrios, cefaléia, anorexia, fadiga e comprometimento generalizado da cadeia linfonodal (Waters et al,1967; Guerra et al 2002).

Nas reações tipo 2 o infiltrado inflamatório situa-se na derme e no subcutâneo. Em lesões agudas, de até 72 horas de aparecimento, há predomínio de neutrófilos, podendo

também estar presentes eosinófilos e mastócitos (Mabalay et al 1965). Biópsias mais tardias apresentam poucos neutrófilos e aumento do número de linfócitos, plasmócitos e histiócitos, representando um infiltrado inflamatório crônico. Outras características encontradas no eritema nodoso incluem o edema da derme e subcutâneo, vasculite e paniculite. O infiltrado na forma LL pode conter histiócitos com alteração gordurosa e arranjo difuso de células espumosas. Na forma BL o granuloma pode conter histiócitos e linfócitos (Ridley & Jopling, 1966). Nas formas LL e BL pode ser encontrada uma grande quantidade de bacilos, geralmente de aparência granular.

O tratamento de escolha para reação tipo 2, consiste na administração de talidomida, para pacientes do sexo masculino ou para mulheres que não estejam em idade fértil (Iyer & Ramu, 1976; Majumdar et al, 2002; Penna et al, 2005). Caso contrário, faz-se o uso de corticosteróides (Sampaio & Rivitti, 1998; Guerra et al, 2002; Teo et al, 2002; Talhari et al, 2006; Ura, 2007). Nas formas moderadas e graves do eritema nodoso hansênico, associa-se a talidomida à corticoterapia sistêmica. Outras drogas com efeito no tratamento da reação tipo 2 são a clofazimina (Helmy et al, 1971), pentoxifilina (Sales et al, 2007), azatioprina (Verma et al, 2006), metotrexate (Kar & Babu, 2004), zinco oral (Mahajan et al, 1994) e anticorpo monoclonal quimerico anti TNF – “Infliximab” (Faber et al, 2006).

Os principais fatores de risco para a ocorrência de reação tipo 2 são a forma LL, índice baciloscópio acima de 4, idade inferior a 40 anos e sexo feminino (Groenen et al, 1986; Manandhar et al, 1999). As reações tipo 2 aparecem mais freqüentemente durante o primeiro ano da PQT, devido à morte bacilar e liberação maciça de antígenos micobacterianos e conseqüentemente à formação dos imunocomplexos envolvidos na sua fisiopatologia (Becx-Bleumink & Berhe, 1992 Pocaterra et al, 2006) e por introdução de drogas como iodetos, brometos, dapsona, rifampicina, claritromicina e ofloxacina (Wolcott, 1947; Canizares et al, 1962; Bhargava et al, 1996). A relação entre fatores hormonais e genéticos e a incidência de eritema nodoso não foi ainda elucidada. A gravidez, lactação, ciclo menstrual (Scollard et al 1994; Lockwood & Sinhá, 1999), infecções intercorrentes, febre, vacinação e estresse psicológico podem precipitar o aparecimento de eritema nodoso. Alta incidência de eritema nodoso foi observada em pacientes com deficiência de G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase) (Banait & Junnarkar, 1971).

## Aspectos Genéticos do Hospedeiro e do Patógeno

A maioria das pessoas que vive em áreas endêmicas da hanseníase já esteve exposta ao *M. leprae*, mas, apenas uma minoria desenvolve a doença (0,1 a 1%) (Moraes et al, 2006). Existe, entre os contatos intradomiciliares com consanguinidade com o doente, um risco maior de desenvolver a doença (Moet et al 2006). Populações de diferentes etnias morando na mesma área endêmica, exibem taxas de prevalência diferentes (Beiguelman B, 1968). A susceptibilidade à hanseníase é também influenciada por características ambientais, como o estado nutricional do hospedeiro, pelas taxas de exposição ao *M. leprae* e de vacinação com BCG. As taxas de proteção com a BCG são altamente variáveis entre as diferentes populações (Packe & Innes, 1988). Alguns autores sugeriram que pelo menos 2 diferentes genes devem controlar a resposta imune à hanseníase, atuando na susceptibilidade e na forma clínica da doença (De Vries et al, 1976; Abel et al, 1988). Estudos em gêmeos na Índia mostraram uma taxa de concordância aumentada em gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos tanto para a doença *per se* como para suas formas clínicas (Chakravartii, 1973).

O seqüenciamento completo do genoma do *M. leprae* revelou extensa redução evolutiva em comparação ao genoma do *M. tuberculosis*, apresentando cerca de 50% de pseudogenes (Cole et al 2001). Esse processo evolutivo redutivo pode ter tornado o *M. leprae* um microrganismo completamente adaptado ao organismo humano, com longo período de duplicação e impossibilitando seu cultivo *in vitro*.

Estudo sobre a diversidade genética e a filogeografia do *M. leprae* sugere que este bacilo infectou o ser humano pela primeira vez na região geográfica da atual Etiópia há mais de 5000 anos (Monot et al 2005). Além disso, este estudo indica que o *M. leprae* praticamente não sofreu alterações genéticas ao longo desses anos. Apenas quatro padrões de polimorfismo de base única (SNPs) foram encontrados. O tipo 1 estava presente na maior parte da Ásia Central e leste da África. O tipo 2, mais raro, foi encontrado na região da Etiópia, Malawi, Nepal e norte da Índia. O tipo 3 foi encontrado na Europa, norte da África e Américas e o tipo 4 no oeste da África, provável berço da doença, e região do Caribe. Este estudo lança a hipótese de que os soldados de Alexandre, o Grande (século IV aC) foram os prováveis responsáveis pela disseminação do *M. leprae* pelos países

invadidos e depois retornaram ao Oriente Médio e a Europa. Neste estudo de filogeografia do *M. leprae* sugere-se que a migração dos povos, colonizações e o tráfico de escravos para as Américas também contribuíram para a disseminação do bacilo. Entretanto a baixa diversidade genética do patógeno não explica as diferenças clínicas entre os pacientes e a ocorrência das reações hansênicas.

Os SNPs são pontos de substituição de nucleotídeos bialélicos, isto é, mudança de apenas um nucleotídeo da sequência do DNA que podem ocorrer em regiões intragênicas não codificadoras, como regiões promotoras e introns, em regiões codificadoras ou em regiões intergênicas. Quando os SNPs estão localizados em regiões codificadoras eles podem modificar um aminoácido e potencialmente causar variações na estrutura e/ou função da proteína. Os haplótipos são combinações de 2 ou mais polimorfismos (como os SNPs) dentro de um único cromossomo e podem ser usados como marcadores genéticos. O estudo da presença de SNPs em genes específicos permite a investigação de associação de fenômenos biológicos a evidências epidemiológicas (Moraes et al, 2006).

A escolha dos genes candidatos para estudo genético não é tarefa fácil, uma vez que o genoma humano possui cerca de 30 a 40 mil genes. Esta escolha geralmente é baseada em três critérios: possível papel do gene/produto na patogênese da doença; localização do gene em região genômica previamente envolvida no controle da doença, ou a combinação das duas (Prevedello & Mira, 2007). Devido à importância da resposta imune na hanseníase e, sobretudo, no desencadeamento das reações hansênicas, os genes candidatos mais estudados têm sido os genes das citocinas e de outras moléculas marcadoras importantes no contexto imunológico (Moraes et al, 2006). Presença de polimorfismos tipo SNPs em diferentes genes que codificam para citocinas têm sido descritos e associados com doenças.

A utilização de rastreamentos ou “scans” genômicos permite analisar o genoma como um todo para a seleção de genes candidatos. Esta abordagem possibilita identificar uma região ou gene aparentemente não associado com a doença para ser testado como gene candidato. “Scan” genômico é também recomendado para estudos de doenças complexas com baixas taxas de mortalidade, como a hanseníase, permitindo a coleta de amostras de várias gerações, necessária para este tipo de estudo.

Os principais genes relacionados à resposta imune investigados quanto à susceptibilidade à hanseníase foram os genes do sistema *HLA* (Human Leucocyte

Antígenos), genes do *TNF $\alpha$*  da *LT $\alpha$*  e também genes que codificam importantes citocinas localizados fora do complexo *HLA*, como IL-10, IL-12/23. O complexo *HLA* é um conjunto de genes localizado no braço curto do cromossomo 6 região 6p21.

As tabelas 1 e 2 resumem os resultados dos principais estudos genéticos na hanseníase e identificam regiões e genes candidatos analisados.

Tabela 1: Resumo dos principais estudos genéticos de susceptibilidade à hanseníase *per se* e reações hansênicas.

Região/Gene candidato	Desenho	Fenótipo	População	Referência
<i>TNFA</i>	Caso-controle	Susceptibilidade formas LL -308 <sup>a</sup>	Índia	Roy et al 1997
<i>NRAMP1</i> (SLC11A1)	Pares de irmãos	Hanseníase	Vietnam	Abel et al 1998
<i>VDR</i> – 12q12-q14	Caso-controle	Tipo clínico LL (TT) e TT (tt)	Índia	Roy et al 1999
<i>NRAMP1</i>	Caso-controle	Forma clínica	Mali/ Índia	Meisner et al 2001
Região 10p13	Scan genômico	Forma PB	Índia	Siddiqui et al 2001
Região 20p12	Scan genômico	Forma PB	Índia	Tosh et al 2002
<i>TNFA</i>	Caso-controle	Proteção contra hanseníase e formas MB -308 <sup>a</sup>	Brasil	Santos et al 2002
Laminina	Polimorfismo região +7809	TT – forma LL, TC – forma TT	Indonésia	Wibawa et al 2002
Região 6q25-q27 e 6p21	Scan genômico	Hanseníase	Vietnam	Mira et al, 2003
Região 17q22 e 6p21	Scan genômico	Hanseníase	Brasil	Miller 2004
<i>PARK2/PACRG</i>	Scan genômico	Hanseníase	Vietnam/Brasil	Mira et al, 2004
<i>VDR</i>	Caso-controle	Hanseníase – CC	Malawi	Fitness et al 2004
<i>IL-10</i>	Caso-controle	Proteção/MB -3575A/-2849G/-2763C Susceptibilidade-3575T/-2849A/-2763C	Brasil	Moraes et al 2004
<i>IL-10</i>	Caso-controle -3575T/-2849G/-2763C -3575T/-2849A/-2763C -3575T/-2849G/-2763C	Hanseníase e forma MB Proteção Susceptibilidade Proteção	Índia Brasil Índia Índia	Malhotra et al 2005
<i>IL12RB2</i>	Caso-controle	Susceptibilidade (-1035G,-1023G,-464G)	Japão	Ohyama et al 2005
<i>MICA – MICB</i>	Pares de irmãos PB Associação	Susceptibilidade – variação funcional <i>MICA</i> e polimorfismo microsat próximo ao gene <i>MICB</i>	Índia	Tosh et al 2006
<i>LTA</i>	Ligação	Susceptibilidade à hanseníase <i>per se</i>	Vietnam do sul, Índia e Brasil	Alcais et al 2007
<i>TLR2</i>	Caso-controle	Susceptibilidade RT1 - 597T (protetor) Homozigose p/ 280pb com risco para RT1	Etiópia	Bochud et al 2008
<i>TLR1</i>	Associação	Proteção RT1 (1805G)	Nepal	Misch et al 2008
<i>IL-10</i>	Caso controle / metanálise	Susceptibilidade -819T		Pereira et al 2009

Tabela 2: Resumo dos principais estudos sobre HLA e hanseníase

<b>Região/Gene candidato</b>	<b>Desenho</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>População</b>	<b>Referência</b>
<i>HLA DR2</i>	Caso-controle	LL/BL	Turquia	Cem Mate t al 1988
		TT	Tailândia	Schauf et al 1985
		TT	Brasil	Visentainer et al 1997
		TT	Índia	Rani et al 1993
		LL/BL		
		Hanseníase per se		
		TT	Índia	Mehra et al 1995
		TT	Índia	Zerva et al 1996
<i>HLA DR3</i>	Caso-controle	TT	Suriname	Van Eden et al 1985
<i>HLA DRB1*04</i>	Caso-controle	resistência	Brasil/Vietnam	Vanderborght et al, 2007
<i>HLA DRB1*10</i>		susceptibilidade		
<i>TAP2 – HLA DR15</i>	Caso-controle	Susceptibilidade (TAP2B)	TT Índia	Rajalingam et al 1997



Vários estudos de ligação e associação demonstraram envolvimento de alelos e haplótipos do complexo *HLA* de classe II, principalmente as moléculas *HLA-DR2* e *HLA-DR3*, como sendo fatores de risco importantes na susceptibilidade a formas clínicas da hanseníase (Schauf et al,1985; Van Eden et al 1985; Cem Mate et al, 1988; Rani et al, 1993; Mehra et al 1995; Zerva et al, 1996; Visentainer et al, 1997).

Os genes A e B relacionados à MHC classe I (Major Histocompatibility Complex Class I Chain Related A e B - *MICA* e *MICB*) fazem parte do complexo HLA de classe II. Estudo recente com pares de irmãos com hanseníase paucibacilar da Índia identificou associação entre a doença e uma variação funcional do gene *MICA*, bem como polimorfismo tipo microsatélite próximo ao gene vizinho *MICB* (Tosh et al 2006).

Os genes do *TNF* estão localizados na região cromossômica da classe III do complexo MHC, região 6p21.3. O *TNFA* é o gene que codifica o fator de necrose tumoral alfa, uma citocina pró-inflamatória que participa de vários processos biológicos, como a modulação da resposta imune, tanto inata quanto adaptativa.  $TNF\alpha$  está envolvido na formação do granuloma, com controle da infecção por micobactéria e atua impedindo sua disseminação. Polimorfismo no gene *TNFA*, variante – 308 A, está associado tanto com susceptibilidade, quanto à resistência à hanseníase em populações de etnias distintas (Roy et al, 1997; Santos et al, 2000; Santos et al, 2002). Parece que, pelo menos nos pacientes brasileiros, os portadores da variante – 308 A (e portadores do -308A/+252G) são capazes de restringir a replicação do *M. leprae* e a progressão da doença, possivelmente pela produção de altos níveis de  $TNF\alpha$  e  $LT\alpha$ . O aumento de  $TNF\alpha$  e IL-10 indica melhor prognóstico na hanseníase entre os contatos intradomiciliares (Lima et al, 2000).

O gene *LTA* codifica a linfotoxina alfa, que é uma citocina importante na modulação da resposta inflamatória localizada na região III do complexo MHC. Alcais e colaboradores encontraram forte evidência de ligação entre alelos do gene *LTA* e susceptibilidade à hanseníase *per se* em populações do Vietnã do Sul e Índia (Alcais et al 2007). “Scans” genômicos completos em famílias com hanseníase foram realizados e apontam para a existência de *loci* não *HLA* envolvidos no controle das manifestações da hanseníase.

O gene IL-10 está localizado no cromossomo 1, região 1q31-q32. Seu produto é considerado uma molécula anti-inflamatória, que contrabalança o efeito das citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ ). A IL-10 é uma citocina imuno-regulatória envolvida na produção de IL-4, na expansão de células Th2 e na proliferação e diferenciação de células B. A IL-10 é importante na modulação da resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae*. Existe evidência que a IL-10 participa na resistência/susceptibilidade à hanseníase. Alguns autores detectaram efeito protetor de haplótipo específico formado por três marcadores de região reguladora do gene IL-10, tanto contra a doença propriamente dita, quanto contra sua forma multibacilar, enquanto que o haplótipo alternativo composto por alelos dos mesmos três marcadores estava associado com susceptibilidade à hanseníase (Moraes et al 2004).

Um estudo utilizando metodologia de caso-controle, metanálise e estudos biológicos para testar relevâncias epidemiológicas e fisiológicas de marcadores genéticos de IL-10 demonstrou que o alelo -819T estava associado com susceptibilidade à hanseníase tanto em estudo de caso-controle quanto meta-análise (Pereira et al 2009).

Utilizando-se “scan” genômico entre indianos, com predomínio da forma paucibacilar da hanseníase, encontrou-se ligação da região cromossômica 10p13 com susceptibilidade à forma paucibacilar da doença (Siddiqui et al 2001). Esse achado foi replicado através de “scan” genômico realizado com população vietnamita (Mira et al, 2003). Neste último estudo, a região 6q25-q27 foi encontrada ligada com hanseníase. Posteriormente, Mira e colaboradores, em 2004, identificaram 17 SNPs associados com a hanseníase. Análise de desequilíbrio de ligação da região candidata mostrou que 15 dos 17 SNPs associados estavam localizados em um único bloco, cobrindo a região reguladora compartilhada por dois genes: o gene do parkinsonismo juvenil autossômico recessivo (AR-JP), denominado Parquína (*PARK2*) e o gene PACRG (gene co-regulado com parquína). Uma análise de regressão logística multivariada detectou dois tag SNPs que capturavam completamente a informação de associação observada na região. Haplótipos definidos por estes dois tag SNPs estavam associados com aumento de até 5,28 vezes do risco de contrair hanseníase. Estes achados foram reproduzidos em uma população do Rio de Janeiro (Mira et al 2003; Mira et al, 2004).

O gene *VDR* (receptor de vitamina D) está localizado no 12q12-q14 e é responsável pelos efeitos biológicos da vitamina D. A forma ativa da vitamina D induz a diferenciação de monócitos, enquanto a ativação macrofágica através do VDR, em

combinação com TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , é responsável pela destruição do *M. tuberculosis*. Em estudo feito na população indiana encontrou-se associação entre variantes do gene *VDR* e a hanseníase e detectou a susceptibilidade à forma LL e TT na presença dos genótipos TT e tt respectivamente (Roy et al, 1999). Grande estudo de caso controle em pacientes do Malawi revelou susceptibilidade à hanseníase *per se* na presença do genótipo CC (Fitness et al, 2004).

A proteína SLC11A1 (solute Carrier family 11, member 1), também conhecida como NRAMP1 (natural resistance-associated macrophage protein-1), está localizada na região 2q35 e tem papel no transporte de íons. *NRAMP1* foi descrito como um gene envolvido na resistência/susceptibilidade a patógenos intracelulares em camundongos. Estudo realizado em famílias vietnamitas, relatou ligação entre marcadores do gene *NRAMP1* e hanseníase (Abel et al, 1998).

Dentre outros genes estudados os genes da *IL-12R  $\beta$ 2*, da laminina e são considerados bons candidatos para susceptibilidade à hanseníase (Ohyama et al 2005; Wibawa et al 2002). Polimorfismo na posição +7809 do gene da laminina estava associado a genótipos TT e TC e ao desenvolvimento da forma LL e TT, respectivamente em população da Indonésia (Wibawa et al 2002).

Aumento estatisticamente significativo da frequência de eritema nodoso foi observado em pacientes com forma LL portadores de moléculas do MHC do tipo HLA-A11 (Agrewala et al 1988).

Trabalhos recentes mostram a influência de fatores genéticos no desencadeamento de reações hansenícas. Um estudo feito em 933 pacientes, de diversas etnias, com hanseníase no Nepal e controles saudáveis de Seattle, revelou que a presença do alelo 1805G no gene do TLR1 estava associada à proteção contra a reação tipo 1. Trata-se do primeiro estudo para descrever a associação de marcadores tipo SNP no gene do TLR1 com resposta imune mediada por células Th1. No Nepal foi observada uma tendência à associação da variante 1805G com formas lepromatosas, em comparação com as formas tuberculóides. Esta tendência, embora não tenha sido estatisticamente significativa, é consistente com uma deficiência da imunidade do tipo Th1, necessária para a forma tuberculóide da doença (Misch et al, 2008).

Estudo tipo caso-controle realizado na Etiópia investigou se o polimorfismo do tipo microssatélite no gene do TLR2 estava associado com susceptibilidade à

hanseníase e/ou reações hansênicas. Foram recrutados, durante 5 anos, 441 pacientes, de 3 etnias, com hanseníase que foram comparados com controles saudáveis e seguidos por 5 a 11 anos após o tratamento. Reações hansênicas foram relatadas em 216 pacientes, sendo que a maioria das reações tipo 1 ocorreram no primeiro ano de acompanhamento. Pacientes que apresentaram reações foram seguidos por pelo menos 8 anos. No gene do TLR2 foi encontrada associação entre a presença de homozigose para a extensão alélica de 280pb e um risco aumentado de reação tipo 1 e o alelo -597T teve efeito protetor (Bochud et al. 2008). Apesar de serem os únicos estudos até o momento que abordam a associação entre ferramentas genéticas e reações hansênicas eles não apresentaram uma escolha adequada dos controles, uma vez que utilizaram indivíduos saudáveis, que não têm a chance de apresentar episódios reacionais.

## 2 JUSTIFICATIVA

As reações hansênicas são responsáveis pela maioria dos casos de internação na Hanseníase e também pelas incapacidades físicas que podem surgir no decorrer da doença crônica. A identificação de marcadores moleculares, imunológicos e genéticos das reações hansênicas pode contribuir para diagnóstico precoce e para o desenvolvimento de estratégias profiláticas nos pacientes de maior risco. A implementação destas medidas poderá contribuir para a prevenção de lesão neural e incapacidades permanentes características da Hanseníase.

Até o momento não dispomos de testes laboratoriais aplicáveis a uso em campo que indiquem a predisposição à ocorrência de episódios reacionais e pouco se conhece sobre fatores genéticos potencialmente associados a reações hansênicas. A maioria dos estudos genéticos publicados usou como controles, indivíduos saudáveis sem a doença, que na verdade não tem risco de apresentar episódios reacionais, pois não tem Hanseníase.

Diversas evidências indicam a existência e importância de fatores moleculares, imunológicos e genéticos potencialmente associados à ocorrência de reações hansênicas.

### 3. OBJETIVOS

1) Detectar DNA de *M. leprae* pela técnica de reação em cadeia da polimerase em pacientes paucibacilares de hanseníase com lesão única de pele e avaliar se a positividade tinha associação com a ocorrência de reação tipo 1;

2) Identificar potenciais marcadores plasmáticos de reações hansênicas em dosagem simultânea de 27 citocinas plasmáticas em pacientes com reação hansênica tipo 1 e 2;

3) Avaliar a associação entre marcadores genéticos tipo SNPs no gene da IL6 e a ocorrência de reação hansênica tipo 1 ou 2 entre pacientes com hanseníase recrutados em Goiânia, GO.

## 4. ARTIGOS

**Artigo 1 - *Mycobacterium leprae* DNA associated with type 1 leprosy reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose Rifampin, Ofloxacin and Minocycline.**

Autores: Ana Lúcia O. M. de Sousa, Mariane M. A. Stefani, Gisner A. S. Pereira, Maurício B. Costa, Paula F. Rebello, Maria Katia Gomes, Kazue Narahashi, Thomas P Gillis, James L Krahenbuhl e Celina M. T. Martelli

Revista: The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (Publicado)

**Artigo 2 – Potential Plasma Markers of Type 1 and Type 2 Leprosy Reactions: A Preliminary Report.**

Autores: Mariane M Stefani, Jackeline G Guerra, Ana Lucia M Sousa, Celina T Martelli, Mauricio B Costa, Maria Leide W Oliveira, David M Scollard

Revista: BMC Infectious Diseases (Publicado)

**Artigo 3 – Genetic and Serologic Evidences Implicate IL6 as a Susceptibility gene for Leprosy type 2 reaction.**

Autores: Ana Lúcia M Sousa, Vinícius M Fava, Lucas H Sampaio, Celina M T Martelli, Maurício B Costa, Marcelo T Mira, Mariane M A Stefani

Submetido à publicação

**Artigo1: *Mycobacterium leprae* DNA ASSOCIATED WITH TYPE 1  
LEPROSY REACTIONS IN SINGLE LESION PAUCIBACILLARY  
LEPROSY TREATED WITH SINGLE DOSE RIFAMPIN,  
OFLOXACIN E MINOCYCLINE.**

***M. leprae* DNA ASSOCIATED WITH TYPE 1 REACTION IN  
SINGLE LESION PAUCIBACILLARY LEPROSY TREATED**



**WITH SINGLE DOSE RIFAMPIN, OFLOXACIN AND  
MINOCYCLINE**

ANA LUCIA O. M. SOUSA, MARIANE M. A. STEFANI, GISNER A. S. PEREIRA,  
MAURICIO B. COSTA, PAULA F. REBELLO, MARIA KATIA GOMES, KAZUE  
NARAHASHI, THOMAS P GILLIS, JAMES L KRAHENBUHL AND CELINA M.  
T. MARTELLI

*Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiania,  
Goiás, Brazil; Alfredo da Matta Foundation – WHO Reference Leprosy Laboratory,  
Manaus, Amazonas, Brazil; Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,  
Brazil; Secretariat of Health, Porto Velho, Rondonia, Brazil; National Hansen's  
Disease Programs Baton Rouge, Louisiana*

- Correspondence:

Mariane MA Stefani

Mailing address: Tropical Pathology and Public Health Institute,

Universidade Federal de Goiás Rua 235 esq. c/ 1ª Avenida, S/N. Setor Universitário.  
Goiania, Goiás, Brazil CEP 74605-050.

Phone:55 62 3209 6111 Fax:55 62 32511938

e-mail: mstefani@iptsp.ufg.br

***Abstract***

Leprosy affects skin and peripheral nerves and acute inflammatory type 1 reaction (reversal reaction) can cause neurological impairment and disabilities. Single skin lesion paucibacillary leprosy volunteers (n=135) recruited in three Brazilian endemic regions, treated with single dose rifampin, ofloxacin, minocycline (ROM), were monitored for 3 years. Poor outcome was defined as type-1 reaction with or without neuritis. IgM anti-phenolic glycolipid I, histopathology, Mitsuda test, and *Mycobacterium leprae* DNA polymerase chain reaction (ML-PCR) were performed at baseline.  $\chi^2$  test, Kaplan Meir curves and Cox proportional hazards were applied. The majority of volunteers were adults: mean age  $30.5 \pm 15.4$  years, 44.4% were ML-PCR positive. During follow-up 14.8% of the patients had a poor clinical outcome, classified as type 1 reaction. Older age ( $\geq 40$  years), ML- PCR positivity, and lesion size  $> 5\text{cm}$  were associated with increased risk. In multivariate analysis, age ( $\geq 40$  years) and ML-PCR positivity remained baseline predictors of type 1 reaction among monolesion leprosy patients.

## Introduction

As reported by the World Health Organization (WHO) at the beginning of 2006 the registered global prevalence of leprosy was 219,826, with Brazil reporting the second largest number of both registered cases and newly detected cases during 2005. Newly detected cases in Brazil have shown only a modest decline over the last 5 years indicating that active transmission of *Mycobacterium leprae* is still occurring despite more than two decades of effective multidrug therapy (MDT).<sup>1</sup>

Acute inflammatory episodes before, during, or after MDT, known as type 1 (reversal reaction) and type 2 (erythema nodosum leprosum [ENL]) leprosy reactions, can lead to permanent disabilities and handicaps. The clinico-pathologic characteristics of tuberculoid and lepromatous forms of leprosy and their associated reactions depend on TH<sub>1</sub> and TH<sub>2</sub> -type immunity in skin lesions respectively.<sup>2-4</sup> To determine MDT regimens for treating patients, leprosy can be classified as paucibacillary (PB), defined by few localized skin and neurological lesions with low bacterial load, and multibacillary (MB), characterized by high bacterial load and systemic clinical features.

In 1997 the WHO proposed a single dose ROM regimen (rifampicin, ofloxacin, minocycline) to treat single skin lesion leprosy based on a clinical trial performed in India.<sup>5</sup>

Leprosy diagnosis is largely clinically-based and would benefit from reliable, specific and sensitive laboratory tests capable of diagnosing early paucibacillary forms of the disease.<sup>6</sup> Anti-phenolic glycolipid I (PGLI) serology and acid-fast bacilli (AFB) staining techniques have low sensitivity for early PB leprosy diagnosis and, therefore, have been restricted to research applications.<sup>7-10</sup> Detection of *M. leprae* DNA by polymerase chain reaction (PCR) in tissue samples has been shown to increase the sensitivity and specificity of early PB leprosy diagnosis;<sup>11</sup> however, its usefulness for prognosis remains to be shown.

Single skin lesion, paucibacillary (SSL-PB) disease is considered one of the earliest clinical forms of leprosy. A multicentric prospective cohort of SSL-PB patients recruited in three Brazilian endemic settings and treated with one-dose ROM therapy was conducted and the clinico-epidemiologic, histopathology and cytokine features have been described previously.<sup>7,8,12</sup> This study describes the main clinico-epidemiologic, serologic features and the presence of *M leprae* DNA detected by PCR associated with poor outcome, predominantly type 1 reactions, for a subgroup of this SSL-PB cohort during a 3-year clinical follow-up after ROM therapy.

## **Materials and Methods**

**Study population and setting.** Leprosy volunteers were recruited among outpatients attending health care units from three Brazilian endemic regions: north, Amazonas and Rondonia States; central-west, Goias State; southeast-Rio de Janeiro State. Written informed consent was obtained from all participants or legal guardians for volunteers < 18 years old. This study was approved by the National Ethical Review Board (CONEP-Brazilian Ministry of Health).

From November 1997 through December 1998, a total of 259 consecutive cases of single skin lesion leprosy patients (SSL-PB) were enrolled and treated with a single-dose ROM therapy. Because of logistics, in two recruitment sites, the collection and

storage of specimens for ML- DNA PCR started later. Therefore, for 135 volunteers, skin biopsies were available for ML-PCR and for this reason, the results herein presented refer to a subgroup of patients.

All volunteers had a neuro-dermatological examination performed by dermatologists, with expertise in leprosy, to select eligible SSL-PB patients. Lesion size and the presence of bacillus Clamette-Guérin (BCG) scar were reported for all patients at baseline as previously reported.<sup>7,8</sup>

**Eligibility criteria.** Inclusion criteria were newly detected untreated single skin lesion leprosy patients without nerve involvement and classified as paucibacillary according to bacterial index (BI) and histopathologic readings. Exclusion criteria were volunteers <7 years of age, pregnant or breastfeeding women, and patients seropositive for HIV by history or medical record.

**Clinical Outcomes.** The main outcome was type-1 reaction with or without neuritis, that required steroid intervention. A type 1 reaction was diagnosed when a patient had erythema and edema of the skin lesion, which may be accompanied by neuritis and edema of the hands, feet and face. The skin signs are obligatory; the nerve and general signs optional. For the purpose of analysis, a type-1 reaction was considered a poor clinical outcome. The secondary outcome was the shift from PB to MB classification as the only event (without neuritis or type-1 reaction). The change from PB to MB disease classification was observed in two patients.

**Follow-up.** By December 2001 a 3-year clinical prospective follow-up was accomplished for the SSL-PB leprosy cohort treated with single dose ROM. During the initial 6-months, monolesion leprosy patients were clinically assessed monthly, and thereafter, every 6 months until completion of follow-up. The follow-up was performed by the same team of dermatologists who decided the needs of intervention related to reactions and neuritis treatment, re-treatment by 6 months of the PB MDT regimen, or 12 months of the MB regimens. These clinical events required clinical intervention with either steroid or conventional MDT treatment. Time to event occurrence was measured from the date of ROM intake until the main outcome (type-1 reaction with or without neuritis) for the censored patients. Throughout the study period the clinical follow-up in each site was performed by one dermatologist who was blinded to the histopathologic classification, the anti-PGL1 serology and *M. leprae* DNA PCR results. Standardized

forms were used to collect data that were entered into our central computer database in Federal University of Goiás, Brazil to ensure accuracy.

**Histopathology.** As part of this study, skin biopsies were collected at the rim area of the lesion, bisected and one half was snap-frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to perform *M. leprae*-DNA PCR. Histopathology was performed in the other half of the biopsy on paraffin sections ( $5\mu\text{m}$ ) stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Fite-Faraco for AFB. Histopathologic readings were classified according to Ridley-Jopling criteria and classified as indeterminate (I), tuberculoid (TT) or borderline tuberculoid (BT).<sup>7</sup> Approximately 50% of the skin biopsies ( $n=66$ ) were from north region patients, 42 samples were from central-west, and 27 samples were from southeast region patients. Histopathology is not part of the routine leprosy control program.

***M. leprae* DNA PCR in skin lesion biopsies.** Bisected skin biopsies were snap-frozen on collection and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and genomic DNA was extracted using phenol/chloroform/isoamyl alcohol. *M. leprae* DNA was amplified in undiluted and in 1:5 diluted samples using primers for a 360-bp *M. leprae* DNA fragment of the 18kd gene.<sup>13</sup> Amplified products were detected by slot blot hybridization using a digoxigenin-labeled 212bp DNA probe.<sup>12</sup> Positive and negative control samples were included in each run. Duplicate samples were compared to positive and negative controls, and positivity was scored by visual observation of 360-bp band on agarose gels and slot blot autoradiographs by two independent observers. Specimens were processed blinded to patient's characteristics at the Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Brazil.

**Serology.** Blood samples for anti-PGLI serology were collected at baseline before ROM therapy. ELISA tests for IgM anti-PGL I antibodies were performed as previously described.<sup>14</sup> Briefly, PGL I synthetic disaccharide covalently coupled to bovine serum albumin (a gift from M. J. Colston, London, UK) was used at  $0.25\mu\text{g/mL}$  concentration and serum samples diluted at 1/300. Goat anti-human IgM-peroxidase conjugate ( $\mu$ -chain specific, Sigma, St Louis, MO) was used, and reaction was developed with *O*-phenylenediamine dye reagent ( $0.4\text{mg/mL}$  Sigma). The calculated cutoff for positivity using sera-endemic individuals was optical density (OD)  $>0.2$ .

**Mitsuda test.** The Mitsuda preparation ( $40,000,000 M. leprae$  cells/mL; Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos, Instituto de Saúde do Paraná, Brazil) was

injected intradermally (0.1 mL), and reaction at 3 weeks was measured. A positive result was considered for skin indurations  $\geq 5$  mm in diameter as previously described.<sup>8</sup>

**Statistical analysis.** Initial analysis was performed with a  $X^2$  test for categorical variables and with a two-tail  $p$  value. The disease progression endpoint was defined as poor clinical outcome during follow-up. Distributions to time to outcome were estimated by Kaplan-Meier methods. We applied Cox proportional hazard modeling to calculate the association between baseline predictors and outcome. This multivariate modeling was performed to control for potential confoundings, including variables associated with both exposure and outcome. Hazard ratios (HR) were interpreted as relative risks. A two-tailed  $\alpha$  level of 0.05 was used. Statistical analysis was performed with the SPSS for Windows 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Results

The main baseline characteristics of the 135 monolesion leprosy patients included in this study were as follows: mean age,  $30.5 \pm 15.4$  years; 55.6% women; and 65.9% single skin leprosy lesions were  $\leq 5$  cm. Almost two-thirds of the SSL-PB patients had a positive Mitsuda test ( $\geq 5$ mm cutoff) and 12.6% had positive IgM anti-PGLI serology ( $>0.2$  OD). SSL-PB patients were evenly distributed among histopathologic groups: 32.6% were I, 32.6% were TT and 34.8% were BT. Characteristics of the participants herein analyzed were similar to those of the entire cohort considering age and sex distribution and histologic results at baseline. The subgroup of SSL-PB patients tested for PCR also presented similar percentages of a type 1 reaction during 3-year follow-up compared with the entire cohort (14.8% versus 19.4%;  $p=0.5$ ; data not shown).

Among 135 monolesion leprosy cases, *M. leprae* DNA was detected in skin biopsies by PCR in 44.4% (60/135; 95% CI, 35.9-53.2). In univariate analysis, patients positive for *M. leprae*-DNA PCR at baseline were older ( $\geq 40$  years) and had larger lesion size ( $\geq 5$  cm) than those testing negative by PCR. Data on sex, histopathology, anti-PGLI serology, Mitsuda test, and presence of BCG scar had similar proportions between patients positive and negative for *M. leprae* DNA PCR.

During clinical monitoring, a total of 20 (14.8%) of the 135 patients presented with a type 1 reaction, 5 of them with neuritis. Two BT patients shifted from PB to MB leprosy. Single-lesion patients that tested positive by *M. leprae* DNA PCR at baseline presented consistently higher probability to progress to a poor clinical outcome than those testing negative (Figure 1B). The Kaplan-Meier curves were similar during the first 12 months, and thereafter, the difference between the two groups increased over time. The log-rank test results (log-rank, 5.4;  $p = 0.01$ ), indicated a statistically significant difference for poor outcome between the *M leprae*-DNA PCR-positive and -negative groups (Figure 1B). Event incidence increased strikingly after the second year of follow-up. The median time to the occurrence of poor clinical event was 19.6 months (95% CI, 14.8 to 24.5). Twenty-four patients were lost to follow up at the end of 3-year monitoring: one of them died and the others have moved away and could not be traced back. The mean time of follow-up was 31.4 months (95% CI, 29.6 to 33.3).

A higher probability associated with a poor outcome was also observed for patients  $\geq 40$  years compared with younger patients ( $p < 0.001$ ) (Figure 1A) and for patients with lesion size  $\geq 5$  cm ( $p < 0.01$ ) (Figure 1C). Mitsuda skin test, histopathology groups and IgM anti-PGLI serology were not associated with poor outcomes.

Univariate analysis of clinical, molecular, and epidemiologic characteristics associated with a poor clinical outcome indicated that patients  $\geq 40$  years of age had a three-fold increased risk for a poor clinical outcome compared with patients 7-39 years age (Table 1). Patients with skin lesions positive for *M. leprae* DNA at baseline had increased HR of poor outcome compared with *M leprae* DNA PCR negative patients (HR = 2.5; 95%CI, 1.2-6.8), and patients with lesion  $\geq 5$  cm had increased risk of poor outcome. Table 1 shows that older age group and *M. leprae*-DNA PCR positivity remained as independent predictors of event occurrence after adjustment for potential confounders in the multivariate model.

## **Dicussion**

Our study showed that older patients ( $\geq 40$  years), and *M leprae*-DNA PCR positivity in patients were the most important risk factors for poor clinical outcome among mono-lesion PB leprosy patients from Brazil, treated with single-dose ROM

therapy. We defined poor outcome as a type 1 reaction with or without neuritis. A recent study conducted among Vietnamese leprosy patients indicated that age > 15 years at leprosy diagnosis was a strong independent risk factor for type 1 reactions and sequelae.<sup>15</sup> A positive BI and borderline tuberculoid leprosy were also identified as risk factors for a type 1 reaction in the Vietnamese cohort. The first of these factors, positive BI, supports our finding of an association between PCR positivity in skin lesions of SSL-PB patients and type 1 reactions.

Among our cohort, *M leprae* could be confirmed by PCR in almost one half of the patients. This finding is compatible with the sensitivity of *M leprae*-DNA PCR among PB leprosy patients, which has been reported to range from 34% to 74%.<sup>16</sup> During clinical monitoring, ~14.8% of the 135 patients presented with a type 1 reaction. *M leprae* PCR positivity in skin biopsies collected at baseline was associated with a higher frequency of type 1 reactions and represented the only laboratory test associated with poor clinical outcome during the 3-year follow-up period. One fourth of *M leprae* PCR-positive patients developed type 1 reaction compared with 9.3% among PCR-negative subjects (p=0.03).

IgM anti PGLI serology, known to reflect the bacillary load, has lower sensitivity for PB disease.<sup>9,14</sup> The monolesion leprosy patients recruited in our study were PB, defined by negative bacilloscopy, and thus, low levels of anti-PGLI antibodies were expected in this cohort.<sup>10</sup> Anti-PGLI seropositivity has been reported as a risk factor for a type 1 reaction<sup>17</sup>; however, no association between anti-PGLI levels and type 1 reactions was seen among our cohort of single lesion leprosy patients.

Type 1 reactions, considered the leading cause of neurological impairment in patients with leprosy, represented the main poor clinical outcome in the SSL-PB patients. Leprosy reactions are acute immune-inflammatory episodes that may develop during the chronic course of leprosy, particularly among the immunologically unstable BT forms.<sup>17-21</sup> In our study, BT leprosy was not statistically associated with a type 1 reaction compared with I or TT groups. Among the cohort of SSL-PB leprosy cases, the *in situ* cytokine profile defined by real time RT-PCR indicated effective TH1-type cell-mediated immunity, which is compatible with both healing and type 1 reactions observed during monitoring.<sup>12</sup> In fact, in this cohort, complete disappearance of the lesion was observed in more than one half of the censored patients. This result is



statistically similar to the cure rate reported by the WHO-sponsored clinical trial to evaluate one-dose ROM therapy.<sup>5</sup>

It is worth mentioning that during the 3-year clinical follow-up after ROM therapy, no severe reactional episode was observed and that conventional steroid therapy was sufficient to prevent nerve damage. The incidence of poor outcomes seen in our study was similar to that observed among a PB cohort from Ethiopia.<sup>22</sup> The shift from PB to MB forms was extremely rare among mono-lesion cases and likely caused by the strict eligibility criteria we adopted to increase specificity of diagnosis before one-dose ROM therapy.

In summary, our findings indicate that age ( $\geq 40$  years) and *M. leprae* PCR positivity at baseline were potential risk factors for type 1 reactions among single lesion leprosy. Accordingly, the value of *M. leprae*-DNA PCR positivity as a marker for type 1 reactions deserves further evaluation in larger studies to address its potential as a marker of clinical prognosis.

**Acknowledgments:** The authors thank the staff of the collaborative institutions for their support during clinical follow-up.

**Financial support:** This work was supported by United Nations Development Programme/World Bank/World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (Grant #981007) and Brazilian Research Council CNPq Grants 307963/2004-7 to CMTM and 450010/0007 to MMAS. This Multicentric SSL-PB project was conducted by the following Brazilian Institutions: Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás (IPTSP/Goiás State – host institution), Fundação Alfredo da Matta (FUAM/Amazonas State), Federal University of Rio de Janeiro and Fiocruz (Rio de Janeiro State), and Leprosy Control Program (Rondônia State) in partnership with the National Hansen's Disease Program, Louisiana (NHDP/USA).

## References

1. World Health Organization, 2007. Leprosy: global situation. Available at [www.who.int/lep/situation](http://www.who.int/lep/situation). Accessed January 2, 2007.
2. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, Rea TH, Bloom BR, 1988. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1213--1217.
3. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL, 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254: 277--279.
4. Ridley D, Jopling W, 1966. Classification of leprosy according to immunity; a five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 31: 255--273.
5. Single-lesion Multicentre Trial Group, 1997. Efficacy of single dose multidrug therapy for the treatment of single-lesion paucibacillary leprosy. Single-lesion Multicentre Trial Group. *Indian J Lepr* 69: 121--129.
6. Aseffa A, Brennan P, Dockrell H, Gillis T, Hussain R, Oskam L, Richardus JH, 2005. Report on the first meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) consortium held at Armauer Hansen Research Institute, ALERT, Addis Ababa, Ethiopia on 24--27 October 2004. *Lepr Rev* 76: 147--159.
7. Costa M, Cavalcanti FF, Martelli CMT, Stefani MMA, Macieira J, Gomes MK, Schettini A., Rebello P, Pignataro P, Ueda E, Narahashi K, Scollard D, 2000. Distinct histopathological patterns of single skin lesion leprosy patients treated with single dose therapy (ROM) in the Brazilian multicentric study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 169:177-- 86.
8. Martelli C, Stefani M, Gomes M, Rebello P, Peninni S, Narahashi K, Maroclo A, Costa M, Silva S, Sacchetim S, Nery J, Salles A, Gillis T, Krahenbuhl J, Andrade A, 2000. Single lesion paucibacillary leprosy: baseline profile of the Brazilian multicenter cohort study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 68: 247--257.

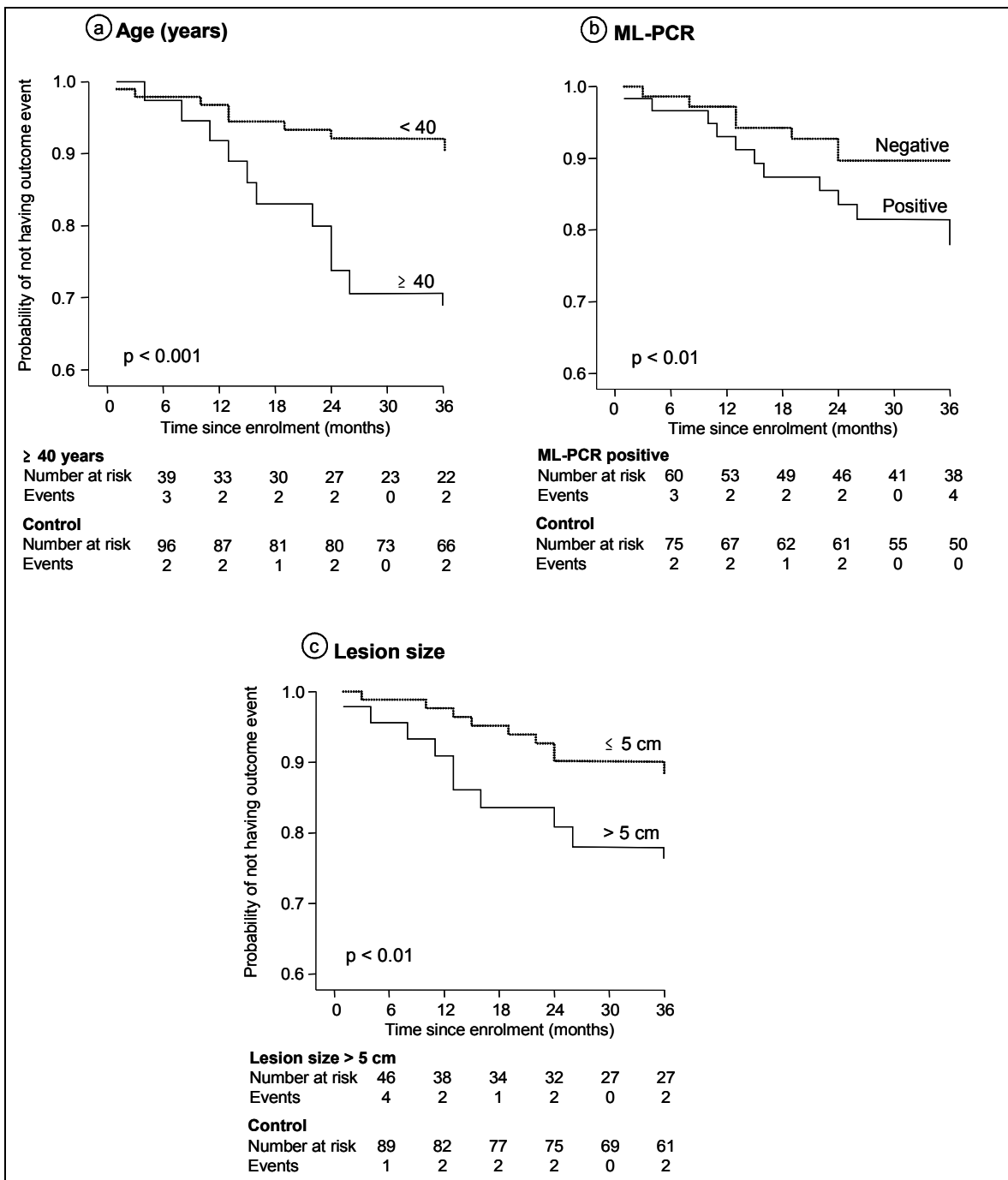
9. Oskam L, Slim E, Buhrer-Sekula S, 2003. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev* 74: 196--205.
10. Ponnighaus J, Fine P, 1988. Sensitivity and specificity of the diagnosis and the search for risk factors for leprosy. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 82.
11. Donoghue HD, Holton J, Spigelman M, 2001. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol* 50: 177--182.
12. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL, 2003. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. *J Infect Dis* 188: 1024--1031.
13. Williams D, Gillis T, Booth R, Looker D, Watson J, 1990. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Inf Dis* 162.
14. Stefani M, Martelli C, Morais-Neto O, Martelli P, Costa M, Andrade A, 1998. Assessment of anti-PGL 1 as a prognostic marker of leprosy reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 66: 356--364.
15. Ranque B, Nguyen VT, Vu HT, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, Schurr E, Abel L, Alcais A, 2007. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. *Clin Infect Dis* 44: 33--40.
16. Scollard D, Gillis T, Williams D, 1998. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. 642--646.
17. Roche PW, Theuvenet WJ, Britton WJ, 1991. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. *Lancet* 338: 654--657.
18. Britton WJ, 1998. The management of leprosy reversal reactions. *Lepr Rev* 69: 225--234.
19. Lienhardt C, Fine PE, 1994. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? *Lepr Rev* 65: 9--33.

20. Lockwood D, 2002. Leprosy elimination - a virtual phenomenon or a reality? *BMJ* 324: 1516--1518.
21. Rose P, Waters M, 1991. Reversal reactions in leprosy and their management. *Leprosy Review* 62.
22. de Rijk AJ, Gabre S, Byass P, Berhanu T, 1994. Field evaluation of WHO-MDT of fixed duration, at ALERT, Ethiopia: the AMFES project--II. Reaction and neuritis during and after MDT in PB and MB leprosy patients. *Lepr Rev* 65: 320--332.

**Table 1. Multivariate Cox proportional hazards modeling for poor clinical outcome among single lesion leprosy patients**

Baseline factors	Crude	Adjusted Hazard Ratio (95% CI)	<i>P</i>
Age (yr)* ≥ 40 vs. < 40	3.41 (1.4 – 8.2)	2.8 (1.2 – 6.5)	0.01
ML PCR test Positive vs. negative	2.5 (1.2 – 6.8)	2.1 (1.1 – 5.4)	0.04
Lesion size ≥ 5 cm vs. < 5 cm	1.7 (1.1 – 2.8)	1.4 (0.8 – 4.8)	0.16
Anti PGLI serology Positive vs. negative	0.9 (0.3 – 3.3)	0.8 (0.2 – 8.0)	0.10

Figure 1. Kaplan-Meier curves for poor outcome among single skin lesion paucibacillary leprosy patients stratified by (A) age  $< 40$  and  $\geq 40$  years; (B) *M leprae* PCR-positive and -negative groups; and (C) lesion size  $< 5\text{cm}$  and  $\geq 5\text{cm}$ .



**Artigo 2: POTENTIAL PLASMA MARKERS OF TYPE 1 AND  
TYPE 2 LEPROSY REACTIONS: A PRELIMINARY REPORT**



## **Title: POTENTIAL PLASMA MARKERS OF TYPE 1 AND TYPE 2 LEPROSY REACTIONS: A PRELIMINARY REPORT**

Authors: Mariane M Stefani<sup>1§</sup>, Jackeline G Guerra<sup>1</sup>, Ana Lucia M Sousa<sup>1</sup>, Celina T Martelli<sup>1</sup>, Mauricio B Costa<sup>2</sup>, Maria Leide W Oliveira<sup>3</sup>, David M Scollard<sup>4</sup>

### Affiliations

1. Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goias, Goiania, GO, Brazil.
2. Faculty of Medicine, Federal University of Goias, Goiania, GO, Brazil.
3. Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
4. National Hansen's Disease Programs, Baton Rouge, LA, USA.

<sup>§</sup> Corresponding author: Mariane Martins de Araújo Stefani

### Email addresses

MMS: [mariane.stefani@pq.cnpq.br](mailto:mariane.stefani@pq.cnpq.br)

JGG: [jackelineguerra@terra.com.br](mailto:jackelineguerra@terra.com.br)

ALS: [anamaroclo@gmail.com](mailto:anamaroclo@gmail.com)

CTM: [Celina@pq.cnpq.br](mailto:Celina@pq.cnpq.br)

MBC: [mbarceloscosta@gmail.com](mailto:mbarceloscosta@gmail.com)

MLO: [mleide@uol.com.br](mailto:mleide@uol.com.br)

DMS: [dscoll1@lsu.edu](mailto:dscoll1@lsu.edu)

## Abstract

**Background:** The clinical management of leprosy Type 1 (T1R) and Type 2 (T2R) reactions pose challenges mainly because they can cause severe nerve injury and disability. No laboratory test or marker is available for the diagnosis or prognosis of leprosy reactions. This study simultaneously screened plasma factors to identify circulating biomarkers associated with leprosy T1R and T2R among patients recruited in Goiania, Central Brazil. **Methods:** A nested case-control study evaluated T1R (n=10) and TR2 (n=10) compared to leprosy patients without reactions (n=29), matched by sex and age-group (+/- 5 years) and histopathological classification. Multiplex bead based technique provided profiles of 27 plasma factors including 16 pro inflammatory cytokines: tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukin (IL)-IL12p70, IL2, IL17, IL1  $\beta$ , IL6, IL15, IL5, IL8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha (MIP1 $\alpha$ ), 1 beta (MIP1 $\beta$ ), regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), CC-chemokine 11 (CCL11/Eotaxin), CXC-chemokine 10 (CXCL10/IP10); 4 anti inflammatory interleukins: IL4, IL10, IL13, IL1R $\alpha$  and 7 growth factors: IL7, IL9, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), platelet-derived growth factor BB (PDGF BB), basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF). **Results:** Elevations of plasma CXCL10 (P=0.004) and IL6 (p=0.013) were observed in T1R patients compared to controls without reaction. IL7 (p=0.039), and PDGF-BB (p=0.041) were elevated in T2R. RANTES and GMCSF were excluded due to values above and below detection limit respectively in all samples. **Conclusions:** Potential biomarkers of T1R identified were CXCL10 and IL6 whereas IL7 and PDGF-BB may be laboratory markers of TR2. Additional studies on these biomarkers may help understand the immunopathologic mechanisms of leprosy reactions and indicate their usefulness for the diagnosis and for the clinical management of these events.

## Background

Leprosy reactions are major causes of hospitalization and disability of patients with leprosy, a chronic granulomatous disease of the skin and peripheral nerves caused by the *Mycobacterium leprae*. These are understood to be consequences of the dynamic nature of the immune response to *M. leprae*, and they may occur before diagnosis, during treatment or after multidrug therapy (MDT). Leprosy “Type 1” reactions (T1R), also described as “reversal” reactions, occur in 30-40% of borderline patients with cellular immune responses to *M. leprae* (1). T1R usually develops abruptly as exacerbations of pre-existing skin and nerve lesions. Treatment with corticosteroids alleviates symptoms, but often requires many weeks or months of moderate to high doses.

“Type 2” reactions (T2R), also known as *erythema nodosum leprosum* (ENL), occur only in lepromatous (LL) and borderline lepromatous (BL) patients with a high bacterial load and little or no cellular immunity to *M. leprae* (1). T2R develop abruptly, with crops of red, tender nodules on various parts of the body, and histological evidence of acute inflammation. The natural course of T2R is typically 10 - 14 days, but without treatment severe tissue damage, including nerves, often results. Corticosteroids and thalidomide reduce the inflammation in T2R, but many patients have multiple, recurrent episodes.

Neuritis and cutaneous inflammation are prominent symptoms of both types of reaction, but the systemic nature of these reactions is evident from the patterns of malaise, fever, and inflammation in other tissues that are characteristic of both T1R and especially T2R reactions. In leprosy reactions, peripheral immunological and inflammatory mechanisms are undoubtedly important, but enhanced central immunological reactivity in spleen and lymph nodes may contribute to the overall illness. In human studies, plasma provides an appropriate sample of the soluble mediators produced by central lymphoid organs.

Cytokines play important roles in both protection and immunopathology of leprosy and are considered important components of leprosy reactions (reviewed in 2). T1R have been characterized by *in situ* Th1 type immunity with spontaneous increase in cell mediated immunity with infiltration of IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ , secreting CD4<sup>+</sup> T cells in

skin lesions and nerves. The T2R is a systemic inflammatory response characterized by neutrophil infiltration, activation of complement extra-vascular immune complexes and high levels of TNF $\alpha$  in tissue lesions and in the circulation (3), (4), (5). The presence of *M. leprae* DNA detected by PCR in skin lesions has been demonstrated to be a molecular marker of T1R among single skin lesion PB leprosy (6). Despite evidences of immunological and molecular mediators of leprosy reactions, no individual marker or combination of markers has been sufficiently associated with either reaction to enable its use as a laboratory test for the diagnosis or management of T1R or T2R.

The goal of this study was to screen potential plasma markers in Type 1 and Type 2 leprosy reactions. Profiles of 27 markers including 16 circulating pro inflammatory, 4 anti inflammatory cytokines and 7 growth factors were compared among T1R and T2R patients and leprosy patients without reaction (matched for age, sex, and leprosy type).

## **Methods**

**Patients.** This study was designed as a nested case-control study within a cohort of 349 newly detected untreated leprosy patients recruited between February 2004 and October 2005 at a main outpatient clinic in Central Brazil (Reference Center for Diagnosis and Treatment, Goiania city). Eligibility criteria were: newly diagnosed untreated leprosy patients. Leprosy patients living outside the study area or patients not willing to come for follow up were excluded. At baseline, patients were given complete dermatological and neurological evaluations by a dermatologist and a physiotherapist with expertise in leprosy diagnosis. Slit skin smears and skin lesion biopsies were collected at baseline and histopathological readings were classified according to Ridley-Jopling criteria (7). All patients received the standard WHO MDT regimen for PB or MB disease and patients were followed-up during MDT to monitor any episode of leprosy reaction. Leprosy reactions were treated according to the guidelines from the Brazilian Leprosy Control Program.

In this study, T1R cases were selected from untreated leprosy patients clinically diagnosed with T1R (n=10) at the time of their initial diagnosis. These patients had severely indurated and erythematous lesions at the site of previously indolent macules,

according to the medical history. T2R cases (n=10) were selected among patients who had the T2R at diagnosis (n=4) or during follow up (n=6). The following case definitions were employed: T1R was defined as an acute clinical manifestation, usually characterized by the exacerbation of pre-existing lesions, the appearance of new lesions with or without neuritis. T2R was characterized by the sudden appearance of tender erythematous skin nodules mainly accompanied by fever and other systemic symptoms such as joint pain, bone tenderness, neuritis, edema, malaise, anorexia with or without lymphadenopathy. Controls were selected among leprosy patients with the same histopathological classification as the reaction patients but did not have reaction at the time of initial diagnosis or during follow-up. These controls were also matched by sex and age-group ( $\pm$  5 years). Ten controls were found suitable for TR1 and 9 controls for TR2.

**Data Collection and Ethical Issues.** A standardized Case Report Form (CRF) was applied to all patients to collect data on age, sex, duration of symptoms, clinical characteristics, neurological impairment, onset of reaction and final classification. This study was approved by the institutional review board and all patients gave written, informed consent.

**Blood Collection and Cytokine Analysis.** Blood was collected in EDTA, centrifuged immediately, and plasma aliquots were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to assay.

**Cytokine Array System .** This study employed a commercially available premixed human cytokine 27-plex panel of cytokines (Bio-Plex Cytokine reagent kit, BIO RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). This system consists of multiplex beads and detection antibodies designed to quantitate, in pg/ml, multiple cytokines in plasma samples. This study employed the premixed 27-plex panel of human cytokines. For data analysis the 27 cytokines were stratified into 3 functional categories: A. Pro-inflammatory cytokines-  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ , IL12, IL2, IL17, IL1  $\beta$ , IL6, IL15, IL5, IL8, CXCL10, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , RANTES, MCP1 and CCL11; B. Anti-inflammatory cytokines- IL4, IL10, IL13 and IL1 $\alpha$ ; C. Growth Factors- IL7, IL9, GMCSF, GCSF, PDGF-BB, FGF-Bas and VEGF.

EDTA plasma samples stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  were thawed, centrifuged at 1,000x g at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min, supernatants were filtered (sterile 0.22 $\mu\text{m}$  Millipore filters) and used immediately. All samples were tested in duplicate at 1/3 dilution in species specific Bio-

plex sample diluent, and blank values (background) were subtracted from all readings. Premixed lyophilized cytokine standards, premixed anti cytokine conjugated beads, detection antibodies and Streptavidin-PE were prepared according to manufacturer instructions. All assays were read on the Luminex 100 Instrument (Austin, Texas) and data analysis performed with the Bio-Plex-Manager software which includes determination of assay precision and determination of goodness of fit of the regression algorithm.

**Statistical Analysis.** The concentration of individual cytokines in pg/ml in each patient was used for data analysis. Descriptive statistics were applied to the patient's characteristics. Exploratory data analysis, including box-plot, medians and standard deviation were calculated for the concentration of each cytokine and results were stratified by groups of cases (T1R and T2R) and compared to plasma concentrations obtained in their respective control groups. Statistical significance was assessed by Kruskal-Wallis one way analysis of variance for comparison of multiple groups and Mann-Whitney for comparison between two groups. P values < 0.05 were considered statistical significant results.

## **Results**

**Patients' characteristics.** The main baseline clinical characteristics of the 39 leprosy patients tested during T1R (n=10) and controls (n=10) or T2R (n=10) and controls (n=9) are shown in Table 1. Adult males around 40 years of age predominated in all groups. Patients with T1R and controls were classified by clinical and histopathological criteria as BT and none had acid-fast bacilli in skin smears (BI = 0). Patients with T2R and controls had LL disease; all had acid-fast bacilli in skin smears. For patients diagnosed during a reactional episode (10/10 T1R and 4/10 T2R cases), a wide variation in the duration of symptoms prior to diagnosis was reported: median of 50 days for T1R and 15 days for T2R. No clinical differences were identified between patients who had T2R on diagnosis compared to those who developed the reaction after starting MDT. None of the leprosy patients included in the study had neuritis. Prednisolone was the treatment of choice for all T1R patients. T2R patients were treated with steroid (n=6) or thalidomide (n=3) or steroid and thalidomide combination (n=1).

**Cytokine Analysis.** Regardless of the study group and cytokine classification, a wide variation was observed in the plasma concentration of cytokines tested. Among pro-inflammatory cytokines, IL-6 levels ranged from 31.81 to 724pg/ml, median =103.20 (SD=129.42). For anti-inflammatory cytokines IL1R $\alpha$  values ranged from 44.24pg/ml to 2642pg/ml, median=179.52 (SD=529.63). Among growth factors the widest variation was observed from PDGF BB concentration (median=4264.47; SD=3131.78). Two out of 27 cytokines tested, RANTES and GM-CSF were excluded from the analysis because their values were above and below detection limit respectively. High RANTES levels were probably artifacts, since platelets had not been removed from the plasma prior to freezing.

**Pro-inflammatory cytokines.** Box plots distributions indicate differences in median plasma concentrations for all of the 15 inflammatory cytokines stratified by T1R cases and controls (Figure 1A) and T2R and controls (Figure 2A). The difference of CXCL10 median plasma concentration among T1R and their matched controls was highly significant ( $p=0.004$ ) (Fig 1A). IL6 also showed statistically significant differences between T1R patients and matched controls ( $p=0.013$ ) (Fig.1A), while the difference for T2R patients and matched controls did not reach statistical significance ( $P=0.05$ ) (Fig. 2A). The differences between medians of CCL11 concentrations among T2R (363.6 pg/ml) and controls (218.6 pg/ml) were notable but not statistically significant ( $p=0.06$ ) (Fig. 2A).

The differences between median values of TNF $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL1  $\beta$ , IL12, IL15, IL2, IL5, IL8, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ , IL17, MCP1 were not statistically different ( $p>0.05$ ) for non-reactive T1R-controls and T2R-controls (Figures 1A and 2A). For TNF $\alpha$  the median for T2R cases was 171.8 pg/ml and for the control group without reaction the median was 67.7 pg/ml ( $p=0.297$ ). The medians of IFN $\gamma$  for T2R and controls were 358.0 pg/ml and 315.4 pg/ml respectively (Fig.2A). No associations were observed between cytokine and chemokine concentrations and the duration of reaction symptoms (data not shown), although the sample may be too small to reliably determine this.

**Anti-Inflammatory cytokines.** The difference between median values of IL10 plasma concentrations among T2R patients (median=56.9 pg/ml) and controls (median=39.4 pg/ml) was marginally significant ( $p=0.07$ ) (Figure 2B). Regarding IL4, IL13 and IL1R $\alpha$  there was no statistically significant difference in the plasma concentration

medians between type 1 and type 2 reactional groups and their respective control leprosy groups without reaction (Figures 1B, 2B).

**Growth Factors.** Regarding IL7, IL9, GMCSF, GCSF, PDGF-BB, FGF-Bas and VEGF, no difference was observed among T1R and controls (Figure 1C). For T2R the difference of medians between cases and controls was statistically significant for IL-7 ( $p=0.039$ ) and PDGF-BB ( $p=0.041$ ) and marginally significant for VEGF ( $p=0.06$ ) (Figure 2C).

## Discussion

This is the first description of the plasma profiles of a reasonably large panel of pro-inflammatory, anti-inflammatory and growth factors assessed simultaneously by multiplex technique among T1R and T2R patients compared to well-matched leprosy patients without reaction. The results indicate that CXCL10 is a promising biomarker of T1R, at least in BT patients, since those with T1R had a significant elevation of circulating CXCL10. This is the first observation of high levels of circulating CXCL10 in leprosy.

CXCL10, one of the IFN- $\gamma$  inducible chemokines that recruits effector Th1 type cells to delayed type hypersensitivity sites, has been previously identified in tuberculoid lesions (8). Although our study was not designed to investigate mechanisms, the higher levels of CXCL10 detected in T1R suggest its involvement in the T1R immunopathology probably by attracting Th1 type cells to the reactional inflammatory sites in the skin, ( reviewed in 1).

CXCL10 has been associated with Th1 type responses in several clinical systems recruiting CXCR3<sup>+</sup> effector lymphocytes from the peripheral blood into lupus erythematosus skin lesions (9), and into inflammatory lesions of the central nervous system (10). CXCL10 has been proposed to be an immune marker of disease progression in HIV and tuberculosis patients (11) and was increased in sarcoidosis patients' serum. High levels of CXCL10 were found in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients' during intense inflammatory process (12), (13), (14).



CXCL10 has not been associated with inflammation of peripheral nerves but its possible involvement in the neuropathy associated with T1R deserves further study.

Another promising systemic marker of T1R is the inflammatory cytokine IL6, which promotes cell mediated immune reactions notably by stimulating IL17, and by inhibiting regulatory T cells. IL6 stimulates the synthesis of acute-phase proteins and is elevated in stressful inflammatory or infectious conditions (15). Increased serum IL-6 has recently also been reported in T2R, and in lepromatous versus tuberculoid disease (16).

Greater IL7 was observed in LL patients with T2R compared to non-reacting LL patients. We did not observe increased circulating levels of IL7 in tuberculoid patients compared to lepromatous ones, unlike earlier skin biopsy studies which found greater IL7 mRNA expression in tuberculoid lesions versus lepromatous ones, and T2R lesions showed the weakest IL7 expression (17). Different immunological activity in the central lymphoid system (reflected in the circulation) versus sites of inflammation in tissue may explain this. IL7 is a key regulator of B cell development and proliferation (18), and is essential for the survival of naïve and memory T cells, especially CD4 memory cells (19). Elevated circulating levels of IL7 in T2R thus provide support a role for both B-cell and T-cell mediated mechanisms in this reaction.

CCL11 previously named eotaxin, a chemokine induced by interferon- $\gamma$  and produced by monocytes, was identified as a potential plasma marker of T2R. Recently, greater plasma concentrations of CCL11 have been shown in Brazilian MB leprosy patients, when compared to non infected individuals (20). CCL11 is a potent chemo attractant for eosinophils and probably other cell types such as Th2 lymphocytes, to inflammatory sites (21), (22). It is possible that CCL11 participates in attracting inflammatory cells to T2R sites.

Anti-inflammatory cytokines down-modulate inflammatory responses and reduce immunopathology. Among anti-inflammatory cytokines (IL4, IL10, IL13 and IL1RA) only IL10 showed marginally significant difference for T2R. This finding is in agreement with previous studies in plasma, IL10 mRNA in T2R skin lesions, and after in vitro stimulation of peripheral blood mononuclear cells of T2R patients (4),(23), (24), (25), (26).

Significant differences were observed between T2R and controls for the growth factors PDGF-BB and VEGF, both of them known to promote angiogenesis. This is an interesting finding as T2R are often associated with vasculitis (27), (28).

While several studies indicate an important role for TNF $\alpha$  in reactional states, especially T2R (29), (30), (31), (32), this finding has not always been confirmed (33), (34). Our results indicated that TNF $\alpha$  levels among reactional patients were not statistically different from the non-reactional patients in this study. Previous studies with T2R patients have reported undetectable or low levels of TNF $\alpha$  (35) or have not found increased circulating TNF $\alpha$  (31), (36). This study evaluated levels of TNF $\alpha$  in plasma and used a multiplex bead assay, unlike most prior work that has used ELISA technology to assess cytokines in serum.

IL17, produced by pro-inflammatory TH17 lineage of effector CD4<sup>+</sup> T helper lymphocytes, induces the production of chemokines and antimicrobial peptides by tissue cells leading to the recruitment of neutrophils and inflammation (37). However in this study IL17 did not show significant difference between reactional and non reactional leprosy patients.

## **Conclusions**

This survey of circulating cytokines has identified elevations in CXCL10 and IL6 as promising markers for leprosy T1R. These findings are consistent with T1R cell-mediated immunopathologic basis. IL7 and PDGF-BB represent potential markers of T2R. Additional studies may determine the sensitivity and specificity of these cytokines as leprosy reactions markers. The identification of T1R and T2R markers can contribute to their clinical diagnosis and for monitoring their resolution during treatment. In addition, these findings may provide new clues to the pathogenesis of leprosy reactions.

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

MMS and DMS conceived of the study, carried out the immunoassay, participated in its design, coordination and drafted the manuscript; JGG and ALS were responsible for patients' diagnosis, recruitment, treatment and participated in the data analysis; MBC was in charge of the histopathological analysis; MLO participated in the design of the study; CMT participated in the design of the study, coordination and performed the statistical analysis. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Brazilian Research Council CNPq (grant # 401276/2005-8) and from the American Leprosy Missions. We are grateful to the patients and staff of the Reference Center for Diagnosis and Treatment, Goiania city for their cooperation.

## References

1. Scollard DM, Smith T, Bhoopat L, Theetranont C, Rangdaeng S, Morens DM: **Epidemiologic characteristics of leprosy reactions**. *Internat J Lepr Other Mycobact Dis* 1994, **62**:559-567.
2. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RT, Williams DL: **The Continuing Challenges of Leprosy**. *Clin Microbiol Rev* 2006, **19**:339-381.
3. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SMM, Pirmez C, Kino H, Convit J, Rea TH, Bloom BR : **Learning from lesions: Patterns of tissue inflammation in leprosy**. *Proc Nat Acad Sci USA* 1988, **85**:1213-1217.
4. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP: **Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL)**. *Scand J Immunol* 1999, **50**:541-549.
5. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL; Brazilian Leprosy Study Group: **In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression**. *J Infect Dis* 2003, **188**:1024-1031.
6. Sousa AL, Stefani MM, Pereira GA, Costa MB, Rebello PF, Gomes MK, Narahashi K, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Martelli CM: **Mycobacterium leprae DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline**. *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**:829-833.
7. Ridley DS, Jopling WH: **Classification of leprosy according to immunity - a five-group system**. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966, **34**:255-273.
8. Kaplan G, Nathan CF, Gandhi R, Horwitz MA, Levis WR, Cohn ZA: **Effect of recombinant interferon-g on hydrogen peroxide-releasing capacity of monocyte-derived macrophages from patients with lepromatous leprosy**. *J Immunol* 1986, **137**:983-987.

9. Wenzel J, Zahn S, Mikus S, Wiechert A, Bieber T, Tuting T: **The expression pattern of interferon-inducible proteins reflects the characteristic histological distribution of infiltrating immune cells in different cutaneous lupus erythematosus subsets.** *Br J Dermatol* 2007, **157**:752-757.
10. Carter SL, Muller M, Manders PM, Campbell IL: **Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN-gamma but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia in vitro.** *Glia* 2007, **55**:1728-1739.
11. Djoba Siawaya JF, Ruhwald M, Eugen-Olsen J, Walzl G: **Correlates for disease progression and prognosis during concurrent HIV/TB infection.** *Int J Infect Dis* 2007, **11**:289-299.
12. Scarpini E, Galimberti D, Baron P, Clerici R, Ronzoni M, Conti G, Scarlato G: **IP-10 and MCP-1 levels in CSF and serum from multiple sclerosis patients with different clinical subtypes of the disease.** *J Neurol Sci* 2002, **195**:41-46.
13. Mahad DJ, Howell SJ, Woodroffe MN: **Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002, **72**:498-502.
14. Tanuma N, Sakuma H, Sasaki A, Matsumoto Y: **Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis.** *Acta Neuropathol* 2006, **112**:195-204.
15. Mastorakos G, Ilias I: **Interleukin-6: a cytokine and/or a major modulator of the response to somatic stress.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1088**:373-381.
16. Belgaumkar VA, Gokhale NR, Mahajan PM, Bharadwaj R, Pandit DP, Deshpande S: **Circulating cytokine profiles in leprosy patients.** *Lepr Rev* 2007, **78**:223-230.
17. Sieling PA, Sakimura L, Uyemura K, Yamamura M, Oliveros J, Nickoloff BJ, Rea TH, Modlin RL: **IL-7 in the cell-mediated immune response to a human pathogen.** *J Immunol* 1995, **154**:2775-2783.
18. Milne CD, Paige CJ: **IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis.** *Semin Immunol* 2006, **18**:20-30.

19. Surh CD, Boyman O, Purton JF, Sprent J: **Homeostasis of memory T cells.** *Immunol Rev* 2006, **211**:154-163.
20. Mendonca VA, Malaquias LC, Brito-Melo GE, Castelo-Branco A, Antunes CM, Ribeiro AL, Teixeira MM, Teixeira AL: **Differentiation of patients with leprosy from non-infected individuals by the chemokine eotaxin/CCL11.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**:547-550.
21. Bandeira-Melo C, Herbst A, Weller PF: **Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, **24**:653-657.
22. Gutierrez-Ramos JC, Lloyd C, Gonzalo JA: **Eotaxin: from an eosinophilic chemokine to a major regulator of allergic reactions.** *Immunol Today* 1999, **20**:500-504.
23. Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD: **Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy.** *Int J Dermatol* 1998, **37**:733-740.
24. Sreenivasan P, Misra RS, Wilfred D, Nath I: **Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions.** *Immunol* 1998, **95**:529-536.
25. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL: **Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage.** *J Immunol* 1992, **149**:1470-1475.
26. Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Bharadwaj M, Brooks P, Colston MJ, Misra RS, Ramesh V: **Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum.** *Lepr Rev* 2000, **71** (Suppl S): 130-137.
27. Pfaltzgraff RE, and Bryceson, A: **Clinical Leprosy.** In: Hastings RC, editor. *Leprosy.* New York: Churchill Livingstone; 1985: 134-176.
28. Requena L, Sanchez Yus E : **Panniculitis. Part II. Mostly lobular panniculitis.** *J Am Acad Dermatol* 2001,**45**(3):325-361; 62-4.
29. Sarno EN, Grau GE, Vieira LMM, Nery JA: **Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1B during leprosy reactional states.** *Clin Exp Immunol* 1991, **84**:103-108.

30. Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JA, Miguel CP, Viana SM, Sarno EM: **The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum.** *J Infect Dis* 1993, **168**:408-414.
31. Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL: **Tumor necrosis factor production in patients with leprosy.** *Infect Immun* 1992, **60**:1441-1446.
32. Foss NT, de Oliveira EB, Silva CL: **Correlation between TNF production, increase of plasma C-reactive protein level and suppression of T lymphocyte response to concanavalin A during erythema nodosum leprosum.** *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993, **61**:218-226.
33. Bhattacharya SN, Chattopadhyaya D, Saha K: **Tumor necrosis factor: status in reactions in leprosy before and after treatment.** *Int J Dermatol* 1993, **32**:436-439.
34. Villahermosa LG, Fajardo TT, Jr., Abalos RM, Balagon MV, Tan EV, Cellona RV, Palmer JP, Wittes J, Thomas SD, Kook KA, Walsh GP, Walsh DS: **A randomized, double-blind, double-dummy, controlled dose comparison of thalidomide for treatment of erythema nodosum leprosum.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:518-526.
35. Haslett PA, Roche P, Butlin CR, Macdonald M, Shrestha N, Manandhar R, Lemaster J, Hawksworth R, Shah M, Lubisnky AS, Albert M, Worley J, Kaplan G: **Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation.** *J Infect Dis* 2005, **192**(12):2045-2053.
36. Andersson AK, Chaduvula M, Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Jain S, Suneetha L, Lockwood DN: **Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions.** *Infect Immun* 2005, **73**(6):3725-3733.
37. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE: **IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages.** *Annu Rev Immunol* 2007, **25**:821-852.

**Table 1. Baseline clinical characteristics of patients with leprosy reactions and controls without reaction.**

<i>Characteristics</i>	T1R <sup>1</sup>	Controls <sup>2</sup>	T2R <sup>3</sup>	Controls <sup>4</sup>
Patients n (%)	10	10	10	9
Sex				
men	8 (80.0)	8 (80.0)	8 (80.0)	7 (77.8)
women	2 (20.0)	2 (20.0)	2 (20.0)	2 (20.0)
Age (median)	42.9	41.4	38.9	43.3
(min-max)	(26-60)	(26-59)	(17-69)	(13-68)
Classification				
BT	10	10	-	-
LL	-	-	10	9
Bacilloscopic Index				
(median)	0	0	3.25	2.75
(min-max)	(-)	(-)	(2.5-5.0)	(2.5-5.0)
Reaction at diagnosis	10 (100.0)	-	04 (40.0)	-
Duration of symptoms prior to diagnosis (days)				
(median)	50	-	15	-
(min-max)	(3-120)		(3-60)	

<sup>1</sup> Type 1 Reaction

<sup>2</sup> Paucibacillary leprosy patients without reaction

<sup>3</sup> Type 2 Reaction

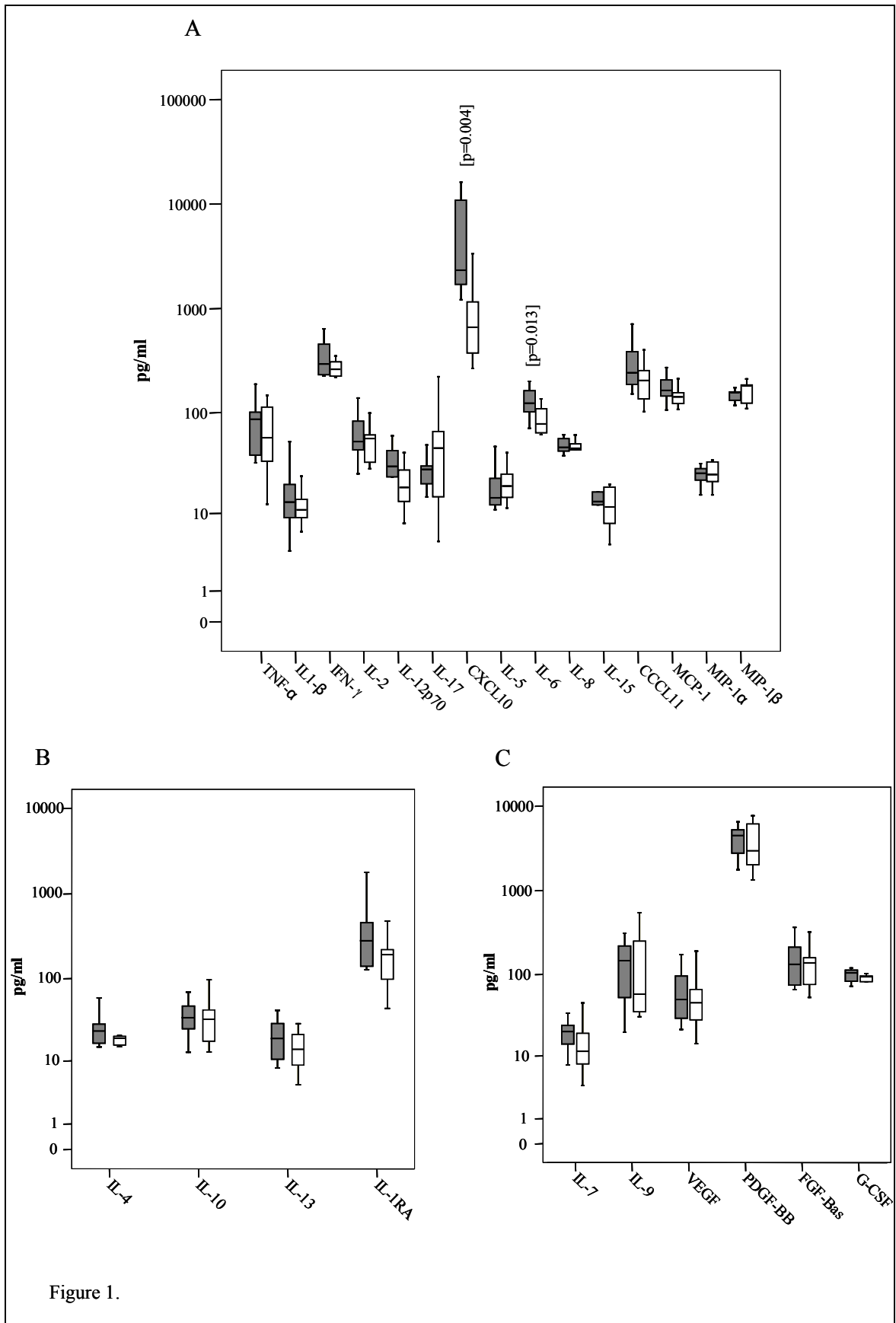
<sup>4</sup> Multibacillary leprosy patients without reaction



## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Distribution of cytokines among Type 1 reaction leprosy patients (traced boxes) and controls without reaction (white boxes). (A) Pro inflammatory Cytokines, CXCL10 and IL-6 median values were statistically higher for TR1 than controls (B) Anti Inflammatory cytokines (C) Growth Factors. Boxes encompass 25th and 75th percentiles of each cytokine distribution. Black lines within boxes refer to the median values.

Figure 2. Distribution of cytokines among Type 2 reaction leprosy patients (traced boxes) and controls without reaction (white boxes). (A) Pro inflammatory Cytokines (B) Anti Inflammatory cytokines (C) Growth Factors, IL-7 and PDGF-BB median values were statistically higher among cases than in the control group. Boxes encompass 25th and 75th percentiles of each cytokine distribution. Black lines within boxes refer to the median values.



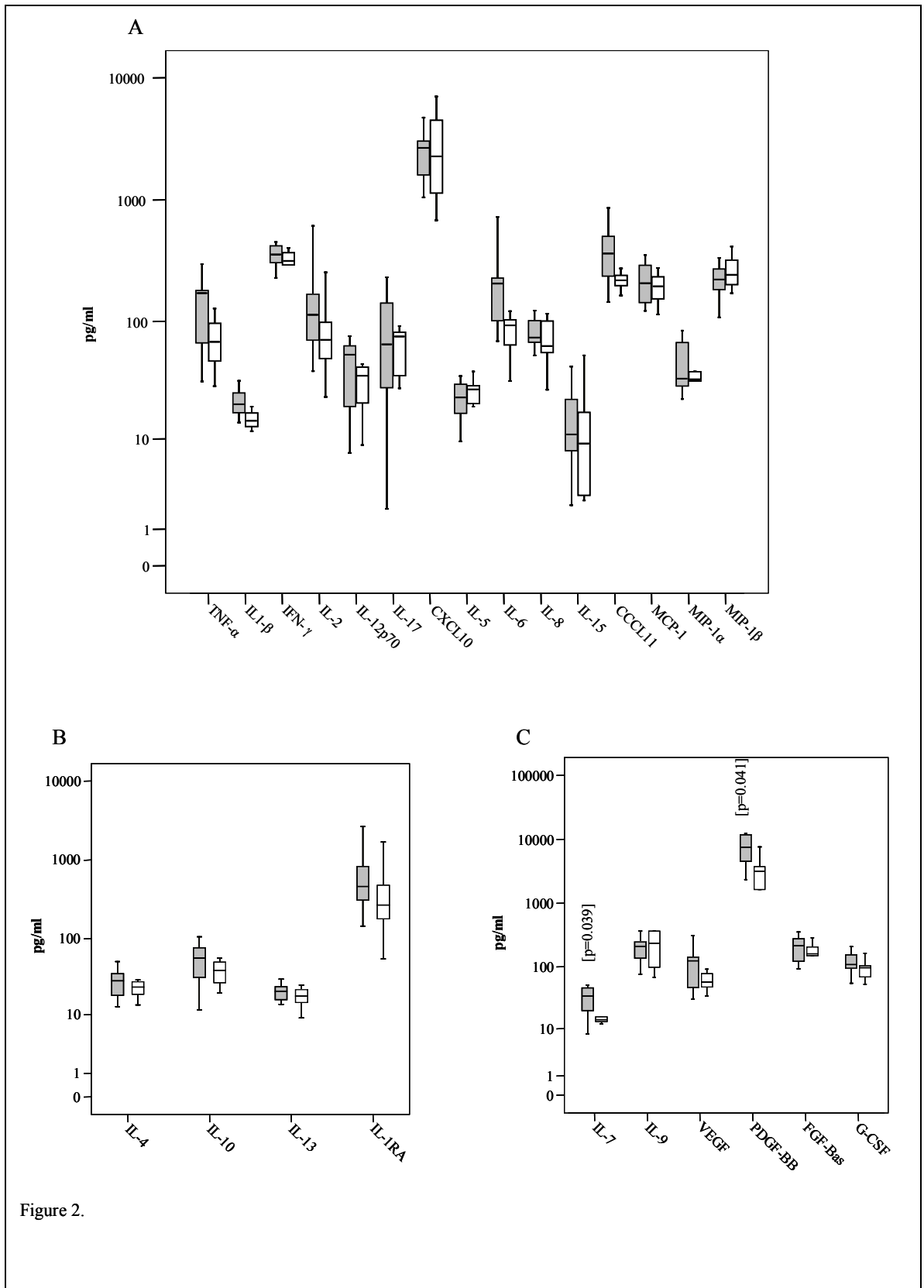


Figure 2.

**Artigo 3: GENETIC AND SEROLOGIC EVIDENCES IMPLICATE  
IL6 AS A SUSCEPTIBILITY GENE FOR LEPROSY TYPE 2  
REACTION**



# GENETIC AND SEROLOGIC EVIDENCES IMPLICATE IL6 AS A SUSCEPTIBILITY GENE FOR LEPROSY TYPE 2 REACTION

Sousa ALM<sup>1\*</sup>, Fava VM<sup>2\*</sup>, Sampaio LH<sup>1</sup>, Martelli CMT<sup>1</sup>, Costa MB<sup>1</sup>, Mira MT<sup>2#</sup>, Stefani MMA<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>*Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiania, Goiás, Brazil;* <sup>2</sup>*Core for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Parana, Brazil.*

\*These authors contributed equally to the work; #These authors share senior authorship

## **Corresponding Author:**

Mariane Stefani

Rua 235, sala 335, IPTSP, Universidade Federal de Goiás, Setor Universitário, Goiânia, GO, 74605050, Brasil. Phone: (62) 3209 6111. Email: [mariane.stefani@pq.cnpq.br](mailto:mariane.stefani@pq.cnpq.br)

## Names of all the authors, highest academic degree obtained and their affiliations

Ana Lúcia Maroclo Sousa, PhD.

Affiliation: Immunology Department, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Vinicius Medeiros Fava, PhD candidate.

Affiliation: Core for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Lucas Henrique Sampaio, MSc.

Affiliation: Immunology Department, Tropical Pathology and Public Health Institute, Goiânia, Goiás, Brazil.

Celina Maria Turchi Martelli, PhD.

Affiliation: Epidemiology Department, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Mauricio Barcelos Costa, MSc.

Affiliation: Immunology Department, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Marcelo Távora Mira, PhD.

Affiliation: Core for Advanced Molecular Investigation, Graduate Program in Health Sciences, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil.

Mariane Martins de Araújo Stefani, PhD.

Affiliation: Immunology Department, Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

## Abstract

Type 1 (T1R) and Type 2 (T2R) leprosy reactions are a major cause of permanent disabilities associated with leprosy. A previous study of plasma concentrations of 27 cytokines in T1R and T2R patients pointed *IL6* as a candidate for genetic analysis. This nested case control study was built from a cohort of 409 leprosy patients recruited in central Brazil and monitored for T1R/T2R during multidrug therapy. Positive evidences for association between T2R and *IL6* tag SNPs rs2069832 ( $p=0.002$ ), rs2069840 ( $p=0.027$ ) and rs2069845 ( $p=0.044$ ) were observed, capturing the entire information of the *IL6* locus, as well as with a functional *IL6* variant rs1800795 ( $p=0.005$ ). Moreover *IL6* plasma levels of leprosy patients with T2R and controls without reaction correlated with *IL6* genotypes. No association was observed between *IL6* variants and T1R. The description of genetic predictive factors for leprosy reactions may have a major impact on preventive strategies against these incapacitating events.

**Keywords:** leprosy; type 2 reaction, *IL6*, association, tag SNP

## Introduction

Leprosy is a chronic dermato-neurological, debilitating disease caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) that affects approximately 245.000 new individuals worldwide. Prevalence of the disease remains stable since the mid 1990's, despite global implementation of efficient multidrug therapy (MDT). Leprosy presents as a broad clinical, bacilloscopic, histopathological and immunological spectrum, ranging from the localized tuberculoid (TT) form, associated with a Th1-type immune response, to systemic, Th2-type, lepromatous (LL) disease. Immunologically unstable, borderline forms (borderline tuberculoid, borderline borderline and borderline lepromatous (BT, BB and BL) lie between the poles.

Leprosy reactions are immuno-inflammatory related phenotypes that may occur before diagnosis, during treatment or after MDT. Leprosy reactions require immediate treatment to prevent permanent nerve impairment, motor disability and deformities. Field cohort studies estimate that the disability ratio in leprosy ranges from 16-56%, mainly due to the occurrence of reactional episodes. Since leprosy reactions may occur months



or even years after MDT completion, related disabilities may still occur even under the scenario of leprosy elimination.

There are two major types of leprosy reaction. Type 1 reaction (T1R) affects 20-30% of leprosy cases and is characterized by acute inflammation of pre-existing skin lesions or by the appearance of new ones and/or neuritis. Systemic symptoms are rare. T1R occurs predominantly among leprosy patients presenting unstable immune response against the bacilli (BT, BB, BL forms) – however, T1R may also occur in TT patients. Approximately 95% of T1R cases are diagnosed simultaneously with leprosy or during the first 2 months of MDT. Even with adequate treatment, 40% of the T1R patients may present permanent nerve damage. *Erythema Nodosum Leprosum* (ENL) is the main presentation of type 2 reaction (T2R) which affects predominantly leprosy patients showing Th2-type immune response and high bacterial load, therefore classified towards the lepromatous pole (BB, BL and LL forms) of the disease. The onset of T2R is generally during MDT treatment, and the majority of patients usually develop several acute and chronic episodes over the years. T2R presents as painful erythematous tender nodules on various parts of the body with or without neuritis, usually followed by systemic signs such as fever and malaise. T1R treatment is based on corticosteroids and T2R therapy includes corticosteroids and/or thalidomide.

Only recently genetic epidemiology studies have been developed, aiming to identify innate, predictive susceptibility factors for leprosy reactions. Most of these studies focused on variants on *TLR1* and *TLR2* genes, important mediators of mycobacterium recognition during innate immune response. Alleles of both single nucleotide polymorphism (SNP) rs3804099 and a microsatellite intragenic to *TLR2* were associated with T1R in an Ethiopian population. Non-synonymous SNP rs5743618 (I602S) of *TLR1* was found associated with protection against T1R in a Nepalese population, whereas another non-synonymous polymorphism of *TLR1* (N248S) was associated with both leprosy *per se* and T2R, with the *S* and the *N* allele being more frequent among leprosy and T2R patients, respectively. Finally, the first genome-wide association study (GWA) in leprosy revealed four SNPs intragenic to *NOD2* gene associated with leprosy; a subsequent study showed variants of the same gene associated with leprosy *per se*, T1R and T2R. However, associated variants were not the same across the two studies.

A recent analysis of plasma levels of 27 plasma factors including cytokines, chemokines and growth factors revealed IL-6 as the only marker significantly elevated in both T1R and T2R sub-groups when compared to leprosy patients without reaction . In the present nested case-control study, we investigated polymorphisms of the *IL6* gene for association with T1R and T2R in an expanded population of leprosy patients recruited at the same Brazilian reference center for leprosy diagnosis and treatment.

## Results and Discussion

A total of 429 leprosy patients were recruited for the study. Following exclusion criteria, 20 individuals were removed from the analysis, 10 due to pure neuritis and 10 due to inconsistencies or uncertain diagnosis of either leprosy and/or type of reaction. For the remaining 409 leprosy patients, 154 (37.7%) developed T1R, 39 (9.5%) developed T2R and 216 patients (52.8%) did not present any sign of leprosy reaction upon follow-up. Since the risk of developing T1R or T2R is not homogenous across leprosy clinical spectrum, the control group was stratified according to leprosy classification prior to any comparison. Thus, the T1R sub-group was compared with 188 non-reactional controls presenting TT, BT, BB or BL leprosy; the T2R sub-group was compared with 70 non-reactional leprosy controls from the BB, BL or LL forms of the disease.

Comparison between T1R cases and controls revealed statistically significant differences for the distribution of leprosy form, gender and age. T1R was more frequent among BT individuals (51.3% of the cases) and males (61.7%); mean age for T1R cases was higher ( $51.0 \pm 15.2$ ) when compared to controls ( $41.7 \pm 16.6$ ). For the T2R sub-group, the only difference observed between cases and controls was regarding leprosy form: LL patients were more frequent among T2R cases (71.8%) than among controls (40%). Description and analysis of the epidemiological data from both sub-populations are summarized in Table 1.

Genetic analysis failed to detect association between *IL6* variants and occurrence of T1R. Of note, no association was observed even after removal of the 22 TT controls from this sub-population (data not shown). However, positive evidence for association between all three tag SNPs and occurrence of T2R (Table 2) was observed for both dominant and additive models after correction for leprosy form. Linkage disequilibrium

analysis confirmed independence of all three SNPs (Figure 1). A comprehensive search on the HapMap database (build 24/phase 2\_Nov08) revealed that SNP rs2069832 was tagging a bin that contained variant rs1800795, a known, functional polymorphism initially localized at a negative regulatory domain of the promoter region of *IL6*. Subsequent genotyping of rs1800795 in the T2R sub-population confirmed strong LD with rs2069832 ( $r^2 = 0.69$ , Figure 1) and association between this functional variant of *IL6* and occurrence of T2R. Odds ratio were estimated at 4.0 (95% CI = 1.64 – 9.76) and 3.7 (95% CI = 1.47 – 9.34) for risk alleles “A” and “C” of markers rs2069832 and rs1800795, respectively. Interestingly, allele “G” of marker rs2069840 that showed very weak LD with both rs2069832 and rs1800795 was associated with protection against T2R (OR = 0.27, 95% CI = 0.22 – 0.91), reinforcing independence of the association signal observed. All markers were in Hardy-Weinberg equilibrium.

To further advance on the understanding of the impact of *IL6* genetic variants over occurrence of leprosy reaction, we tested if there was correlation between *IL6* genotypes and plasma levels of this cytokine. Plasma levels of IL-6 were measured for all 39 T2R leprosy patients cases and 16 controls (Figure 2). Susceptibility alleles “A” and “C” of markers rs2069832 ( $p = 0.04$ ) and rs1800795 ( $p = 0.04$ ) were associated with higher plasma levels of IL-6, whereas independent, protective allele “G” of marker rs2069840 ( $p = 0.02$ ) was associated with lower plasma IL-6 levels, all under a dominant model. Our results for rs1800795 genotypes contrast with previous findings of association between allele “C” and reduced IL-6 levels in *in vitro* cultures of monocyte-derived macrophages (MDM). However, differences in the design of the two experiments limit comparison of the results. Although we have not investigated mechanisms, IL-6 could contribute to TR2 due to its inflammatory role and capacity to stimulate antibody production. Recent data indicate that IL-6 together with TGF beta inhibits T regulatory cells and induces Th17 cells. Higher levels of IL-6 (mRNA and protein) have been observed in LL patients compared with TT ones.

Here we present strong evidences implicating genetic variants of the *IL6* gene in the pathogenesis of leprosy T2R. Different strategies of analysis have resulted in association between *IL6* variants and several diseases such as type 1 and 2 diabetes, systemic-onset juvenile chronic arthritis, chronic periodontitis immunoglobulin-A deficiency “C” reactive protein serum levels in children with active Crohn’s disease. Allele “C” of rs1800795 has been associated with increased risk of development of

mucosal leishmaniasis. In leprosy, a gene expression analysis using unstimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) revealed that *IL6* was expressed in most of the T1R and T2R affected patients, whereas only TT/BT non-reactional patients presented *IL6* RNA levels. When skin biopsies were analyzed, expression of IL-6 was detected in 11/12 T2R patients, as compared to 3/17 individuals affected by T1R. The results presented here add up to a solid body of evidence implicating IL-6 in the pathogenesis of leprosy T2R, and point this cytokine as a possible valuable predictive marker for this aggressive leprosy phenotype.

## **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development/CNPq (grant # 401276/2005-8). Stefani, MMA is a recipient of fellowship from CNPq (grant#304869/2008-2). Sampaio LHF was supported by a scholarship from the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel/CAPES. We are grateful to the patients and staff of the Reference Center for Diagnosis and Treatment, Goiania city for their cooperation and assistance during this study.

## **Conflict of interest**

All authors declare that there is no competing financial interests in relation to the work described.

## **References**

## Tables and figures

**Table 1. Population epidemiological data**

	T1R (%)	Controls (%)	<i>p</i>	T2R (%)	Controls (%)	<i>p</i>
N	154	188		39	70	
<b>Ridley Jopling Classification</b>						
TT	—	22 (11.7)	2.46 E-08	—	—	0.005
BT	79 (51.3)	124 (66.0)		—	—	
BB	29 (18.8)	16 (8.5)		3 (7.7)	16 (22.8)	
BL	46 (29.9)	26 (13.8)		8 (20.5)	26 (37.2)	
LL	—	—		28 (71.8)	28 (40.0)	
<b>Gender</b>						

M	95 (61.7)	91 (48.4)	0.014	27 (69.2)	45 (64.3)	0.60
F	59 (38.3)	97 (51.6)		12 (30.8)	25 (35.7)	

#### Age

Mean [SD]	51.0 [15.2]	41.7 [16.6]	3.8 E-07	40.0 [16.6]	45.9 (16.9)	0.073
Min - Max	10 - 88	7 - 87		11 - 78	9 - 79	

Abbreviations: T1R, Type 1 Reaction; T2R, Type 2 Reaction; SD, Standard Deviation. TT tuberculoid leprosy, BT borderline tuberculoid, BB borderline borderline, BL borderline leprosy, LL lepromatous leprosy; M-male, F –female.

A cohort of leprosy patients was recruited at the time of leprosy diagnosis (newly detected cases) at a reference center from the city of Goiânia, Central Brazil, between February 2006 and March 2008. Patients were followed-up until the end of MDT. Leprosy classification was based on clinical, bacilloscopic and histopathologic criteria. Case definitions of leprosy, T1R and T2R have been described elsewhere. Inclusion criteria were newly detected patients, without history of previous leprosy treatment, with or without leprosy reactions (T1R or T2R). Patients were excluded from the genetic analysis if they had uncertain classification of leprosy or of type of reaction, if the clinical classification was inconsistent with the type of reaction and if the clinical signs and symptoms were compatible with pure neuritis. Two nested case-control studies were build-up from this cohort: the first was composed by leprosy patients at the first episode of T1R and the second included leprosy patients at their first episode of T2R. Controls were newly detected leprosy patients who did not have reaction at the time of initial diagnosis nor during follow-up. Cases of T1R were compared with controls presenting polar TT or BT, BB and BL leprosy; cases of T2R were compared with controls with polar LL or BL and BB disease. All patients were treated for leprosy following WHO MDT therapy guidelines and for leprosy reaction following the appropriate therapy, when needed. Demographic and clinical variables were measured and compared using chi-square and the t-test, when appropriate and an alpha error under 0.05 (p value) was considered significant. The study was approved by the Brazilian National Committee for Ethics in Research (CONEP), process number/registration 650/2006/12638. Patients signed informed consent as required by ethical regulation.

**Table 2. Association between *IL6* genetic variants and occurrence of type 1 and type 2 leprosy reaction**

	T1R	Controls	pU	pM	T2R	Controls	pU	pM	Odds Ratio (CI)
<i>IL6</i>									
rs180079									
5									
CC	—	—	—	—	1 (2,6)	3 (4,5)			
CG	—	—	—	—	22 (57,9)	20 (29,8)	0.019	0.030	2.41 (1.09 - 5.33)
GG	—	—	—	—	15 (39,5)	44 (65,7)			
CC + CG	—	—	—	—	23 (60,5)	23 (34,3)	0.009	0.005	3.71 (1.47 - 9.34)
GG	—	—	—	—	15 (39,5)	44 (65,7)			
<i>IL6</i>									
rs206983									
2									
AA	7 (4.7)	5 (2.7)			4 (10.5)	3 (4.4)			
AG	39 (26.2)	66 (36.1)	0.12	0.23	20 (52.6)	19 (27.9)	0.061	0.007	2.71 (1.32 - 5.57)
GG	103 (69.1)	112 (61.2)			14 (36.9)	46 (67.7)			
AA + AG	46 (30.9)	71 (38.8)	0.13	0.11	24 (63.1)	22 (32.3)	0.002	0.002	4.00 (1.64 - 9.76)
GG	103 (69.1)	112 (61.2)			14 (36.9)	46 (67.7)			
<i>IL6</i>									
rs206984									
0									

GG	16 (10.7)	17 (9.2)			1 (2.6)	8 (12.1)			
CG	73 (48.7)	86 (46.7)	0.80	0.50	13 (33.3)	28 (42.4)	0.096	0.027	0.44 (0.22 - 0.91)
CC	61 (40.6)	81 (44.1)			25 (64.1)	30 (45.5)			
GG + CG	89 (59.4)	103 (55.9)	0.54	0.51	14 (35.9)	36 (54.5)	0.06	0.040	0.39 (0.16 - 0.96)
CC	61 (40.6)	81 (44.1)			25 (64.1)	30 (45.5)			
<i>IL6</i>									
rs206984									
5									
GG	13 (8.6)	17 (9.3)			8 (20.5)	7 (10.4)			
AG	63 (41.7)	83 (45.6)	0.70	0.29	22 (56.4)	30 (44.8)	0.061	0.044	1.92 (1.02 - 3.63)
AA	75 (49.7)	82 (45.1)			9 (20.1)	30 (44.8)			
GG + AG	76 (50.3)	100 (54.9)	0.40	0.30	30 (79.9)	37 (55.2)	0.025	0.045	2.59 (1.02 - 6.56)
AA	75 (49.7)	82 (45.1)			9 (20.1)	30 (44.8)			

Abbreviations: T1R, Type 1 Reaction; T2R Type 2 Reaction;  $pU$ ,  $p$  value for the univariate analysis;  $pM$ ,  $p$  value for the multivariate logistic regression analysis; CI, Confidence interval.

*Marker selection:* Tag SNP markers capturing the entire information of the *IL6* locus were selected according to the information available at the International HapMap Project website, release 24/phase 2\_Nov08. All selected markers presented a minor allele frequency of 0.2 or higher in the CEU (Caucasian) HapMap population. Two markers were considered in Linkage Disequilibrium (LD) when presenting a pairwise  $r^2 > 0.8$ . Following these criteria, tag SNPs rs2069832, rs2069840 and rs2069845 were selected for genotyping.

*DNA extraction and genotyping:* Genomic DNA was obtained from peripheral blood by classic salting-out protocol, purified and quantified. Tag SNPs rs2069832, rs2069840 and rs2069845 were genotyped by polarized fluorescence, Taqman probe-based methodology using the ABI 7500 platform. Genotypes were automatically called using the appropriate software with subsequent manual checking of accuracy. Functional SNP rs1800795 was genotyped by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis as described elsewhere.

*Statistical analysis:* Hardy-Weinberg equilibrium estimates were carried out using Haploview 4.2. Genotyping frequencies of cases and controls were compared by univariate analysis under both dominant and additive model. Adjustment for gender, clinical form and age was performed using stepwise multivariate logistic regression analysis. Results with a type I error (alpha) under 0.05 ( $p$  value) were considered significant; for these, Odds Ratio (OR) was estimated with the appropriated test. Analysis was performed with the statistical software SPSS 13.0.

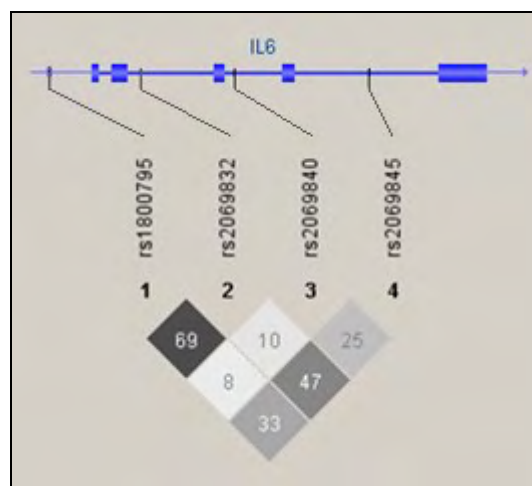


Figure 1. Relative position and linkage disequilibrium (LD) pattern of *IL6* markers. Genomic structure of the *IL6* gene is represented in blue. Values inside the boxes represent LD measured using the  $r^2$  parameter, as implemented in Haploview 4.2 (20).

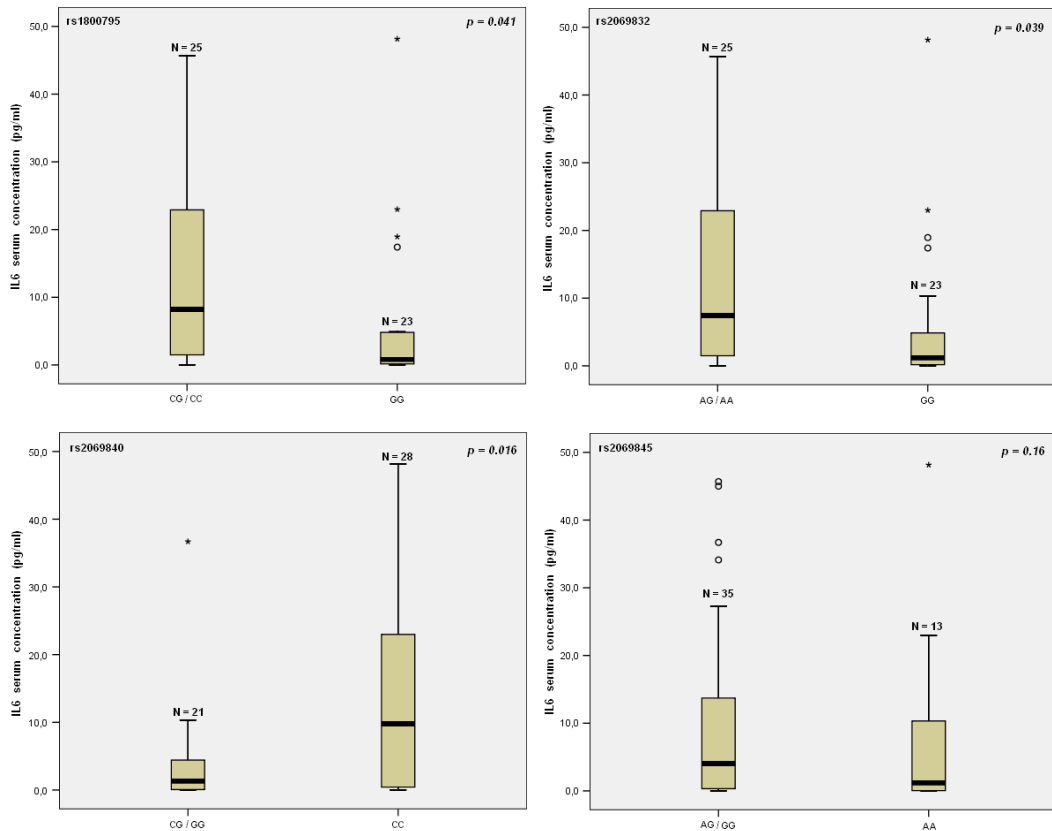


Figure 2. Plasma levels of IL-6 according to *IL6* genotypes. Plasma IL-6 levels were determined by ELISA (eBioscience Human IL-6 kit, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions using undiluted samples. N, number of individuals in each genotype class. An exploratory stem-and-leaf test was carried out to identify outliers – as a result, five outliers (plasma IL-6 concentration  $\geq 56$  pg/mL) were removed from the analysis. Mann-Whitney test was used to compare the IL-6 plasma levels across genotypes under a dominant model. Results with a type 1 error (alpha) under 0.05 (p value) were considered significant.



## 5. RESUMO DOS ARTIGOS/CONCLUSÕES

1. O primeiro artigo avaliou detecção de DNA de *M. leprae* por PCR, sorologia IgM anti-PGL I, histopatológico e teste de Mitsuda em pacientes com lesão única paucibacilar ao diagnóstico. Estes pacientes foram monitorados clinicamente por três anos após o tratamento com dose única com rifampicina, ofloxacina, minociclina (ROM) quanto ao surgimento de reações hansênicas. Nestes pacientes identificamos 44.4% de positividade ao DNA de *M leprae* (60/135; 95% CI, 35.9-53.2) e 14.8% dos pacientes apresentou reação tipo 1. Idade ( $\geq 40$  anos), positividade a ML- PCR e lesão  $> 5\text{cm}$  tiveram associação com risco aumentado de reação tipo 1. Na análise multivariada idade  $\geq 40$  anos e ML-PCR positivo apresentaram associação com a ocorrência de eventos de reação tipo 1 em pacientes com lesão única tratados com ROM. Estes resultados sugerem que a presença do DNA de *M. leprae* em lesões de pele de pacientes com lesão única PB represente um preditor molecular de risco para RT1.
2. Em um estudo de caso controle avaliando pacientes com e sem reação hansênica tipo 1 e tipo 2, foram dosadas 27 citocinas plasmáticas e fatores de crescimento por ensaio multiplex. Um perfil misto de resposta imune do tipo Th1 e Th2 foi

observado em pacientes em estado reacional tipo 1 e tipo 2. Este estudo identificou como potenciais marcadores plasmáticos de reações hansênicas a CXCL10 e a IL6. Estudos adicionais são necessários para se definir a aplicabilidade destes fatores como potenciais biomarcadores plasmáticos de reações hansênicas e sobre a utilidade destes para o diagnóstico e prognóstico das reações hansênicas.

3. O artigo 2 desta tese indicou que entre as 27 citocinas avaliadas somente a IL6 estava aumentada tanto nos pacientes com reação tipo 1 e tipo 2 indicando ser a IL6 um bom candidato para estudo genético. Este estudo caso-controle de base genética e imunológica avaliou possível associação entre o polimorfismo do tipo SNP no gene da IL6 e predisposição/proteção a reações hansênicas tipo 1 e tipo 2. As análises mostraram evidências de associação entre reação tipo 2 e os marcadores tag SNPs rs2069832 ( $p=0.002$ ), rs2069840 ( $p=0.027$ ) e rs2069845 ( $p=0.044$ ) que capturam informação completa sobre o locus *IL6*. Além disso o marcador da variante funcional rs1800795 ( $p=0.005$ ) mostrou associação com reação tipo 2 e foi observada também associação entre genótipos e os níveis plasmáticos de IL6 em pacientes com reação tipo 2 e controles sem reação. A identificação de fatores preditivos de reações hansênicas é importante para se definir estratégias preventivas destes eventos incapacitantes.
4. Foram observadas evidências positivas de associação entre RT2 e tag SNPs do gene de IL6. A descrição de fatores genéticos preditivos de reações hansênicas pode ter um maior impacto em estratégias preventivas contra estes eventos incapacitantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel L and Demenais F 1988. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade Island. *Am J Hum Genet* 42:256-266.
- Abel L, Sanchez FO, Oberti J et al 1998. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis* 177:133-145.
- Agrewala JN, Ghei SK, Sudhakar KS, Girdhar BK, Sengupta U 1988. HLA antigens and erythema nodosum leprosum. *Tissue Antigens* 33:486-7.
- Alcáis A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al 2007. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* 39:517-22.
- Azulay RD & Azulay DR 1997. Micobacterioses. In: *Dermatologia*. Guanabara Koogan Rio de Janeiro – RJ, 2ª. ed., cap 19: 174 – 189.
- Banait PP, Junnarkar RV 1971. Study of erythrocyte G-6PD deficiency in leprosy. *Int J Lepr* 39:168-71.
- Barnetson RS, Bjune G, Pearson JM, Kronvall G 1976. Cell mediated and humoral immunity in “reversal reactions”. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 44:267-274.
- Becx-Bleumink M, Berhe E 1992. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy; experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center (ALERT) in Ethiopia. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 60:173-184.
- Beiguelman B 1968. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet Med Gemello* 17:584-594.
- Belgaumkar VA, Gokhale NR, Mahajan PM, Bharadwaj R, Pandit DP, Deshpande S 2007. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. *Lepr Rev* 78:223-230.
- Bhargava P, Kuldeep CM, Mathur NK 1996. Recurrent erythema nodosum leprosum precipitated by antileprosy drugs. *Int J Lepr* 64(4):458-9.

- Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, Argaw AT, Janer M, Zhao LP, Kaplan G, Aderem A 2008. Toll-like receptor 2 (*TLR2*) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *JID* 197:253-261.
- Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* 2004; 363:1209-19
- Bührer-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MAF, Dahakal K, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L 2007. The ML Flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Lepr Rev* 78:70-79.
- Canizares O, Costello M, Gigli I 1962. Erythema nodosum type of lepra reaction. *Arch Dermatol* 85:69-80.
- Carter SL, Muller M, Manders PM, Campbell IL 2007. Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN-gamma but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia in vitro. *Glia* 55:1728-1739.
- Cellona RV, Fajardo TT, Kim Jr DI et al 1986. Joint chemotherapy trials in lepromatous leprosy conducted in Thailand, The Philippines and Korea. *Int J Lepr* 54: 236-44.
- Cem Mat M, Yazici H, Ozbakir F, Tuzun Y 1988. The HLA association of lepromatous leprosy and borderline lepromatous leprosy in Turkey. A preliminary study. *Int J Dermatol* 27(4):246-247.
- Chakravartii MR 1973. A twin study on leprosy. Stuttgart: George Thieme.
- Cho SN, Kim SH, Cellona RV, Chan GP, Farjado TT, Walsh GP, Kim JD 1992. Prevalence of IgM antibodies to phenolic glycolipid I among household contacts and controls in Korea and the Philippines. *Lepr Rev* 63:12-20.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409:1007-11.
- Costa MB, Cavalcanti Neto FF, Martelli CMT, Stefani MMA, Maceira JP, Gomes MK, Schettini AP, Rebello PFB, Pignataro PE, Ueda ES, Narahashi K, Scollard DM 2001. Distinct histopathological patterns in single lesion leprosy patients treated with single dose therapy (ROM) in the Brazilian Multicentric Study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 69:177-186.

- Croft RP, Nicholls PG, Steyerberg EW, Richardus JH, Cairns W, Smith S 2000. A clinical prediction rule for nerve-function impairment in leprosy patients. *Lancet* 355:1603-1606.
- De Rijk, AJ, Gabre S, Byass P, Berhanu T 1994. Field evaluation of WHO-MDT of fixed duration, at ALERT, Ethiopia. The AMFES project. II. Reaction and neuritis during and after MDT in PB and MB leprosy patients. *Lepr Rev* 65:320-32.
- De Vries RR, Fat RF, Nijenhuis LE, and van Rood JJ 1976. HLA-linked genetic control of host response to *Mycobacterium leprae*. *Lancet* 11:1328-1330.
- Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Sampaio LH, Grassi AB, Sousa ALM, Martelli CMT, Stefani MMA, Reed SG 2008. Antigen-Specific T-Cell Responses of Leprosy Patients. *Clinical and Vaccine Immunology* 15(11):1659-1665.
- Drutz DJ, Gutman RA 1963. Renal manifestation of leprosy: glomeronephritis, a complication of erythema nodosum leprosum. *Am J Trop Med Hyg* 22:496-502.
- Faber WR, Jensema AJ, Goldschmidt WF 2006. Treatment of recurrent erythema nodosum leprosum with infliximab. *N Engl J Med* 355:739.
- Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, Sichali L, Mwaungulu L, Crampin AC et al 2004. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 71: 330-40.
- Foss NT 1999. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *An Bras Dermatol* 74: 113-119.
- Gomes MK, Stefani M, Sousa ALOM, Rabello PFB, Pennini S, Narahashi K, Ueada E, Daxbacher ER, Aslanian FMNP, Nery JAC, Sales AM, Oliveira MLW, Martelli CMT 2008. Single lesion leprosy patients multicentric cohort treated with single dose drug therapy: findings on three-year follow-up and public health perspective in Brazil. *Cad Saúde Colet*, Rio de Janeiro 16(2):363-376.
- Groenen G, Janssens L, Kayembe T, Nollet E, Coussens L, Pattyn SR 1986. Prospective study on the relationship between intensive bactericidal therapy and leprosy reactions. *Int J Lepr* 54(2):236-44.
- Grugni A, Nadkarni NJ, Kini MS, Mehta VR 1990. Relapses in paucibacillary leprosy after MDT – A clinical study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 58:19-24.

- Guerra JG 2007. Reações Hansênicas Aspectos Clínicos, Epidemiológicos e Imunológicos. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Tese de Doutorado. Rio de Janeiro-RJ.
- Guerra JG, Castro LCM, Stefani MMA, Penna GO, Martelli CMT 2002. Eritema nodoso hansênico: atualização clínica e terapêutica. *An Bras Dermatol* 77:389-405.
- Helmy HS, Pearson JM, Waters MF 1971. Treatment of moderately severe erythema nodosum leprosum with clofazimine-a controlled trial. *Lepr Rev* 42:167-77.
- Iyer CG, Ramu G 1976. An open trial with clofazimine in the management of recurrent lepra reaction using thalidomide as a control drug. *Lepr India* 48:690-4.
- Jacob JT, Kozarsky P, Dismukes R, Bynoe V, Margoles, L, Leonard M, Tellez I, Franco-Paredes C 2008. Five-year experience with type 1 and type 2 reactions in Hansen disease at a US travel clinic. *Am J Trop Med Hyg* 79(3):452-454.
- Jacobson RR & Krahenbuhl JL 1999. Leprosy. *Lancet* 353:655-660.
- Jacobson RR, Trautman JR 1971. The treatment of leprosy with the sulfones: I. Fagest's original 22 patients. A thirty-year follow-up on sulfone therapy for leprosy. *Int J Leprosy* 39:726-37.
- Jamieson SE, Miller EN, Black GF et al 2004. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazillians. *Genes Immun* 5:46-57.
- Ji B, Perani EG, Petinom C, Grosset JH 1996. Bactericidal activities of combinations of new drugs against Mycobacterium leprae in nude mice. *Antimicrob Agents Chemother* 40:393-399.
- Job CK 1994. Pathology of leprosy. In: Hastings RC, editor. Leprosy. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; p. 193-234.
- Job CK 1998. Histopathologic diagnosis of early leprosy. Short course. *XVth International Leprosy Congress, Beijing, PR China*.
- Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ 2008. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol* 83(1):75-82.
- Kang TJ, Lee SB, Chae GT 2002. A polymorphism in the Toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine* 20:55-62.

- Kar BR, Babu R 2004. Methotrexate in resistant ENL. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 72:480-2.
- Keane J 2004. Tumor Necrosis Factor Blockers and Reactivation of Latent Tuberculosis. *CID* 39:300-2.
- Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P 1989. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56:731-740.
- Klatser, PR 2000. Use of a *Mycobacterium leprae* dipstick to classify patients with leprosy. *Lepr. Rev.* 71:S67-s72.
- Kumar B, Dogra S, Kaur I 2004. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from North India. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 72:125-33.
- Krutzik SR, Tan B, Li H et al 2005. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* 11:653-660.
- Lechat MF 2001. Acceptance of WHO/MDT over the last 20 years. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 69(3):241-6.
- Lever W F & Lever G S 1991. Histopatologia da Pele. Editora Manole Ltda, 7ª edição, vol. 1, São Paulo.
- Levy L, Fasal P, Levan NE, Freedman RI 1973. Treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide. *Lancet* 2324-325.
- Lienhardt C & Fine PE 1994. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? *Lepr Rev* 65:9-33.
- Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD et al 2000. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol* 51:419-428.
- Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN 2001. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect Immun* 69:3413-7.
- Lockwood DN 2002. Leprosy elimination – a virtual phenomenon or a reality? *BMJ* 324:1516-1518.

- Lockwood DN, Colston MJ, Khanolkar-Young SR 2002. The detection of Mycobacterium leprae protein and carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. *Am J Trop Med Hyg* 66:409-15.
- Lockwood DN, Sinha HH 1999. Pregnancy and leprosy: a comprehensive literature review. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 67:6-12.
- Lockwood DNJ, Vinayakumar S, Stanley JNA et al, 1993. The clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad, India. *Int J Lepr* 61:8-15.
- Mahad DJ, Howell SJ, Woodroffe MN 2002. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72:498-502.
- Mahajan PM, Jadhav VH, Patki AH, Jogaikar DG, Mehta JM 1994. Oral zinc therapy in recurrent erythema nodosum leprosum: a clinical study. *Indian J Lepr* 66:51-7.
- Majumdar S, Mockenhaupt M, Roujeau J, Townshend A 2002. Interventions for toxic epidermal necrolysis (Cochrane Review). *Cochrane Database Syst Rev* CD001435.
- Malabay MC, Helwig EB, Tolentino JG, Binford CH 1965. The histopathology and histochemistry of erythema nodosum leprosum. *Ind J Lepr jan-mar; 33:28-49.*
- Malhotra DJ, Darvish K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, Reddy BSN, Bamezai RNK 2005. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet* 118:295-300.
- Manandhar R, LeMaster JW, Roche P 1999. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr* 67(3):270-8.
- [Martelli CM](#), [Stefani MM](#), [Gomes MK](#), [Rebello PF](#), [Peninni S](#), [Narahashi K](#), [Maroclo AL](#), [Costa MB](#), [Silva SA](#), [Sacchetim SC](#), [Nery JA](#), [Salles AM](#), [Gillis TP](#), [Krahenbuhl JL](#), [Andrade AL](#) 2000. Single lesion paucibacillary leprosy: baseline profile of the Brazilian Multicenter Cohort Study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 68(3):247-57.
- McDougall AC, Ponnighaus JM, Fine PE 1987. Histopathological examination of skin biopsies from an epidemiological study of leprosy in northern Malawi. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 55:88-98.



- Mehra NK, Rajalingam R, Mitra DK, Taneja V, Giphart MJ 1995. Variants of HLA-DR2/DR51 group haplotypes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis in Asian Indians. *Int J Leprosy* 63(2):241-248.
- Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AVS 2001. Association of *NRAMP1* polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy *per se* in west Africans. *Am J Trop Med Hyg* 65(6):733-735.
- Milne CD, Paige CJ 2006. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol*, 18:20-30.
- Mira MT 2006. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect* 8:1124-31.
- Mira MT Alcais A, di Pietrantonio T, Thuc NV, Phuong MC, Abel L, et al 2003. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun* 4:67-73.
- Mira MT, Alcais A, Van Thuc N Thai VH, Huong NT, Ba NN et al. 2003. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet* 33:412-5.
- Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT et al 2004. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427:636-40.
- Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, Kaplan G, Hawn TR 2008. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *Plos Negl Trop Dis* 2(5):e231.1-9.
- Modlin RL 1994. Th1 – Th2 paradigm: Insights from leprosy. *J Invest Dermatol* 102:828-832.
- Modlin RL, Bakke AC, Vaccaro SA, Horwitz DA, Taylor CR, Rea TH 1985. Tissue and blood T-Lymphocyte subpopulations in erythema nodosum leprosum. *Arch Dermatol* 121:216-9.
- Modlin RL, Mehra V, Jordan R, Bloom BR, Rea TH 1986. *In situ* and *in vitro* characterization of the cellular immune response in erythema nodosum leprosum. *J Immunol* 136:883-6.

- Modlin RL, Rea TH 1994. Immunopathology of leprosy. In: Hastings RC, editor. *Leprosy*. New York: Churchill Livingstone; p. 225-34.
- Moet FJ, Pahan D, Schuring RP et al 2006. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis* 193:346-353.
- Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppee JY, Lacroix C, et al 2005. On the origin of leprosy. *Science* 308:1040-2.
- Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG 2006. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 77: 189-202.
- Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJ et al 2004. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 5:592-595.
- Moraes MO, Sampaio EP, Nery JA, Saraiva BC, Alvarenga FB, Sarno EM 2001. Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. *Br J Dermatol* 144:175-81
- Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al 1999. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR e ENH). *Scand J Immunol* 50:541-9.
- Mshana RN, Haregewoin A, Harboe M et al 1982. Thymus dependent lymphocytes in leprosy: I. T lymphocyte subpopulations defined by monoclonal antibodies. *Int J Lepr* 50:391-6.
- Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EM 1998. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 40:363-70.
- Ohyama H, Ogata K, Takeuchi K et al 2005. Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor beta 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. *J Clin Pathol* 58:740-743.
- Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, et al 2003. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun* 71:1427-33.

- Packe GE, Innes JA 1988. [Protective effect of BCG vaccination in infant Asians: a case-control study](#). *Arch Dis Child* 63 (3):277–281.
- Penna GO, Martelli CMT, Stefani MMA, Macedo VO, Maroja MF, Chaul A 2005. Talidomida no tratamento do eritema nodoso hansênico: revisão sistemática dos ensaios clínicos e perspectivas de novas investigações. *An Bras Dermatol* 80(5):511-22.
- [Pereira AC](#), [Brito-de-Souza VN](#), [Cardoso CC](#), [Dias-Baptista IM](#), [Parelli FP](#), [Venturini J](#), [Villani-Moreno FR](#), [Pacheco AG](#), [Moraes MO](#) 2009. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun* 10(2):174-80
- Pereira GA, Stefani MM, Araújo Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM 2004. [Human immunodeficiency virus type 1 \(HIV-1\) and \*Mycobacterium leprae\* co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort](#). *Am J Trop Med Hyg* 71(5):679-84.
- Pfaltzgraff RE, Ramu G. 1994. Clinical leprosy. In: Hastings RC, editor. *Leprosy*. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone p. 237-90.
- Pfaltzgraff RE, Bryceson A. 1985. Clinical leprosy. In: Hastings RC, ed. *Leprosy*. Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 168-76.
- Pimentel MIF, Sampaio EP, Nery JAC, Gallo MEN, Saad MHF, Machado AM, Duppre NC, Sarno EN 1996. Borderline-tuberculoid leprosy: clinical and immunological heterogeneity. *Lepr Rev* 67:287-296.
- Pocattera L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, et al 2006. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg* 74:868-79.
- Ponnighaus JM, Fine PE, Bliss L 1987. Certainty levels in the diagnosis of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 55:454-462.
- portal.saude.gov.br. Acessado em 19 de abril de 2009.
- Prevedello FC, Mira MT 2007. Hanseníase: uma doença genética?. *An Bras Dermatol*. 82(5):451-9.

- Rajalingam R, Singal DP, Mehra NK 1997. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens* 49(2):168-72.
- Rambukkana A 2000. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? *Trends Microbiol* 8:23-28.
- Rani R, Fernandez-Vina MA, Zaheer SA, Beena KR, Stastny P 1993. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from north India. *Tissue Antigens* 42(3):133-137.
- Ranque B, Nguyen VT, Vu HT, Nguyen TH, Nguyen NB, Pham XK, et al 2007. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. *Clin Infect Dis* 44:33-40.
- Rea TH, Sieling PA 1998. Delayed-type hypersensitivity reactions followed by erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 66:316-27.
- Report of the International Leprosy Association technical Forum. Paris, 25 – 28 February 2002.
- Ridley DS & Jopling WH 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34:255-273.
- Ridley MJ, Ridley DS 1983. The immunopathology of erythema nodosum leprosum: the role of extravascular complexes. *Lepr Rev* 54:95-107.
- Roche PW, Theuvenet WJ, Britton WJ 1991. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. *Lancet* 338:654-657.
- Rose P & Waters MF 1991. Reversal reactions in leprosy and their management. *Lepr Rev* 62:113-121.
- Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV 1999. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* 179:187-91.
- Roy S, McGuire W, Mascie-Taylor CGN et al 1997. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* 176:530-2.
- Sacchetim SC 2004. A endemia hansênica no estado de Goiás. Situação e Tendências no período de 1988 a 2001. *Revista de Patologia Tropical*, Vol. 33, nº 3.

- Sales AM, Matos HJ, Nery JA, Duppre NC, Sampaio EP, Sarno EN 2007. Double-blind trial of the efficacy of pentoxifylline vs thalidomide for the treatment of type II reaction in leprosy. *Braz J Med Biol Res* 40:243-8.
- Sampaio SAP & Rivitti EA 1998. Hanseníase. In: *Dermatologia*. 1ª. edição, Artes Médicas, São Paulo, p. 467-487.
- [Santos AR](#), [Almeida AS](#), [Suffys PN](#), [Moraes MO](#), [Filho VF](#), [Mattos HJ](#), [Nery JA](#), [Cabello PH](#), [Sampaio EP](#), [Sarno EN](#) 2000. 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* 68(3):325-7.
- Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LM, Cabello PH, et al 2002. Role of tumor necrosis factor – alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 186:1687-91.
- Sarno EM, Grau GE, Vieira LMM, Nery JAC 1991. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 84:103-8.
- Sarno EN & Pessolani MC 2001. Leprosy. Oldest and most feared disease. *Lancet* 358 Suppl:39:358.
- Sauderson P, Gebre S, Byass P 2000. Reversal reaction in the skin lesions of AMFES patients: incidence and risk factors. *Lepr Rev* 71:309-317.
- Scarpini E, Galimberti D, Baron P, Clerici R, Ronzoni M, Conti G, Scarlato G 2002. IP-10 and MCP-1 levels in CSF and serum from multiple sclerosis patients with different clinical subtypes of the disease. *J Neurol Sci* 195:41-46.
- Schauf V, Ryan S, Scollard D, Jonasson O, Brown A, Nelson K, Smith T, Vithayasai V 1985. Leprosy associated with HLA-DR2 and DQw1 in the population of northern Thailand. *Tissue Antigens* 26(4):243-247.
- Schreuder PA 1998. The occurrence of reactions and impairments in leprosy: experience in the leprosy control program of three provinces in northeastern Thailand, 1987-1995 II. Reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 66:159-69.
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews* CMR19.2.338-381.

- [Scollard DM](#), [Joyce MP](#), [Gillis TP](#) 2006. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clin Infect Dis*.43(2):e19-22.
- Scollard DM, Smith T, Bhoopat L, Theetranont C, Rangdaeng S, Morens DM 1994. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 62:559-567.
- Sehgal VN 1987. Reactions in leprosy. Clinical aspects. *Int J Dermatol* 26:278-285.
- Siddiqui MR, Meisner S, Tosh K et al 2001. A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. *Nat Genet* 27(4):439-41.
- SINAN/SVS/MS Disponível em [portal.saude.gov.br](http://portal.saude.gov.br) [acessado em 14 abril de 2009].
- Sousa ALOM, Stefani MMA, Pereira GA, Costa MB, Rebello PF, Gomes MK, et al 2007. *Mycobacterium leprae* DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose Rifampin, Ofloxacin, and Minocycline. *Am J Trop Med Hyg* 77:829-33.
- Spelberg B, Edwards JE 2001. Type 1/Type 2 immunity in infectious disease. *Clin Infect Dis* 32(1):76-102.
- Stefani MMA, Martelli CMT, Morais-Neto OL, Martelli P, et al 1998. Assessment of anti-PGL-I as a prognostic marker of leprosy reaction. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 66(3):356-64.
- Stefani MM, Guerra JG, Martelli CT, Sousa ALM, Costa MB, Oliveira MLW, Scollard DM 2009. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: A preliminary report. *BMC Infect Dis* 9:75
- Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL; Brazilian Leprosy Study Group 2003. [In situ type 1 cytokine gene expression](#) *J Infect Dis* 188(7):1024-31.
- Talhari S, Neves RG, Pena GO, Oliveira MLW 2006. Hanseníase. 4ª edição, Manaus.
- Teles RM, Moraes MO, Geraldo NT, Salles AM, Sarno EM, Sampaio EP 2002. Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res* 294:355-62.
- Teo SK, Resztak KE, Scheffler MA, Kook KA, Zeldis JB, Stirling DI, Thomas SD, 2002. Thalidomide in the treatment of leprosy. *Microbes Infect* 4:1193-1202.

- [Tosh K](#), [Meisner S](#), [Siddiqui MR](#), [Balakrishnan K](#), [Ghei S](#), [Golding M](#), [Sengupta U](#), [Pitchappan RM](#), [Hill AV](#) 2002. A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population. *J Infect Dis* 186(8):1190-3.
- Tosh K, Ravikumar M, Bell JT, Meisner S, Hill AV, Pitchappan R 2006. Variation in MICA and MICB genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Hum Mol Genet* 15:2880-7.
- Ura S 2007. Tratamento e controle das Reações Hansênicas. *Hansen Int* 32(1):67-70.
- Ustianowski AP, Lawn SD, Lockwood DN 2006. Interactions between HIV infection and leprosy: a paradox. *Lancet Infect Dis* 6(6):350-60.
- Van Brakel WH, Khawas IB 1994. Silent neuropathy in leprosy: an epidemiological description. *Lepr Rev* 65:350-60.
- Van Brakel WH, Khawas IB, Lucas SB 1994. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal. *Lepr Rev* 65:190-203.
- Van Brakel WH, Nicholls PG, Das L, Barkataki P, Suneetha SK, Jadhav RS, et al 2005. The INFIR Cohort Study: investigating prediction, detection and pathogenesis of neuropathy and reactions in leprosy. Methods and baseline results of a cohort of multibacillary leprosy patients in north India. *Lepr Rev* 76:14-34.
- Van Eden W, Gonzalez NM, De Vries RR, Convit J, Van Rood JJ 1985. HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* 151(1):9-14.
- Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, Thai VH, Huong NT, Ba NN, Schurr E, Sarno EN, Moraes MO 2007. HLA-DRB1\*04 and DRB1\*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes and Immunity* 8:320-324.
- Vázquez-Botet M, Sánchez JL 1987. Erythema nodosum leprosum. *Int J Dermatol* 26:436-7.
- Verma KK, Srivastava P, Minz A, Verma K 2006. Role of azathioprine in preventing recurrences in a patient of recurrent erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev* 77:225-9.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM et al 2004. Human IL-23 producing type 1 macrophages promote but IL-10 – producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4560-4565.

- Visentainer JE, Tsuneto LT, Serra MF, Peixoto PR, Petzl-Erler ML 1997. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. *Braz J Med Biol Res.* 30(1):51-59.
- Wallac D, Cottenot F, Bach MA 1982. Imbalances in T cell subpopulations in lepromatous leprosy. *Int J Lepr* 50:282-90.
- Walker SL, Lockwood DN 2008. [Leprosy type 1 \(reversal\) reactions and their management.](#) *Lepr Rev* 79(4):372-86
- Waters MFR, Rees RJW, Sutherland I 1967. Chemotherapeutic trials in leprosy. *Int J Lepr* 35:311-35.
- Weekly Epidemiological Record 2008. 83, 293-300.
- Wemambu SN, Turk JL, Waters MF, Rees RJ 1969. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. *Lancet* 2: 933-5.
- Wibawa T, Soebono H, Matsuo M 2002. Association of a missense mutation of the laminin- $\alpha$ 2 gene with tuberculoid type of leprosy in Indonesian patients. *Trop Med Int Health* 7:631-636.
- WHO – World Health Organization 2009 (a). Disponível em <http://www.who.int/lep/classification/en/index.html> [acessado em 14 de setembro de 2009].
- WHO - World Health Organization 2009 (b) Disponível em <http://www.who.int/lep/mdt/en/index.html> [acessado em 14 de setembro de 2009].
- Wolcott RR 1947. Erythema nodosum in leprosy. *Int J Lepr* 15:380-8.
- Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Winberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 254:277-9.
- Zerva L, Cizman B, Mehra NK, Alahari SK, Murali R, Zmijewski CM, Kamoun M, Monos DS 1996. Arginine at positions 13 or 70-71 in pocket 4 of HLA-DRB1 alleles is associated with susceptibility to tuberculoid leprosy. *J Exp Med.* 183(3):829-836.



## **ANEXOS**