



Artigo/Article

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

NRAMP1 gene polymorphisms in individuals with leprosy reactions attended at two reference centers in Recife, northeastern Brazil

Márcia Almeida Galvão Teixeira¹, Norma Lucena Silva², Alessandra de Luna Ramos², Ana Hatagima³ e Vera Magalhães⁴

RESUMO

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

Palavras-chaves: Hanseníase. Polimorfismo de fragmento de restrição.

ABSTRACT

Introduction: To investigate susceptibility to leprosy reactions, three polymorphisms of the *natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP1)* gene were determined in 201 individuals who were attended at two reference centers in Recife, between 2007 and 2008. Of these, 100 were paucibacillary and 101 were multibacillary. **Methods:** The 274C/T, D543N and 1729+55del4 polymorphisms of the *NRAMP1* gene were determined using the technique of restriction fragment polymorphism on DNA extracted from peripheral blood. Allelic and genotypic frequencies were estimated by direct counting. **Results:** The predominant genotypes were: CC (51.8%) for 274C/T; GG (86.6%) for D543N; and +-TGTG (59.9%) for 1729+55del4. The mutant genotype 274 TT predominated in negativity of the reverse reaction ($p = 0.03$) and in positivity of erythema nodosum leprosum ($p = 0.04$). **Conclusions:** Our results suggest that 274 C/T polymorphism of the *NRAMP1* gene may aid in determining the susceptibility to type II reactions among leprosy patients.

Key-words: Leprosy. Restriction fragment polymorphism.

INTRODUÇÃO

A Hanseníase é uma doença complexa, cujo desfecho resulta de uma combinação entre a ação do *Mycobacterium leprae*, fatores ambientais, socioeconômicos e a predisposição individual¹.

O número global de casos de Hanseníase tem mostrado tendência de declínio desde o ano de 2001, exceto em regiões da África e no Brasil, as quais mantêm alta endemicidade².

As reações hansênicas são fenômenos de hipersensibilidade a antígenos do *Mycobacterium leprae*³. Os principais tipos de reação são: a reação reversa (tipo I) e o eritema nodoso hansênico (tipo II). A reação tipo I pode estar presente em indivíduos com as formas clínicas paucibacilares ou multibacilares, enquanto a reação tipo II acomete pacientes multibacilares⁴.

Os episódios reacionais estão presentes em cerca de 10% a 50% dos pacientes, predominando nas formas clínicas multibacilares. Geralmente surgem durante o tratamento, entre o segundo e sexto mês, mas podem ocorrer antes ou após a terapêutica e são responsáveis por sequelas importantes e dificultam o diagnóstico diferencial com a recidiva da doença, e, portanto, a conduta terapêutica⁵.

A teoria que admite que a incapacidade de destruição dos bacilos de Hansen pelos macrófagos pode ser influenciada por polimorfismos gênicos tende a ganhar força nos últimos anos^{6,7}. Tem-se postulado que um conjunto de genes pode modificar a susceptibilidade à Hanseníase e às diferentes formas clínicas^{1,7-10}.

Ferreira e cols⁹, estudando o polimorfismo (GT) n do *NRAMP1*, observaram que os indivíduos com resposta negativa à lepromina, ou seja, Mitsuda negativos, que expressavam um determinado tipo de alelo desse polimorfismo, apresentavam sete a oito vezes mais chances de desenvolver a Hanseníase, concluindo haver relação entre variações polimórficas e susceptibilidade à doença.

1. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco, Policlínica Lessa de Andrade, Recife, PE.

2. Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Medicina Integrada Prof. Fernando Figueira de Pernambuco, Recife, PE. 3. Laboratório de Genética Humana, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ. 4. Disciplina de Doenças Infecciosas e parasitárias, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE

Endereço para correspondência: Dra. Márcia Almeida Galvão Teixeira. FCM/UEPE. Rua Jornalista Guerra de Holanda 158/1102, Casa Forte, 52061-010 Recife, PE.

Tel: 55 81 3427-2268

e-mail: marciateixeira@folha.rec.br

Recebido para publicação em 05/10/2009

Aceito em 05/03/2010

Assim, também, o gene da proteína 1 associada à resistência natural do macrófago (*natural resistance associated macrophage protein 1 - NRAMP1*) tem sido relacionado à defesa inata, bem como à adquirida, que confere resistência a parasitas intracelulares, por sua atividade estar diretamente ligada ao processamento dos antígenos bacterianos pelas células fagocitárias^{11,12}.

O gene da *NRAMP1* localiza-se na região 2q35 do cromossoma 2 e a proteína codificada por ele é detectada no compartimento lisossomal de macrófagos, monócitos e leucócitos periféricos, como também no fígado, baço e pulmões, após indução por linfocinas e produtos bacterianos^{13,14}, exercendo a função de uma bomba de efluxo de cátions divalentes, como Fe^{++} e $Mn^{++15,16}$. A remoção destes íons, essenciais para a sobrevivência do microorganismo no macrófago, resulta em restrição da multiplicação e propagação intracelular do patógeno, além de privar a bactéria da produção de enzimas protetoras (catalase e superóxido dismutase), que neutralizam a ação de componentes oxigênio reativos produzidos pelo macrófago¹⁶⁻¹⁸.

Algumas mutações no gene *NRAMP1* anulam a resistência natural a infecções por *Mycobacteriae*. Liu e cols¹⁹, investigando 80 indivíduos com tuberculose, descreveram nove polimorfismos, dentre eles o 274C/T, que decorre de uma troca de bases citosina (C) por timina (T) na posição 274 do éxon 3, o polimorfismo D543N, no qual há troca de bases guanina (G) por adenina (A) na posição 1703 do éxon 15, e o terceiro polimorfismo 1729+55del4, no qual há deleção das bases TGTG na região 3' não traduzida (3'UTR). Concluíram que as variantes *NRAMP1* podem ser úteis para análise genética da susceptibilidade humana à hanseníase, em analogia à verificada para parasitoses intracelulares, porque esses polimorfismos são importantes reguladores das vias de diferenciação de macrófagos.

Meisner e cols²⁰ tomando como base a associação entre polimorfismo da *NRAMP1* e susceptibilidade à tuberculose, compararam a distribuição do polimorfismo 1729+55del4 na hanseníase e observaram maior frequência de heterozigose entre multibacilares.

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

MÉTODOS

Amostra

Realizou-se um estudo comparativo, observacional envolvendo 201 indivíduos hansenianos com quadro reacional, em tratamento ou após alta medicamentosa, excluída a forma neurítica pura de hanseníase, oriundos da demanda espontânea ou encaminhados por outros serviços da rede pública e acompanhados nos ambulatórios de hanseníase do Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM)/Universidade de Pernambuco e da Policlínica Lessa de Andrade, em Recife, nos anos de 2007 e 2008.

As reações hansênicas foram classificadas de acordo com os critérios de Ridley e Joppling²¹, em tipo I ou tipo II. O paciente com reação tipo I ou reversa caracterizava-se clinicamente por: infiltração de lesões antigas associadas ao surgimento de novas lesões em forma de manchas ou placas infiltradas, eritema, dor, lesões vésico-bolhosas, ulcerações, parestesia, mal-estar, febre, dor ou

espessamento de nervos periféricos. Como reação tipo II ou eritema nodoso, considerou-se o quadro caracterizado pelo surgimento de nódulos disseminados, febre e neurite⁴.

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

O tipo de pele foi baseado na classificação de Fitzpatrick²² que contempla a cor dos olhos, cabelos e da pele. Os tipos I, II e III corresponderam à pele branca, os tipos IV e V, à parda, e o tipo VI, à negra.

O protocolo constou de exame clínico dermatológico e realização de coleta de 7,5 ml de sangue venoso periférico, os quais foram enviados para o Laboratório de Imunopatologia do Instituto Aggeu Magalhães da FIOCRUZ, para extração do DNA genômico de leucócitos.

Determinação dos polimorfismos

A determinação dos polimorfismos foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pela técnica do polimorfismo de fragmento de restrição (RFLP) proposto por Lui e cols¹⁷. A reação foi realizada em um total de 25µL contendo 50ng a 100ng de DNA, Tris-HCL 10mM (pH 9.0), KCl 50mM, MgCl 1,5mM, 0,2mM de cada dNTP, 20pmol de cada iniciador e uma unidade de *Taq* DNA polymerase (Biotools, USA).

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

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

O produto da digestão foi visualizado em gel de poliacrilamida a 10% e corado pela prata. O gel foi secado em filme celofane e arquivado para determinação dos genótipos segundo o protocolo de Liu e cols¹⁹.

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

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

Ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros.

RESULTADOS

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

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

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

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

Na **Tabela 5**, observa-se a distribuição dos genótipos segundo tipos reacionais. Foi possível identificar diferenças significantes relacionadas ao genótipo mutante 274 TT. Em pacientes com genótipo TT, a reação tipo I foi mais frequente e a reação tipo II foi mais frequente nos indivíduos sem o genótipo TT.

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

Variáveis	Número	Porcentagem
Sexo		
masculino	131	65,2
feminino	70	34,8
Cor da pele		
fototipo III	42	20,9
fototipo IV	60	29,9
fototipo V	74	36,8
outros	25	12,4
Idade (anos)		
0 - 14	8	4,0
15 - 29	40	19,9
30 - 44	69	34,3
45 - 59	61	30,4
≥ 60	23	11,4
Procedência		
Recife	129	64,2
interior	39	19,4
região metropolitana	33	16,4

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

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

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

TABELA 3 - Distribuição das frequências alélicas e genótípicas de cada polimorfismo segundo baciloscopia e sexo dos pacientes.

Polimorfismo	Alelo/Genótipo	Multibacilares				p	Paucibacilares				p
		masculino		feminino			masculino		feminino		
		nº	%	nº	%		nº	%	nº	%	
274C/T	C	95	66,9	43	74,1	0,32	89	75,4	55	72,4	0,64
	T	47	33,1	15	25,9		29	24,6	21	27,6	
	CC	32	45,0	17	58,6	0,22	33	55,9	20	52,6	0,75
	CT	31	43,7	9	31,0	0,24	23	39,0	15	39,5	0,96
	TT	8	11,3	3	10,4	1,00*	3	5,1	3	7,9	0,68*
	G	136	95,8	54	93,1	0,48*	106	89,8	72	94,7	0,23
D543N	A	6	4,2	4	6,9		12	10,2	4	5,3	
	GG	65	91,5	25	86,2	0,47*	47	79,7	34	89,5	0,21
	GA	6	8,5	4	13,8		12	20,3	4	10,5	
	+TGTG	72	58,0	27	58,7	0,94	64	60,4	40	8,8	0,84
1729+55del4	-TGTG	52	41,0	19	41,3		42	39,6	28	41,2	
	++TGTG	16	25,8	8	34,8	0,42	17	32,1	9	26,5	0,58
	+TGTG	40	64,5	11	47,8	0,17	30	56,6	22	64,7	0,45
	-TGTG	6	9,7	4	17,4	0,45*	6	1,3	3	8,8	0,73

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

TABELA 4 - Distribuição das frequências alélicas e genótípicas de cada polimorfismo segundo baciloscopia e fototipo dos pacientes.

polimorfismo	Alelo/genótipo	Multibacilares				p	Paucibacilares				p
		A*		B*			A*		B*		
		nº	%	nº	%		nº	%	nº	%	
274C/T	C	27	79,4	111	66,9	0,15	46	74,2	98	74,2	0,99
	T	7	20,6	55	33,1	0,38	16	25,8	34	25,8	
	CC	10	58,8	39	47,0	0,91	18	58,1	35	53,0	0,64
	CT	7	41,2	33	39,8	0,20*	10	32,2	28	42,4	0,34
	TT	0	0,0	11	13,2		3	9,7	3	4,6	0,38*
D543N	G	31	91,2	159	95,8	0,23	60	96,8	118	89,4	0,08
	A	3	8,8	7	4,2		2	3,2	14	10,6	
	GG	14	82,4	76	91,6	0,38*	29	93,5	52	78,8	0,07
	GA	3	17,6	7	8,4		2	6,5	14	21,2	
1729+55del4	+TGTG	20	58,8	79	58,1	0,94	37	63,8	67	57,8	0,45
	-TGTG	14	41,2	57	41,9		21	36,2	49	42,2	
	++TGTG	4	23,5	20	29,4	0,77*	10	34,5	16	27,6	0,51
	+TGTG	12	70,6	39	57,4	0,32	17	58,6	35	60,3	0,88
	-TGTG	1	5,9	9	13,2	0,68*	2	6,9	7	12,1	0,71*

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

TABELA 5 - Distribuição dos pacientes reacionais estudados quanto às frequências genótípicas de cada polimorfismo e o tipo reacional.

Polimorfismo	Genótipo	Reação Tipo I				p	Reação Tipo II				p
		sim		não			sim		não		
		nº	%	nº	%		nº	%	nº	%	
274C/T	CC	87	52,4	15	48,4	0,68	25	50,0	77	52,4	0,77
	CT	68	41,0	10	32,2	0,36	17	34,0	61	41,5	0,35
	TT	11	6,6	6	19,4	0,03*	8	16,0	9	6,1	0,04
D543N	GG	144	86,7	27	87,1	0,61*	44	88,0	127	86,4	0,77
	GA	22	13,3	4	12,9		6	12,0	20	13,6	
1729+55del4	++TGTG	44	30,1	6	23,1	0,46	12	28,6	38	29,2	0,93
	+TGTG	85	58,2	18	69,2	0,29	24	57,1	79	60,8	0,68
	-TGTG	17	11,7	2	7,7	0,42	6	14,3	13	10,0	0,30*

*Teste de Fisher.

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

DISCUSSÃO

O estudo da associação entre três polimorfismos do gene *NRAMP1* e as reações hansênicas em pacientes multibacilares e paucibacilares baseou-se nas evidências de que a susceptibilidade, resistência e apresentações clínicas da hanseníase podem ser atribuídas aos polimorfismos genéticos^{6,9,14,24}. No entanto, não se localizou qualquer publicação dessa associação com as reações hansênicas, daí a importância desta pesquisa.

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

Uma resposta imune inata efetiva em combinação com a baixa virulência do *Mycobacterium leprae* está associada à resistência para o desenvolvimento da hanseníase³. Desse processo, participam os receptores de reconhecimento de padrões, como os *Toll-like* (TLRs), que são essenciais para a identificação de patógenos pelos macrófagos e pelas células dendríticas, os quais induzem à resposta imune Th1 ou Th2, que pode ser influenciada pela expressão de determinados alelos do gene *NRAMP1*²³.

A proteína *NRAMP1* está localizada no compartimento endossômico ou lisossômico maduro de macrófagos ativado pela presença da *M. leprae* e determina a liberação do sinal intracelular para a migração de endossomos ou lisossomos e fusão destes no mecanismo de regulação da multiplicação bacteriana. Genótipos selvagens da *NRAMP1* promovem migração rápida dessas vesículas do sistema de Golgi para a região celular contendo fagossomos com *Mycobacterium leprae*, diferente do que ocorre nos genótipos mutantes¹¹. Essa ação dos genótipos da *NRAMP1* depende também do equilíbrio iônico e do transporte de cátions divalentes (Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+}), para manutenção do pH intracelular que assegura a ação da peptidase para processamento antigênico endossomal, impedindo o desenvolvimento e a multiplicação do *Mycobacterium leprae* no macrófago^{11,15,23,24}.

Defeitos na produção da proteína codificada pelo *NRAMP1*, decorrentes da ação de determinados alelos mutantes, podem levar a uma síntese proteica inadequada e, conseqüentemente, à replicação bacteriana por falha da atividade macrofágica. Esses achados foram confirmados por Abel e cols⁶ e Meisner e cols²⁰ ao identificarem, em população vietnamita, africana e indiana, polimorfismos envolvidos na hanseníase, dentre eles o 274C/T, o D543N e o 1729+55del4.

Pode-se afirmar que o gene mutante suprime a ativação macrofágica, facilitando a multiplicação bacteriana e, conseqüentemente, favorecendo a forma multibacilar o que foi observado por Bellamy e cols²⁵ ao estudarem a tuberculose. Analogamente, indivíduos com composição gênica selvagem teriam maior atividade dos macrófagos, o que dificultaria a reprodução bacteriana, levando à forma paucibacilar.

No entanto, essa lógica parte da premissa de que a multiplicação bacteriana estaria relacionada à composição gênica da *NRAMP1*, independente da ação de outros fatores, o que não tem sido corroborado por Abel e cols⁶ ao alertarem que a composição gênica interfere sobre a susceptibilidade à infecção bacteriana, mas não a sua progressão.

Na presente pesquisa, não foi observado o predomínio do genótipo heterozigótico +TGTG/-TGTG do polimorfismo 1729+55del4 nos multibacilares, como verificaram Meisner e cols²⁰, ao estudarem hanseníase na população africana.

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

Soo e cols²⁴ testaram a hipótese de que a *NRAMP1* influencia o padrão de resposta imunológica, estudando indivíduos com leishmaniose, e concluíram que os alelos selvagens da *NRAMP1* elicitavam predominantemente linfócitos T helper I, ou seja, reação Th1, enquanto que os alelos mutantes induziam reações Th2.

Para investigar a influência da *NRAMP1* na resposta imunológica adquirida contra a *Mycobacterium leprae*, Alcais e cols²⁶ realizaram análise de ligação entre a região genômica *NRAMP1* e a intensidade da reação de Mitsuda em 118 componentes de 20 famílias nucleares com hanseníase, no Vietnã, ao identificarem essa associação, concluíram que a *NRAMP1* influencia a diferenciação das reações imunológicas Th1/Th2.

Scollard e cols³, em revisão de artigos publicados entre 1990 e 2006, sobre os diversos aspectos da hanseníase, consideraram importante a associação entre as formas mais graves e o padrão de citocinas Th2, ficando as formas leves relacionadas ao padrão Th1.

Essas comprovações parecem reforçar os resultados da presente pesquisa, os quais acrescentaram ao conhecimento da hanseníase a associação entre os padrões de citocinas e o genótipo TT do polimorfismo 274C/T. Esse resultado permitiu levantar a hipótese de que a composição gênica mantém uma relação mais estreita com a reação imunológica do que com a multiplicação bacteriana, representada pela baciloscopia.

Concluindo, no presente estudo, os achados permitiram enunciar a hipótese de que a composição gênica parece estar mais relacionada à reação imunológica do que à multiplicação bacteriana.

AGRADECIMENTOS

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

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse no desenvolvimento do estudo.

REFERÊNCIAS

1. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborgh PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 2006;77:189-202.
2. WHO. World Health Organization. Weekly epidemiological record. No. 25, 2007, 82, 225-232 Geneva; 2007.
3. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:338-381.

4. Andrade ARC, Lehman LF, Schureuder PAM. Como reconhecer e tratar reações hansênicas. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte; 2005.
5. Brito MFM. Associação entre reação hansênica após tratamento (Poliquimioterapia Multibacilar - PQT/MB) e a carga bacilar através da detecção de anticorpos IgM (Imunoglobulina M) contra PGL-1 (Glicolípido Fenólico 1) do *Mycobacterium leprae*. Tese. Recife, PE; 2008.
6. Abel L, Sanchez F, Obert J, Thuc LV, Skamene E, Lagrange PH, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *Infect Dis* 1998; 177: 133-145.
7. Beiguelman B. Genética e hanseniase. *Cien Saude Colet* 2002; 7:117-128.
8. Alcais A, Mira M, Casanova JL, Schurr E, Abel L. Genetic dissection of immunity in leprosy. *Curr Opin Immunol* 2005;17:44-48.
9. Ferreira FR, Goulart LR, Silva HD, Goulart IMB. Susceptibility to Leprosy May Be Conditioned by an Interaction between the NRAMP1 Promoter Polymorphisms and the Lepromin Response. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2004; 72: 457-467.
10. Prevedello FC, Mira MT. Hanseniase: uma doença genética? *An Bras Dermatol* 2007; 82:451-459.
11. Blackwell JM, Searle S, Goswami T, Miller EN. Understanding the multiple functions of Nramp1. *Microbes and Infect* 2000; 2: 317-321.
12. Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Govoni G, Gros P. The Nramp1 Protein and Its Role in Resistance to Infection and Macrophage Function. *Proceedings of the Association of American Physicians* 1999; 111: 283-289.
13. Marquet S, Lepage P, Hudson TJ, Musser JM, Schurr E. Complete nucleotide sequence and genomic structure of the human NRAMP1 gene region on Chromosome region 2q35. *Mamm Genome* 2000; 11:755-62.
14. Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet* 2003;33:412-415.
15. Biggs TE, Baker ST, Botham MS, Dhital A, Barton CH. Nramp1 modulates iron homeostasis *in vivo* and *in vitro*: evidence for a role in cellular iron release involving de-acidification of intracellular vesicles. *Eur J Immunol* 2001;31:2060-2070.
16. Nevo Y, Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research* 2006; 1763 : 609-620.
17. Blackwell JM, Searle S. Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (= Ity/Lsh/Bcg). *Immunol Lett* 1999; 65: 73-80.
18. Lam-Yuk-Tseung S, Picard V, Gros P. Identification of a Tyrosine-based Motif (YGS1) in the Amino Terminus of Nramp1 (Slc11a1) That Is Important for Lysosomal Targeting. *J Biol Chem* 2006; 281: 31677-31688.
19. Liu Jing T, Fujiwara M, Buu NT, Sánchez FO, Cellier M, Paradis AJ, et al. Identification of Polymorphisms and Sequence Variants in the Human Homologue of the Mouse Natural Resistance-Associated Macrophage Protein Gene. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 845-853.
20. Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill AVS. Association of NRAMP1 Polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 733-735.
21. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966; 34:255-273.
22. Fitzpatrick, TB. Soleil et peau. *J Med Esthet* 1975; 2:33034.
23. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999;285:732-736.
24. Soo SS, Villarreal-Ramos B, Anjam Khan CM, Hormaeche CE, Blackwell JM. Genetic Control of Immune Response to Recombinant Antigens Carried by an Attenuated *Salmonella typhimurium* Vaccine Strain: *Nramp1* Influences T-Helper Subset Responses and Protection against Leishmanial Challenge *Infect Immun* 1998; 66:1910-1917.
25. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 1998;338:640-644.
26. Alcais A, Sanchez FO, Thunc NV, Lap VD, Oberti J, Lagrange PH, et al. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *J infect Dis* 2000; 181: 302-308.