

**IMPLICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NA MANIFESTAÇÃO DA
HANSENÍASE *PER SE* OU NA GRAVIDADE CLÍNICA DE PACIENTES
PORTADORES DE HANSENÍASE DO MUNICÍPIO DE CAMPOS DOS
GOYTACAZES**

REBEKA DA CONCEIÇÃO SOUZA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO -
UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ
OUTUBRO DE 2017**

IMPLICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NA MANIFESTAÇÃO DA
HANSENÍASE *PER SE* OU NA GRAVIDADE CLÍNICA DE PACIENTES
PORTADORES DE HANSENÍASE DO MUNICÍPIO DE CAMPOS DOS
GOYTACAZES

REBEKA DA CONCEIÇÃO SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia – CBB, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Alba Lucínia Peixoto Rangel

Campos dos Goytacazes

Outubro de 2017

IMPLICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS NA MANIFESTAÇÃO DA
HANSENÍASE *PER SE* OU NA GRAVIDADE CLÍNICA DE PACIENTES
PORTADORES DE HANSENÍASE DO MUNICÍPIO DE CAMPOS DOS
GOYTACAZES

REBEKA DA CONCEIÇÃO SOUZA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia – CBB, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 10 de outubro de 2017.

Banca Examinadora:

Dr^a. Alba Lucínia Peixoto Rangel – LBR/UENF (Orientadora)

Msc. Edilbert Pellegrini Nahn Jr. – FMC

Dr^a. Marcela Santana Bastos Boechat – LMGV/UENF

Dr. Milton Kanashiro – LBR/UENF

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me sustenta com sua presença em minha vida.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia e a CAPES pela bolsa concedida.

À Prof^a Alba pela orientação, amizade e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Thaís Louvain pela revisão deste trabalho e todo o auxílio durante esse ano.

Ao Dr. Edilbert Pellegrini, a Dr^a Marcela Boechat e ao Dr. Milton Kanashiro por aceitar fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Ao prof^o Enrique Medina por me receber em seu laboratório para a realização da parte genética do trabalho.

Aos amigos Letícia Nascimento e Yuri Scheidegger pela parceria no Projeto Hanseníase. Aos amigos do LBR, Leonardo Vilquer, Livia Mattos, Rhônia França, Luciana Pereira e Milena Tavares.

Aos amigos do NUDIM pelos incansáveis dias, e até mesmo noites, de trabalho e boas risadas. Cinthya Neves, Cleiton Figueiredo, Cristina Ferreira, Diego Sá, Douglas Machado, Filipe Brum, Graziela Araújo, Jozimara Teixeira, Juan Carlo, Juliana Ywasaki, Pedro Mozer, Thais Louvain e Thiago Barbosa.

Aos meus pais por todo apoio me dado. Meus irmãos (Júnior e Jô), minha cunhada Dayara e meus sobrinhos (Sophia, Daniele, Júlia, Darlei e Danilo) que são minhas alegrias.

Ao meu namorado Antonio, pelas palavras de incentivo e carinho nos momentos estressantes.

A minha amiga/irmã Karol pela amizade, apoio e incentivo.

Aos amigos Grazielle Fonseca, Andreza Rezende e Vinícius Mussi pela companhia nas disciplinas acadêmicas.

Aos demais amigos de vida que fazem a caminhada valer a pena, Kíssila, Ruama, Olga, Andresa, Fabiana, Lara, Roberta, Emilane, Thaís, Flavinha, Maiara, Érica e Tamyres.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1- Histórico	15
2.2- Epidemiologia	15
2.3- Classificação.....	16
2.4- Transmissão e Tratamento	18
2.5- Diagnóstico	18
2.6- Resposta imune a <i>Mycobacterium leprae</i>	19
2.7- Susceptibilidade genética a infecção por <i>M. leprae</i>	22
2.8- Genes candidatos ligados a resposta imune	23
2.8.1- <i>P2X7</i>	23
2.8.2- <i>IFNGR1</i>	24
2.8.3- <i>TLR9</i>	24
2.8.4- <i>CCR5</i>	25
4- OBJETIVOS	28
4.1- Geral	28
4.2- Específicos:	28
5- MATERIAL E MÉTODOS.....	29
5.1- Sujeitos da Pesquisa.....	29
5.2- Análise <i>in silico</i> : Identificação dos SNPs e desenho dos iniciadores	30
5.3- Coleta de Sangue e Extração de DNA.....	31
5.3 - Quantificação do DNA.....	32
5.4- PCR-Multiplex	32
5.5- Gel de Agarose	32
5.7- Sequenciamento por Extensão de um Único Nucleotídeo	33
5.8- Genotipagem por QF-PCR	34
5.9- Análises Estatísticas	34
6- RESULTADOS	35
6.1- Casuística do Estudo	35
6.2- Genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)	37
6.2.1- Associação de <i>P2X7_rs3751143</i> com a severidade da doença	38
6.2.2- Associação de <i>TLR9_rs352140</i> com a manifestação da forma clínica MHT	41
6.3.1- Associação da variante <i>CCR5</i> delta 32 na manifestação da hanseníase <i>per se</i> e na gravidade da doença	44

7- DISCUSSÃO	46
8- CONCLUSÃO	51
9- REFERÊNCIAS	52

Figuras

Figura 1: Modelo do espectro de hanseníase baseado em fatores genéticos e ambientais. Extraído e Traduzido de Mazini et al., 2016.....	23
Figura 2: Distribuição numérica dos indivíduos participantes do estudo.	35
Figura 3: Distribuição numérica dos indivíduos genotipados no estudo.	36
Figura 4: Eletroferograma representativo dos perfis alélicos obtidos por sequenciamento por extensão de único nucleotídeo em multiplex. A amostra do sujeito da pesquisa do grupo caso H26 possui os seguintes genótipos rs352140-G/A, rs1718119-G, rs1327474-C, rs3751143-C/A.....	37
Figura 5: Eletroferograma representativo do perfil alélico para o marcador CCR5 em um indivíduo portador de hanseníase. O paciente 37 é heterozigoto, ou seja, apresenta os alelos de 137pb (CCR5delta32) e de 172pb (CCR5/WT).	43

Tabelas

Tabela 1– Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase (Extraída de Souza, 1997).....	17
Tabela 2: Descrição dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) selecionados nos genes alvos.....	30
Tabela 3: Desenho de iniciadores para o Sequenciamento de Extensão de um Único Nucleotídeo e QF-PCR.....	31
Tabela 4: Características gerais dos indivíduos participantes da pesquisa.	36
Tabela 5: Características gerais dos indivíduos da pesquisa que foram sequenciados.	37
Tabela 6: Frequências alélicas para os marcadores TLR9_rs352140, P2X7_rs3751143, P2X7_rs1718119 dos indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.	38
Tabela 7: Análises de associação genética do polimorfismo rs3751143 em uma amostragem das populações caso e controle.	39
Tabela 8: Análises de associação genética do polimorfismo P2X7_rs3751143 comparando controle e as formas clínicas da Hanseníase na classificação de Madri.	39
Tabela 9: Análises de associação genética do polimorfismo P2X7_rs3751143 comparando as formas clínicas da Hanseníase segundo a classificação da OMS.	40
Tabela 10: Análises de associação genética do polimorfismo P2X7_rs3751143 comparando a forma clínica MHI às outras formas clínicas da Hanseníase na classificação de Madri.	41
Tabela 11: Análises de associação genética do polimorfismo TLR9_rs352140 nos grupos Caso e Controle.....	41
Tabela 12: Análises de associação genética do polimorfismo TLR9_rs352140 comparado controles e as formas clínicas na classificação de Madri.	42
Tabela 13: Análises de associação genética do polimorfismo TLR9_rs352140 comparando controle e as formas clínicas da Hanseníase na classificação usada pela OMS.	42

Tabela 14: Análises de associação genética do polimorfismo rs352140 comparando controle e as formas clínicas da Hanseníase na classificação de Madri.	43
Tabela 15 Análises de associação genética do polimorfismo rs352140 entre as formas clínicas da Hanseníase na classificação utilizada pela OMS.	43
Tabela 16: Análise de associação genética do polimorfismo CCR5delta32 do gene CCR5 nos grupos Caso e Controle.	44
Tabela 17: Análises de associação genética do polimorfismo CCR5delta32 entre Controle e as formas clínicas da Hanseníase na classificação de Madri.	44
Tabela 18: Análises de associação genética do polimorfismo CCR5delta32 comparando o grupo controle às formas clínicas da Hanseníase na classificação operacional usada pela OMS.	45
Tabela 19: Análises de associação genética do polimorfismo CCR5delta32 entre as formas clínicas na classificação de Madri.....	45
Tabela 20: Análise de associação genética do alelo CCR5delta32 entre as formas clínicas na classificação adotada pela OMS.	45

Lista de Abreviaturas

a.C.- Antes de Cristo.

A-adenina, alelo A

APC- células apresentadoras de antígenos

B- forma borderline

BB- borderline-borderline

BL- borderline-lepromatoso

BT- borderline-tuberculóide

C- citosina, alelo C

CCR5- receptor 5 quimiocina

CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CpG- dinucleotídeo citosina-guanina

CXCL8- Ligante de quimiocinas CXC 8

D-dimorfa

ddNTP- dideoxynucleotídeos

DNA- ácido desoxirribonucléico

EHW- equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

ENL- eritema nodoso leproso

G- guanina, alelo G

HIV- vírus da imunodeficiência humana

I- indeterminada

IFNG- interferon gamma

IFNGR1- interferon gamma receptor 1

IL 1- interleucina

IL-1 β - interleucina beta

L- lepromatoso

LL- lepromatoso-lepromatoso

M. leprae- *Mycobacterium leprae*.

MAF- frequência do alelo menor

MB- Multibacilar

MHC- complexo principal de histocompatibilidade

MHD – Mal Hansênico Dimorfa

MHI – Mal Hansênico Indeterminada

MHT – Mal Hansênico Tuberculóide

MHV – Mal Hansênico Virchowiana

mL- mililitros

NK- natural killer

OMS- Organização Mundial de Saúde

OR- *odds ratio*

P2X7- purinergic receptor P2X 7

PAMP- padrões moleculares associados a agentes patogênicos

PB- Paucibacilar

PCR- reação em cadeia de polimerase

PQT- poliquimioterapia

PRR- receptores de reconhecimento de padrões

PUBMED-Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica

QF-PCR- .PCR quantitativa por fluorescência

RR- reação de reversão

SAP- Shrimp Alkaline Phosphatase

SNaPshot- sistema de genotipagem multiplex de SNP

SNP- polimorfismo de nucleotídeo único

STR- microssatélites

T- timina, alelo T

T- tuberculóide

TLR- *Toll-like receptors*

TLR9- toll like receptor 9

TNFA- *fator de necrose tumoral A*

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TT- hanseníase tuberculóide/ tuberculóide-tuberculóide

U- unidades

UCSC - Universidade da Califórnia em Santa Cruz

uL- microlitros

V- virchoviano

VV- hanseníase virchowiana.

RESUMO

A hanseníase, causada por *Mycobacterium leprae*, é uma doença que acomete mucosa, pele e nervos periféricos. É classificada pela diversificação no curso clínico da infecção, variando de uma doença paucibacilar na qual poucos bacilos estão presentes, a uma doença multibacilar, na qual uma grande carga bacilar está presente nas lesões. A exposição à *M. leprae* pode não ser suficiente para desencadear a doença, o que pode ser explicado pela dependência de fatores imunológicos e genéticos para determinar resistência e susceptibilidade. Estudo de caso controle foi realizado e polimorfismos em genes candidatos envolvidos na manifestação da doença *per se* ou na manifestação das formas clínicas foram genotipados pelas técnicas de Sequenciamento de um único nucleotídeo e QF-PCR. As frequências alélicas dos polimorfismos *TLR9_rs352140* (A), *P2X7_rs3751143* (C), e *CCR5_rs333* (Δ 32) na população estudada foram de 0,43, 0,31, 0,11, respectivamente. Neste estudo foi encontrada associação do polimorfismo *P2X7_rs3751143* (C) com a forma clínica Indeterminada (OR: 15,35; IC95%: 1,8-128; *p*: 0,001) em comparação aos controles. Este polimorfismo também foi associado a Paucibacilares (OR: 2,65; IC95%: 1,12-6,09; *p*: 0,02) em comparação a Multibacilares, na classificação usada pela OMS. *TLR9_rs352140* (A) teve associação com a forma clínica Tuberculóide (OR: 0,32; IC95%: 0,12-0,86; *p*: 0,02) em comparação ao grupo controle. O polimorfismo *CCR5* delta 32 foi associado com menor risco na manifestação da hanseníase *per se* (OR: 0,12; IC95%: 0,02-0,5; *p*: 0,0005) e menor risco na manifestação da forma clínica multibacilar (OR: 0,09, IC95%: 0,01-0,7; *p*: 0,045) em relação ao grupo controle. Esses dados mostram o possível envolvimento dos genes *TLR9*, *P2X7* e *CCR5* na manifestação da doença e na gravidade das formas clínicas.

Palavras-chaves: *Mycobacterium leprae*, Hanseníase, SNP, Indel, Resposta Imune.

ABSTRACT

Leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, is a disease that affects mucous, skin and peripheral nerves. It is classified by diversification in the clinical course of infection, ranging from a paucibacillary disease in which few bacilli are present, to a multibacillary disease, in which a large bacillary load is present in the lesions. Exposure to *M. leprae* may not be sufficient to trigger a disease, which may be explained by the dependence of immunological and genetic factors to determine resistance and susceptibility. Control case study was performed and polymorphisms in candidate genes involved in the manifestation of the disease per se or in the manifestation of the clinical forms were genotyped using single-nucleotide Sequencing and QF-PCR. The allelic frequencies of the TLR9_rs352140 (A), P2X7_rs3751143 (C), and CCR5_rs333 (Δ 32) polymorphisms in the studied population were 0.43, 0.31, 0.11, respectively. In this study, the association of the polymorphism P2X7_rs3751143 (C) with an undetermined clinical form (OR: 15.35; 95% CI: 1.8-128; p: 0.001) was found in regulations. This polymorphism was also associated with Paucibacillar (OR: 2.65; 95% CI: 1.12-6.09; p: 0.02) compared to Multibacillary, in the WHO classification. TLR9_rs352140 (A) had an association with a clinical form Tuberculoid (OR: 0.32; 95% CI: 0.12-0.86; p: 0.02) compared to the control group. The CCR5 delta 32 polymorphism was associated with a lower risk of leprosy per se (OR: 0.12; 95% CI: 0.02-0.5; p: 0.0005) and a lower risk of multibacillary clinical manifestations (OR: 0.09, 95% CI: 0.01-0.7, p: 0.045) in relation to the control group. These data show the possible involvement of the TLR9, P2X7 and CCR5 genes in the manifestation of the disease and in the severity of the clinical forms.

Key-words: *Mycobacterium leprae*, Leprosy, SNP, Indel, Immune Response.

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase, causada por *Mycobacterium leprae*, é uma doença que acomete mucosa, pele e nervos periféricos. É classificada pela diversificação no curso clínico da infecção, variando de uma doença paucibacilar na qual poucos bacilos estão presentes, a uma doença multibacilar, na qual uma grande carga bacilar está presente nas lesões (GOULART *et al.*, 2002). *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório e infecta, preferencialmente, macrófagos e células de Schwann (RAMBUKKANA, 2001). O dano neural é atribuído a proliferação bacteriana ou a resposta imune do hospedeiro a relativamente poucos bacilos em nervos periféricos e áreas da derme adjacente (GOULART *et al.*, 2002). A exposição a *M. leprae* pode não ser suficiente para desencadear a doença, o que pode ser explicado pela dependência de fatores imunológicos e genéticos para determinar resistência e susceptibilidade.

Baseando-se na história natural da doença, observa-se que existe uma forma de resistência parcial à infecção por *M. leprae*, a hanseníase tuberculóide (T), na qual as manifestações estão relacionadas à exacerbação da resposta imune celular (*Th1*), ocorrendo formação de granuloma bem definido, limitação das lesões e destruição completa dos bacilos. No outro pólo, encontra-se a forma de alta susceptibilidade, a hanseníase virchowiana (V), que se caracteriza por deficiência de resposta imune celular e consequente polarização da resposta imune para o padrão humoral (*Th2*), com excessiva multiplicação bacilar e disseminação da infecção para víscera e tecido nervoso. É a forma de importância epidemiológica, pois os bacilos estão maciçamente presente nas lesões cutâneas (FOSS, 1997). Entre essas formas polares situam-se as formas instáveis da doença (dimorfa e indeterminada), com amplo espectro de manifestações clínicas, dependendo da potencialidade da resposta imune celular do hospedeiro ao parasita (FOSS, 1997). Tais peculiaridades da resposta imune do hospedeiro contra *M. leprae* suscitam interesse em investigar polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e Indels em genes envolvidos na resposta imune, tais como *IFNGR1*, *TLR9*, *P2X7* e *CCR5*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Histórico

A hanseníase é uma das doenças mais antigas que acometem o homem. As referências mais antigas datam de 600 a.C. e procedem da Índia que, juntamente com a África, parecem ser os focos iniciais da doença (LASTÓRIA *et al.*, 2003). Foi o médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, notável pesquisador sobre o tema, que identificou, em 1873, o bacilo *M. leprae* como o causador da lepra (EIDT, 2004). No Brasil, o nome da doença foi modificado para hanseníase através da sanção da Lei Federal N°9.010 no dia 29 de março de 1995 no governo do Presidente da República Fernando Henrique Cardoso, na qual através do artigo 1º que diz: “O termo “lepra” e seus derivados não poderão ser utilizados na linguagem empregada nos documentos oficiais da Administração centralizada e descentralizada da União e dos Estados-membros”. (BRASIL, 1995). Os primeiros casos da doença no Brasil foram notificados no ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro (EIDT, 2004). O dia Mundial de Luta contra hanseníase é celebrado em 31 de janeiro (BRASIL, 2017).

2.2- Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) nos últimos dez anos o número de novos casos detectados vem diminuindo, em 2006 esse número era de 258 133, enquanto em 2016, um total de 214 783 novos casos foi notificado de 143 países, correspondendo à taxa de detecção global de novos casos de 2,9 por 100 000 habitantes (WHO, 2017).

Dos países que apresentaram estatísticas anuais da hanseníase à Organização Mundial de Saúde, a Índia registrou o maior número de novos casos 135 485, representando cerca de 60% dos casos novos globais de hanseníase, seguido pelo Brasil (25.218) com 10% dos casos novos e Indonésia que relatou 7% da carga global de casos novos (16.826) no ano de 2016 (WHO, 2017).

A hanseníase é considerada um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. O Brasil não atingiu a meta de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública (definido pela prevalência inferior a 1 caso novo por 10.000 habitantes), sendo responsável pela endemia no continente americano. Em 2011 a taxa de prevalência no Brasil era de 1,54 casos por 10.000 habitantes. A prevalência da doença é repartida de forma desigual

entre as diferentes regiões do país e acompanha a desigualdade socioeconômica regional, com as seguintes taxas de prevalência por 10.000 habitantes: 3,75 no Centro-Oeste, 3,49 no Norte, 2,35 no Nordeste, 0,61 no Sudeste, e 0,44 no Sul (MIRANZI SSC *et al.*, 2010; LASTÓRIA e MORGADO DE ABREU, 2014).

No estado do Rio de Janeiro os números de casos novos sofreram queda ao longo dos últimos anos. Em 2014, foram registrados 1.116 casos de Hanseníase, enquanto em 2013, foram 1.290. Há uma década, o número era mais do que o dobro: em 2005, foram 2.711 casos (MASCARENHAS, 2015).

Em Campos dos Goytacazes o número total de pacientes diagnosticados com hanseníase e notificados de janeiro de 2008 até outubro de 2010 foi de 240 indivíduos, dentre esse total, 50% eram da região norte de Campos, sendo Travessão de Campos o distrito mais acometido pela doença. Em relação à forma clínica da doença, 49,6% dos pacientes possuíam a forma Tuberculóide. Em relação a faixa etária, 53,3% da população de Campos que tinha hanseníase estavam entre 13 e 49 anos, com uma média de idade de 42,9 anos (BATISTA *et al.*, 2011). O coeficiente de prevalência da hanseníase em 2015 foi de 0,52 (SINAN).

2.3- Classificação

A classificação da forma clínica da hanseníase é intimamente ligada a resposta imune estabelecida pelo hospedeiro. As formas intermediárias são estabelecidas com a proximidade de cada polo. Atualmente, a maioria dos investigadores usam critérios Ridley e Jopling (NATH *et al.*, 2015). A classificação de Ridley e Jopling (1966) adota subgrupos dentro do espectro, que obedece, critérios clínicos e bacteriológicos, e enfatiza os aspectos imunológicos e histopatológicos. Siglas são utilizadas para indicar as duas formas polares tuberculóide-tuberculóide (TT) e lepromatoso-lepromatoso (LL) e os três subgrupos: borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatoso (BL). A classificação de Madri (1953) adota critérios de polaridade, baseados nas características clínicas da doença, que foram acrescidos pelos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, definindo os grupos polares, tuberculóide (T) e virchowiana (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada

(I); e o instável e intermediário, a forma borderline (B) ou dimorfa (D). Em 1982, um Comitê da Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma classificação simplificada e operacional, indicada para o trabalho de campo, baseada na provável população bacilar, que, por sua vez, relaciona-se às formas clínicas. De acordo com a pesquisa de bacilos no esfregaço de linfa, a baciloscopia, realizada em vários pontos definidos, como lóbulos de orelhas, cotovelos, joelhos e lesões, associada aos critérios clínicos da classificação de Madri (1953), pode-se agrupar os pacientes em paucibacilares e multibacilares, e indicar dois diferentes tipos de tratamento (SOUZA, 1997). As diferentes classificações podem ser correlacionadas como mostra a **Tabela 1**.

Tabela 1– Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase (Extraída de Souza, 1997).

	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Borderline (B)	Virchoviana V
MADRI				
Ridley & Jopling		TT	BT* BB BL	LL
OMS	PAUCIBACILARES		MULTIBACILARES	

TT: Tuberculóide-tuberculóide; ***BT:** Borderline-tuberculóide, embora apresente características da forma paucibacilar, operacionalmente tem sido classificada como multibacilar; **BB:** Borderline-borderline; Borderline-lepromatoso e **LL:** Lepromatoso-lepromatoso.

Nas lesões tuberculóides, predomina resposta do tipo *Th1* e citocinas deste padrão, tais como interleucina (IL) 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), entre outras. Essas moléculas estão entre as citocinas mais estudadas e evidências indicam que ambas podem agir sinergicamente impedindo a proliferação bacilar, mas também podem se tornar lesivas ao organismo, causando lesões cutâneas e neurais, na ausência de fatores regulatórios. Nas lesões virchovianas, por outro lado, o padrão de resposta se direciona ao perfil *Th2* e citocinas do tipo 2, como IL-4, IL-5 e IL-10. As formas dimorfas, por sua vez, representam um padrão clínico e imunológico de resposta intermediária, sendo que as citocinas secretadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* podem não estar relacionadas a nenhum padrão já descrito (COSTA *et al.*, 2008).

2.4- Transmissão e Tratamento

A transmissão da hanseníase ocorre por vias aéreas entre pacientes com a doença não tratada para indivíduos susceptíveis. Pacientes que apresentam em seu organismo um grande número de bacilos, chamados multibacilares, são a principal fonte de infecção, sendo os seus contatos domiciliares, independente do gênero, os maiores susceptíveis ao contágio (SALES et al., 2001; NICCHIO et al., 2016). Esses pacientes abrigam grande quantidade de bacilos, tanto nas fossas nasais quanto na pele, e permanecem como fonte de transmissão da doença até que seja instituído o tratamento adequado (LOCKWOOD, 2005; ARAUJO, 2003). A infecção causada por este patógeno apresenta um longo período de latência, o período de incubação entre a exposição e a manifestação clínica da doença pode levar aproximadamente de meses a décadas (MISCH et al., 2010).

A hanseníase manteve-se sem tratamento até o ano de 1940, quando o primeiro medicamento foi desenvolvido, a dapsona, uma droga capaz de curar a doença. Hoje, o tratamento da hanseníase se dá através da poliquimioterapia (PQT), a qual prevê a administração combinada de dapsona, rifampicina e clofazimina em doses e esquemas diferenciados, de acordo com a carga bacilar do paciente. A duração do tratamento é de 6 meses de rifampicina para pacientes paucibacilares e de 12 meses com a combinação das três drogas citadas acima para os pacientes multibacilares. Essa combinação elimina os bacilos, impedindo o paciente de transmitir a hanseníase logo no início do tratamento, garantindo a cura da doença caso o esquema terapêutico seja administrado de forma correta. Caso não seja diagnosticada e tratada no início pode causar incapacidades e deformidades físicas.

2.5- Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é feito pelo exame dermato-neurológico, através do achado de lesões de pele com alteração da sensibilidade. A sensibilidade nas lesões pode estar diminuída (hipoestesia), ausente (anestesia) ou, em menor frequência, aumentada (hiperestesia) (YAWALKAR, 2002). Em alguns casos, a confirmação do diagnóstico requer o uso de exames laboratoriais complementares. Neste caso, a baciloscopia e a histopatologia são os testes mais utilizados. Há ainda outra forma de avaliar a exposição a *M. leprae*, que é

através da detecção de anticorpos contra PGL-1 e LID-1 por ELISA (HUNGRIA *et al.*, 2017). Os níveis de produção de anticorpos contra PGL-1 e LID-1 indicam exposição a *M. leprae* e mostram correlação positiva com a baciloscopia em pacientes multibacilares. Porém, pacientes paucibacilares geralmente são negativos em testes de detecção de anticorpos (MOURA *et al.*, 2008). Dessa forma, esse ensaio pode contribuir para avaliar o nível de exposição dos contatos, auxiliar na classificação dos pacientes e, ainda, no monitoramento da eficácia do tratamento (MOURA *et al.*, 2008).

2.6- Resposta imune a *Mycobacterium leprae*

A polarização da resposta imune específica à *M. leprae* é importante na determinação da forma clínica. Ambas as respostas imunes, inata e adquirida estão envolvidas na defesa contra *M. leprae*. E é a interação inicial entre a micobactéria e a resposta imune inata do hospedeiro que afeta o crescimento inicial e o estabelecimento da infecção, potencialmente influenciando o tipo de resposta imune adaptativa induzida contra a infecção (NATH *et al.*, 2015; FONSECA *et al.*, 2017). A primeira interação entre *M. leprae* e o homem é mediada por receptores de superfície, os *Toll-like receptors* (TLR), que são indispensáveis para o reconhecimento de antígenos pelas células dendríticas e macrófagos (BRIGHTBILL *et al.*, 1999; MENDONÇA *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2017). Dos TLRs que já foram identificados, os heterodímeros TLR2-TLR1, os homodímeros TLR2 e TLR4 parecem ser importantes para o reconhecimento de micobactérias, especialmente o TLR2, que são ativados por lipoproteínas de *M. leprae* (MENDONÇA *et al.*, 2008). A capacidade de iniciar a resposta protetora está diretamente relacionada com a secreção de IL-12/23 promovendo a diferenciação de macrófagos e células dendríticas. Após a ativação inicial pelos peptídeos imunogênicos apresentados no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) por células apresentadoras de antígenos (APC), os linfócitos *Th* simples podem se diferenciar em duas grandes populações de células fenotipicamente distintas, *Th1* e *Th2* (FONSECA *et al.*, 2017; BIEDERMANN *et al.*, 2004). IL-12 é produzida pelos macrófagos ativados e células dendríticas e estimula a produção de Interferon-gamma (IFN- γ) e induz a diferenciação de células *Th* para se tornarem células *Th1* que induz os elementos da resposta imune responsáveis pela eliminação do bacilo,

controlando assim a evolução da doença. As células *Th1* produzem caracteristicamente Interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ ; que induzem a ativação dos macrófagos; e são muito efetivas no controle da infecção contra patógenos intracelulares (BIEDERMANN *et al.*, 2004). Em alguns estudos realizados com *M. tuberculosis*, os TLRs têm sido apontados como necessários para a produção de IL-12, citocina pró-inflamatória responsável pela indução da imunidade celular (*Th1*), assim como de TNF- α , citocina envolvida na ativação celular e formação do granuloma, que também está relacionada com a destruição tecidual associada aos surtos reacionais da hanseníase (MENDONÇA *et al.*, 2008).

As formas clínicas da doença são de acordo com o padrão de resposta estabelecido, resposta imune resistente com predominância de mecanismos de defesa, ou susceptível, com disseminação da doença (GOULART *et al.*, 2002). Os mecanismos de defesa estão ligados à presença das citocinas TNF- α e IFN- γ (FOSS, 1999). Células T que produzem IL-2 e IFN- γ , aumentam a imunidade mediada por células. IFN- γ ativa macrófago e IL-2 estimula a proliferação de células T antígeno-específicas, resultando em doença mais branda ou cura. Os pacientes com a forma tuberculóide da doença apresentam forte resposta imune celular contra *M. leprae*, com poucas lesões e estas bem delimitadas (SILVA, L. M. *et al* 2015). Nesta forma da doença, citocinas como IFN- γ , IL-2, linfotóxina- α e TNF- α são secretadas nas lesões, resultando em intensa atividade fagocítica. IFN- γ tem capacidade de estimular macrófagos a matar ou restringir a proliferação de micobactérias (NATHAN, 1986). IL-2 atua na defesa do hospedeiro, pois tem capacidade de induzir a expansão clonal de células T ativadas e aumentar a produção de IFN- γ (KASAHARA, 1983). TNF- α , outra citocina comum do padrão de resposta *Th1* é capaz de ativar macrófagos para destruição do patógeno intracelular e aumentar os efeitos de IFN- γ (KINDLER, 1989, BERMUDEZ, 1988, SOUZA e PEREIRA, 2007). Macrófagos sofrem influência dessas citocinas e também de linfócitos e formam granulomas bem definido (ROACH *et al.*, 2002). Os linfócitos TCD4+ e TCD8+ são encontrados nas áreas mais interna e externa respectivamente (MODLIN, 1994).

Em contraste, as células *Th2*, tipo de resposta imune predominate em pacientes do polo lepromatoso, secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 como citocinas chave e aumentam a resposta humoral (MODLIN, 1994; GOULART *et al.*, 2002;

BIEDERMANN *et al.*, 2004). Esta forma clínica é caracterizada por pouca formação de granuloma (MENDONÇA *et al.*, 2008; BRITTON e LOCKWOOD, 2004). Ocorre proliferação do bacilo, com a ocorrência de muitas lesões e infiltrações disseminadas na pele e nos nervos (SILVA, L. M. *et al* 2015). Este padrão de resposta contribui para a falha na imunidade celular e na ativação de macrófagos (SIELING e MODLIN, 1992). Na pele destes pacientes, encontra-se macrófagos infectados com muitas bactérias, mas poucos linfócitos TCD4+ e TCD8+, e nenhum granuloma organizado (MODLIN, 1994). A IL-4 bloqueia a proliferação de células T estimuladas por IL-2, inibe a ativação de monócitos mediada por IFN- γ e também a produção de TNF- α . IL-4 pode induzir proliferação bacteriana (SIELING e MODLIN, 1994b). Outra citocina característica do padrão de resposta *Th2*, a IL-10, também é reconhecidamente uma citocina imunossupressora (YAMAMURA, 1991).

Células *Th1*, ao contrário de células *Th2*, podem orquestrar respostas imunes efetivas contra bactérias intracelulares. Portanto, apenas as células *Th1* medeiam respostas imunes que podem controlar a hanseníase (BIEDERMANN *et al.*, 2004). Cursos progressivos de doenças infecciosas provocadas por parasitas intracelulares estão associados com uma resposta imunitária dominada pelas células *Th2*, tanto em humanos como em murinos (YAMAMURA *et al*, 1991). O equilíbrio das respostas *Th1* / *Th2* sozinho, no entanto, não pode explicar completamente a resposta na hanseníase. Outros subconjuntos de células T, como células T reguladoras e *Th17*, foram identificados como tendo papéis importantes na determinação da imunidade do hospedeiro (FONSECA *et al.*, 2017). *Th17* aumenta a resposta de células *Th1* e tem sido associado a um efeito protetor a patógenos intracelulares (SANTOS *et al.*, 2017; TARIQUE *et al.*, 2017).

Em torno de 30-50% dos pacientes podem ocorrer reações no curso da doença. Essas reações são classificadas em dois tipos, reações de Tipo I, também conhecidas como reação de reversão (RR) e reação de Tipo II, conhecida como eritema nodoso hansênico (ENL) (FONSECA *et al.*, 2017). Na RR ocorre uma resposta inflamatória súbita, geralmente no início do tratamento. O ENL, geralmente, é iniciado por deposição de complexos imunes e ativação da cascata do complemento, resultando em vasculite ou uma reação de hipersensibilidade tipo III.

2.7- Susceptibilidade genética a infecção por *M. leprae*

O fenótipo de susceptibilidade à infecção por *M. leprae* é complexo e influenciado por fatores do hospedeiro e do parasita, e também por fatores ambientais, no entanto, alguns estudos têm sugerido fatores genéticos humanos como sendo importantes na aquisição de hanseníase e o curso clínico da doença (CARDOSO *et al.*, 2011). O estudo genético em humanos pode ser baseado em famílias e/ou populações (eticamente combinados em pares de caso-controle), para tanto pode-se analisar marcadores genéticos presentes no gene candidato, como microssatélites e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Onde os alelos polimórficos/mutantes que se encontram em desequilíbrio de ligação podem ser associados com o desenvolvimento dos sintomas clínicos da doença (BLACKWELL, 2001).

Os SNPs constituem o tipo de variação mais comum do genoma humano (COLLINS *et al.*, 1997). Conceitualmente, SNPs correspondem a posições onde ocorrem duas bases alternativas com frequência considerável na população humana (acima de 1%). Embora muitas vezes não haja uma relação direta entre SNPs e o aparecimento de doenças, um número crescente destes tem sido identificado com envolvimento nas bases moleculares de doenças genéticas. Polimorfismos de nucleotídeo únicos podem alterar a ligação dos fatores de transcrição aos sítios promotores dentro dos genes e a quantidade de citocina produzida (VISENTAINER *et al.*, 2008).

Alterações genéticas podem modificar os níveis de transcrição de um gene, ou seja, o polimorfismo pode ocorrer, não apenas em uma região que codifica uma proteína (éxon), como também nas regiões não codificadoras (íntron e região promotora do gene) e, portanto, influenciar a quantidade ou composição da proteína produzida pelo gene (MORAES *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2002). Vários genes têm sido associados à hanseníase e estão envolvidos na susceptibilidade à doença em duas etapas diferentes: a hanseníase *per se* e no desenvolvimento das diferentes formas clínicas (CARDOSO *et al.*, 2011).

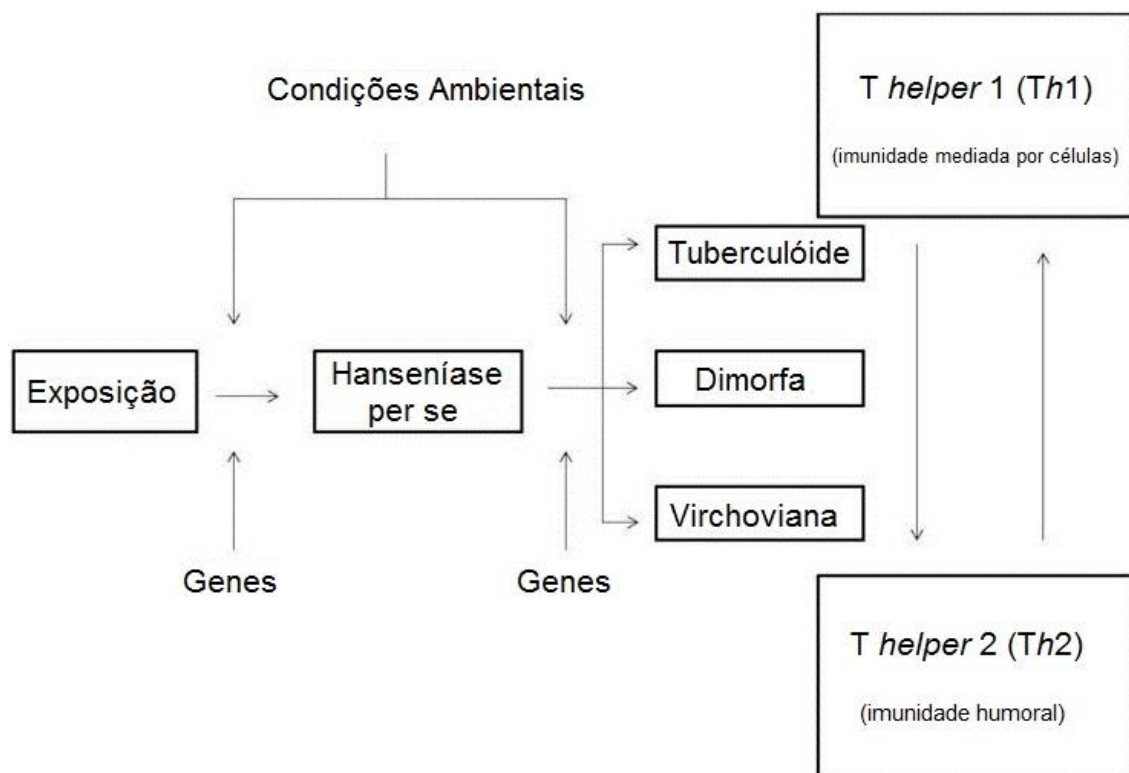


Figura 1: Modelo do espectro de hanseníase baseado em fatores genéticos e ambientais. Extraído e Traduzido de Mazini *et al.*, 2016.

2.8- Genes candidatos ligados a resposta imune

2.8.1- *P2X7*

O gene *P2X7* está localizado no cromossomo 12 (q24O), na posição 121,570,622-121,624,354 (KENT *et al.*, 2012). Esse gene codifica o receptor *P2X7* que é expresso em células hematopoiéticas, mesenquimais, epiteliais e linhagens neurais, que tem um papel crucial na imunidade, inflamação, função neurológica, homeostase óssea, e neoplasia (WU *et al.*, 2015). A ativação de *P2X7* por trifosfato de adenosina (ATP) faz com que ocorra uma abertura imediata de um canal seletivo de cátions, o que permite o influxo de Ca^{2+} e Na^{+} e o efluxo de K^{+} . Este processo resulta na indução da cascata de caspase, apoptose, e a ativação de fosfolipase D. A fosfolipase D promove a fusão do fagossoma-lisossoma e provoca a morte micobacteriana (YI *et al.*, 2014; BAHARI *et al.*, 2013).

P2X7 é altamente polimórfico, com vários polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) que afetam a função deste receptor (BAHARI *et al.*, 2013). Vários estudos relataram SNPs em *P2X7* que resultou em perda ou redução da

função do receptor (TEKIN *et al.*, 2010). Os polimorfismos rs3751143 e rs2393799 foram associados a susceptibilidade à tuberculose numa população chinesa (WU *et al.*, 2015). Bahari e colaboradores em 2013 também demonstraram associação ao aumento da susceptibilidade à tuberculose com o SNP rs2393799 numa população iraniana. No entanto, para esse mesmo SNP, Yi e colaboradores em 2014 não encontraram associação com o aumento da susceptibilidade à tuberculose numa população chinesa. Não existem estudos desses SNPs em população brasileira, como também não foi encontrado estudos de SNPs de *P2X7* associados à hanseníase na literatura científica consultada. Com isso, é pertinente o estudo de associação de SNPs no gene *P2X7* com uma amostra de pacientes infectados com *Mycobacterium leprae* numa população brasileira, visto que hanseníase ainda é endêmica no país.

2.8.2- IFNGR1

O receptor humano de IFNG (IFNGR) é um heterodímero de IFNGR1 e IFNGR2. O gene *IFNGR1* está localizado no cromossomo 6q23.3 (LE CONIAT *et al.*, 1989). Ele tem 3 isoformas diferentes (137,518,620-137,539,651; 137,518,620-137,540,567; 137,524,683-137,540,567) (KENT *et al.* 2002). Defeitos em *IFNGR1* têm sido relatados como uma causa de susceptibilidade mendeliana a doença micobacteriana (LU *et al.*, 2014). A sinalização de IFN- γ é mediada através da ligação ao receptor IFNGR1 e o controle do nível de expressão de IFNGR1 é um dos mecanismos pelos quais as células modulam a potência de sinalização de IFN- γ (LU *et al.*, 2014). Em 2014, Lu e colaboradores foram os primeiros a explorar o polimorfismo no locus da susceptibilidade à tuberculose. O alelo C do SNP rs1327474 foi associado ao aumento de risco a tuberculose em comparação ao alelo T numa população chinesa (LU *et al.*, 2014).

2.8.3- TLR9

Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são efetores chave da resposta inata (RICCI *et al.*, 2010), e também pode ser uma ponte para vias de resposta adaptativa do sistema imunológico (BAFICA *et al.*, 2005). PRRs

reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogênicos conservados evolutivamente (PAMPs) e o reconhecimento de PAMP desencadeia a ativação das vias de transdução de sinal e respostas efetoras a jusante. Receptores semelhantes a Toll (TLRs) foram os primeiros PRRs de mamíferos descobertos e 10 genes de TLR foram identificados em seres humanos. Cada TLR reconhece PAMPs específicos de fungos, bactérias, vírus e/ou parasitas (BEIMA-SOFIE *et al.*, 2013). TLR9 reconhece ilhas CpG não metiladas (agem como imunoestimulantes) no DNA de bactérias e vírus (BEIMA-SOFIE *et al.*, 2013). A estimulação da via de TLR9 por ilhas CpG não metiladas induz a produção de CXCL8 por neutrófilos por meio da geração de peroxinitrito (ONOO^-) (MORTAZ *et al.*, 2015).

O gene *TLR9* se localiza no cromossomo 3 (p21.3) (GRAUSTEIN *et al.*, 2015). O gene possui 3 transcritos diferentes com as seguintes posições 52,255,095-52,260,179; 52,255,095-52,265,247; 52,257,935-52,263,798 (KENT *et al.* 2002). Os resultados de Peixoto-Rangel e colaboradores, em 2009, indicam uma forte associação entre o SNP rs352140 de TLR9 e doença ocular associada a infecção por *Toxoplasma gondii* numa população do norte fluminense.

Nos seres humanos, as variantes genéticas de *TLR9* têm sido associados com a progressão do HIV, bem como de forma mais ampla, com asma, lúpus eritematoso sistêmico (LES), e aterosclerose. TLR9 foi demonstrado ser um importante regulador da resposta de citocinas mediada por *Th1* (GRAUSTEIN *et al.*, 2015). Modelos em animais sugerem um papel para TLR9 em infecção micobacteriana. Camundongos *TLR9*^{-/-} reduziram os níveis de IFN- γ e IL-12 e apresentaram aumento dos níveis de citocinas *Th2* como IL-4, IL-5 e IL-13 durante a formação de um granuloma pulmonar, em comparação com camundongos controles (GRAUSTEIN *et al.*, 2015).

2.8.4- CCR5

O gene *CCR5* codifica uma proteína membro da superfamília de receptores de 7 domínios transmembranares acoplados à proteína G (GPCR), agrupado a uma subclasse que engloba todos os receptores de quimiocinas e promovem o movimento celular por quimiotaxia (OPPERMANN 2004;

LEDERMAN *et al.*, 2006). Os receptores de quimiocinas são capazes de mediar o recrutamento e quimiotaxia de leucócitos em função do gradiente de concentração de seus ligantes beta das proteínas das membranas integrais e são importantes na resposta inflamatória. O receptor CCR5 é expresso em várias células do sistema imune, como linfócitos T efetores e de memória, linfócitos T CD4+ Th1, células NK, monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas, células de Langerhans e basófilos (LEDERMAN *et al.*, 2006).

É especialmente conhecido por ser um co-receptor importante para o vírus HIV entrar nas células hospedeiras (DENG *et al.*, 1996; OPPERMANN 2014). Um polimorfismo alélico neste gene resulta em alelos funcionais e não funcionais. A variante $\Delta 32$ deste gene foi associada à resistência à infecção pelo HIV, o alelo em homozigose confere proteção, enquanto o heterozigoto tarda a progressão da doença (HUANG *et al.*, 1997). CCR5 também foi associado a dengue (MARQUES *et al.*, 2015), foi observado que camundongos CCR5 deficientes eram resistentes a infecção por DENV, pois CCR5 é um fator hospedeiro necessário para a replicação do vírus e o desenvolvimento da doença (MARQUES *et al.*, 2015). A expressão de CCR5 também desempenha um papel na distribuição de células efectoras em locais de infecção microbiana onde podem contribuir para controle e/ou eliminação microbiana. Pouco se sabe do mecanismo de ação do CCR5 na imunopatologia da hanseníase, no entanto, CCR5 influencia numa resposta imune celular efetiva, resposta esta primordial para eliminação do *M. leprae*, com isso estudos relacionando CCR5 e hanseníase parecem ser pertinentes.

3- JUSTIFICATIVA

Várias doenças infecciosas têm assolado a humanidade ao longo da história. As infecções foram responsáveis por uma forte pressão seletiva, porém algumas delas são, ainda hoje, grandes problemas de saúde pública, dentre as quais podemos destacar a hanseníase (WHO, 2015). Avanços recentes, como o desenvolvimento de vacinas e antibióticos, combinados com um aumento geral da educação e nível socioeconômico das populações humanas, levaram a um aumento da expectativa de vida, mas não a erradicação de doenças infecciosas. Para entender este cenário, é necessário considerar uma interação muito complexa entre os fatores ambientais (microbianos e não microbianos) e humanos (genéticos e não genéticos) que determinam a imunidade à infecção e/ou seu desfecho clínico (CASANOVA e ABEL, 2015). Neste contexto, a hanseníase apresenta-se como um modelo muito bom para o estudo da predisposição genética à infecção, visto que seu agente etiológico, *M. leprae*, é conhecido por sua limitada diversidade de cepas oriundas de diferentes locais (MONOT *et al.*, 2009; TRUMAN *et al.*). Esta característica clonal das cepas, juntamente com a observação de que a exposição a micobactéria nem sempre resulta em infecção, e quando resulta pode apresentar um amplo espectro clínico, tem induzido pesquisadores da área a pensar que em um estágio inicial, um primeiro grupo de genes confere suscetibilidade à infecção *per se*. Dentre os indivíduos que desenvolvem a doença, um segundo grupo de genes determina o tipo de resposta imune do hospedeiro e, conseqüentemente, o subtipo clínico da hanseníase. E por último, um terceiro grupo de genes confere o risco de desenvolvimento dos tipos reacionais da hanseníase (SAUER *et al.*, 2015). Assim, o estudo de variantes genéticas ligadas à resposta imune contra hanseníase pode auxiliar no esclarecimento da etiologia desta doença, bem como de sua diversidade clínica, apontando mais genes potencialmente envolvidos nesses grupos.

4- OBJETIVOS

4.1- Geral

Visando contribuir com a etiologia da hanseníase e seus espectros clínicos, este trabalho teve como objetivo estimar, em estudo caso-controle, as possíveis associações de risco entre polimorfismos em genes candidatos importantes na modulação da resposta imune frente à infecção por *M. leprae* numa amostra populacional de Campos dos Goytacazes.

4.2- Específicos:

- Recrutar pacientes portadores de hanseníase com diferentes espectros clínicos da doença e indivíduos saudáveis;
- Determinar as frequências dos polimorfismos *TLR9*_rs352140; *IFNGR1*_rs1327474; *P2X7*_rs1718119, *P2X7*_rs3751143 e *CCR5*_rs333 (*CCR5*delta32) no grupo amostral;
- Relacionar os polimorfismos presentes nos genes candidatos com a manifestação da hanseníase *per se* e/ou com as diferentes formas clínicas da hanseníase, por meio de associações alélicas em pacientes afetados e controles saudáveis.

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Sujeitos da Pesquisa

O cálculo do número de amostras foi estimado utilizando uma relação de caso por controle de 1:1. Um total de 239 casos e 239 controles são suficientes para detectar um *odds ratio* (OR) de 0,30 com 80% de poder e um α de 0.05 (95%), assumindo a frequência de soropositividade para o antígeno PGL-I de pelo menos 9% no grupo controle. Os indivíduos deste trabalho foram provenientes de dois grupos: 1) Grupo caso: pacientes portadores de diferentes formas clínicas da hanseníase (virchowiana, tuberculóide, dimorfa e indeterminada), oriundos do Programa Municipal de Controle da Hanseníase, pertencente à Secretaria Municipal de Saúde do Município de Campos dos Goytacazes, o qual funciona como centro de referência regional para diagnóstico e tratamento da doença. Este ambulatório recebe pacientes encaminhados de instituições de saúde públicas e privadas. Os pacientes portadores da hanseníase que foram selecionados para o estudo foram diagnosticados e acompanhados pelo médico dermatologista Dr. Edilbert Pellegrini Nahn Jr., colaborador neste projeto; e classificados segundo a classificação de Madri; 2) Grupo controle: os indivíduos do grupo controle foram provenientes do hemocentro do Hospital Ferreira Machado, o qual pertence a rede pública de saúde do município de Campos dos Goytacazes. Participaram deste estudo ao todo 422 indivíduos, dentre pacientes e controles no período de 2007 a 2008 e 2015 a 2017.

Todos os indivíduos diagnosticados como portadores de alguma das formas clínicas da hanseníase acima citadas que se apresentaram para consultas no ambulatório de hanseníase do HGG foram convidados a participar da pesquisa. Tomando-se como base a adesão voluntária ao projeto a resolução CNS 466/2012 e dados de prevalência da hanseníase no município de Campos dos Goytacazes. As amostras foram selecionadas por conveniência consecutiva a partir do início das atividades do projeto até que a meta amostral fosse alcançada. O mesmo critério de seleção adotado para as amostras caso foram utilizado para as amostras controles, isto é, as amostras foram selecionadas por conveniência consecutiva a partir do início do estudo. As amostras de indivíduos

controle foram selecionadas a partir do convite àqueles doadores de sangue do hemocentro do Hospital Ferreira Machado.

Todos os indivíduos voluntários no estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e sobre sua forma de participação, mediante leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 1**). O termo foi redigido segundo as regras da resolução CNS 466/2012, exigida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Campos (CEP).

5.2- Análise *in silico*: Identificação dos SNPs e desenho dos iniciadores

A identificação dos SNPs dos genes analisados foi feita a partir de busca no PUBMED/MEDLINE a partir da combinação das palavras chaves: infectious diseases + hansen's disease + leprosy + tuberculosis + *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis*. Os SNPs com correlação significativa ($p < 0,05$) entre pacientes com doença de Hansen e controles citados nos artigos foram selecionados.

Os SNPs citados nos artigos foram preliminarmente selecionados a partir da frequência alélica menor (MAF) maior que 0,10 disponível no SNPdb (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Para isso foram utilizadas como referências as populações europeias (CEU) e africanas (YRI) devido à serem os principais contribuintes genéticos da população do Norte Fluminense.

Tabela 2: Descrição dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP) selecionados nos genes alvos.

Gene	SNP	HapMap MAF CEU ^a	HapMap MAF YRI ^b	MAF Geral	Alelo de Referência	Consequência Funcional
<i>TLR9</i>	rs352140	0.477 (T)	0.305 (T)	T:0.4155	C/T	exon 2 synonymous codon
<i>P2X7</i>	rs1718119	0.442 (T)	0.482 (T)	A:0.3225	C/T	missense
	rs3751143	0.176 (G)	0.092 (G)	C:0.2075	G/T	missense
<i>IFNGR1</i>	rs1327474	0.398 (G)	0.030 (G)	C:0.2055	A/G	upstream variant

^aCEU: Moradores de Utah, com ascendência europeia ocidental ou nórdica;

^bYRI: Moradores de Ibadan, Nigéria. Pertencentes à etnia Iorubá.

Os iniciadores específicos para a detecção das variantes alélicas foram desenhados utilizando-se sequências depositadas no GenBank

(www.ncbi.nlm.nih.gov) e no banco de dados da Universidade da Califórnia Santa Cruz – UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) e posteriormente confeccionados no site Thermofisher (<http://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageid=9716>). Foi verificado o potencial de formação de grampios e auto complementariedade entre os pares de iniciadores através da ferramenta *OligoCalc – Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Foram utilizadas as ferramentas on-line *In Silico* PCR UCSC (<https://genome.ucsc.edu>) e Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para avaliar a complementariedade específica de cada par de iniciadores as regiões de interesse.

Tabela 3: Desenho de iniciadores para o Sequenciamento de Extensão de um Único Nucleotídeo e QF-PCR.

Gene	SNP	PRIMER	PB
TLR9	rs352140	AAGCTGGACCTCTACCACGA <i>Forward</i>	177
		TTGGCTGTGGATGTTGTTGT <i>Reverse</i>	
		TTTTTTTTTTTTTTTCACTCATTACGGAGCTACC	35
P2X7	rs1718119	TACATCGGCTCAACCCTCTC <i>Forward</i>	303
		CCATGTCTTGGTGTCTCTGTG <i>Reverse</i>	
		TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCTGCATTCTCCCCAGGCC	40
	rs3751143	CTCCCATCTCAACTCCCTGA <i>Forward</i>	131
		AGGAAGTGCAGGACGTGTCT <i>Reverse</i>	
		TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGCCACAGGTGCCTGGAGG	50
IFNGR1	rs1327474	ACATTGCGATGTTTGAGCAC <i>Forward</i>	307
		TCAAAGCCATTTCCAGTCC <i>Reverse</i>	
		TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATGAGAGGCTGCCT	45
CCR5	rs333	ACCTGCAGCTCTCATTTTCC <i>Forward</i>	
		GCCTGTGCCTCTTCTTCTCA <i>Reverse</i>	

5.3- Coleta de Sangue e Extração de DNA

Volume equivalente a 4 ml de sangue foi coletado à vácuo de cada indivíduo, em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio e armazenado em temperatura -20 °C até o uso. O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue seguindo o protocolo determinado pelo fabricante do kit de extração e purificação de DNA genômico *Illustra blood genomicPrep*, GE Healthcare, UK™.

5.3 - Quantificação do DNA

Para a quantificação do DNA extraído foi utilizado o *Thermo Scientific NanoDrop 2000c* (*Thermo Fisher Scientific*). A concentração de DNA foi determinada por medição da absorbância das amostras a 260nm, 280nm e 230nm. A concentração e pureza das amostras de DNA foram estimadas pelas seguintes razões: $A[260] / A[280]$ e $A[260] / A[230]$, no qual o mais puro DNA foi considerado estar próximo a 1.8 e 1.2, respectivamente. Após a quantificação as amostras foram estocadas à -20°C.

5.4- PCR-Multiplex

As amostras de DNA de todos os indivíduos foram amplificadas para o Sequenciamento por Extensão de um Único Nucleotídeo dos SNPS *IFNGR1_rs1327474*, *P2X7_rs3751143*, *P2X7_rs1718119*, *TLR9_rs352140*, em um único tubo (ensaio multiplex). A amplificação foi realizada com a seguinte concentração dos reagentes para um volume final de 12,5 uL: 2mM MgCl₂; 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl; 20pM do par de primer rs352140, 10 pM do par de primer rs1718119, 40pM do par de primer rs3751143, 10pM do par de primer rs1327474 e 30ng/uL de DNA genômico. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp® 9700 ou Veriti® 96-Well VeriFlex (*Applied Biosystems*™) sob as seguintes condições: 94°C por 10min; 35 ciclos à 94°C por um minuto, 70°C por um minuto, 72°C por um minuto; e 72°C por 10 minutos.

5.5- Gel de Agarose

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%. Reagente de agarose (Sigma) foi dissolvido em tampão TBE 1X (0,44M Tris-HCl; 0,44M H₃BO₃; 10mM EDTA) por aquecimento e, então, o “GelRed” (Biotium) foi adicionado em uma proporção de 3uL para cada 100 mL de volume de gel. Para 5uL de amostras foi adicionado 1uL de tampão de amostra 6x e corrido por uma hora a 90 v. As amostras foram visualizadas utilizando o programa *ImageLab* do fotodocumentador (*BioRad*).

5.7- Sequenciamento por Extensão de um Único Nucleotídeo

Para a determinação do perfil alélico, os fragmentos gerados por PCR foram purificados, com uma mistura de 0,4U de Exonuclease I e 1U de Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Para cada alíquota de 3uL dos produtos amplificados foram utilizados 1,5uL da mistura de enzimas e 0,5uL da solução tampão. As reações foram realizadas sob a seguinte condição térmica: 37°C por 1 hora e 75°C por 15 minutos no termociclador GeneAmp® 9700.

Após a purificação, o Sequenciamento por Extensão de um Único Nucleotídeo foi usado para genotipar os SNPs *IFNGR1_rs1327474*, *P2X7_rs3751143*, *P2X7_rs1718119*, *TLR9_rs352140*. Essa reação envolve a extensão de um iniciador para minisequenciamento para cada alvo, desenhada para se ligar adjacientemente ao SNP de interesse. Após a ligação do iniciador com a região em que o SNP está localizado um dos quatro dideoxinucleotídeos marcados fluorescentemente (Verde-Alelo A-ddNTP-dR6G, Amarelo - Alelo T - ddCTP-dTAMRA, Azul – Alelo G - ddGTP-dR110 e Vermelho – Alelo A - ddTTP-dROX) irá complementar a base encontrada no sítio do SNP. Essa reação é realizada em um volume final de 5 uL sob as seguintes condições: 2 uL dos produtos amplificados purificados, 2,5 µL do kit *SNaPshot reaction mix* e 0,5µL da mistura de iniciadores de minisequenciamento a 2pM cada. As reações de Sequenciamento por Extensão de um Único Nucleotídeo foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 sob as seguintes condições: 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 30 segundos.

Após isso, uma nova etapa de purificação foi realizada, aos produtos de Sequenciamento por Extensão de um Único Nucleotídeo foram adicionados 0,3U da enzima SAP, as reações foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 sob as seguintes condições: 37°C por 30 min. Alíquotas de 0,54uL dos produtos foram adicionados a uma mistura de 9,45uL de formamida (Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) e 0,1 uL de *GeneScan 120LIZ Size Standard* (Applied Biosystems) e submetidas à eletroforese em capilar utilizando a plataforma *ABI 310 Applied Biosystems* calibrada com a *Matriz Standard Set DS-02 Applied Biosystems*.

Esses iniciadores extendidos fluorescentemente são então separados por meio de um sistema de eletroforese capilar no ABI 310 na presença de um padrão de peso molecular também marcado fluorescentemente (Laranja - LIZ

120, Applied Biosystems). Os perfis alélicos gerados foram visualizados na plataforma GeneMapper ID v3.2 *Applied Biosystems*.

5.8- Genotipagem por QF-PCR

O polimorfismo CCR5Δ32 foi genotipado por PCR quantitativa por fluorescência (QF-PCR). As condições da reação foram: 2mM MgCl₂; 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl; 30ng/uL de DNA, 20 pM do par de primer rs333; volume final de 12,5 μL. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp® 9700 ou Veriti® 96-Well VeriFlex (*Applied Biosystems*™) sob as seguintes condições: 94°C por 10min; 28 ciclos a 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto; e 72°C por 10 minutos. Alíquotas de 0,54uL dos produtos foram adicionados a uma mistura de 9,45uL de formamida (Hi-Di Formamide (*Applied Biosystems*)) e 0,1 uL de *GeneScan 500LIZ Size Standard* (*Applied Biosystems*) e submetidas à eletroforese em capilar utilizando a plataforma ABI 310 *Applied Biosystems* calibrada com a *Matriz Standard Set DS-02* *Applied Biosystems*. Os perfis alélicos gerados foram visualizados na plataforma GeneMapper ID v3.2 *Applied Biosystems*.

5.9- Análises Estatísticas

As frequências alélicas e a taxa de heterozigose observada (H_o) foram calculadas com o uso do programa livre PowerStats. A heterozigose esperada

(H_E) foi estimada com a fórmula
$$H_E = \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right).$$

Para as análises de associação, foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se o teste qui-quadrado. Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95%. Estas análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software GraphPadPrism 5.0 para Windows*, *GraphPad Software, San Diego California USA*.

Genótipos do grupo controle foram usados para teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (*EHW*) para cada SNP, calculados pelo programa *GeneAEx*. Desvio do equilíbrio era considerado se valores de p fossem menores que 0,05.

6- RESULTADOS

6.1- Casuística do Estudo

Ao todo foram recrutados para o estudo 422 indivíduos, sendo 211 Caso e 211 controles. As quatro formas clínicas de Hanseníase (Grupo Caso) foram encontradas no nosso estudo (**Figura 2**). Dentre os pacientes, 137 são do sexo masculino, compreendendo 65% do valor total de indivíduos com a doença. A média de idade encontrada entre os pacientes foi de 45,17 (**Tabela 4**).

Nos indivíduos doadores de sangue (grupo controle), 137 amostras são do sexo masculino e a média de idade dos indivíduos controle foi de 36,97. A média de idade não foi pareada nos dois grupos, pois o perfil da população doadora de sangue é uma população adulta com idade mínima para doação de sangue de 18 anos e também apresenta um número reduzido de idosos (**Tabela 4**).

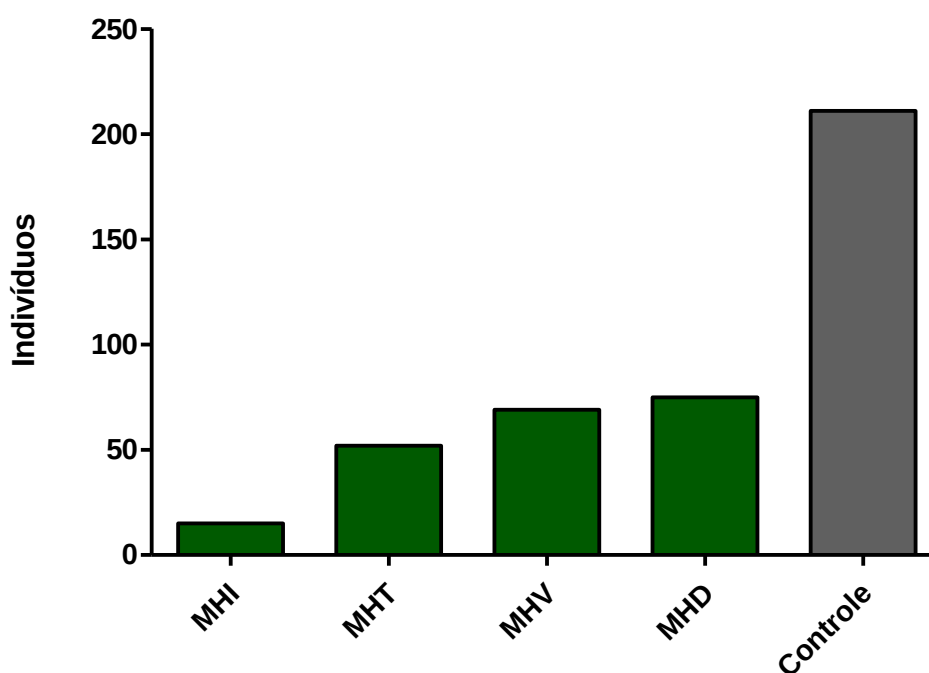
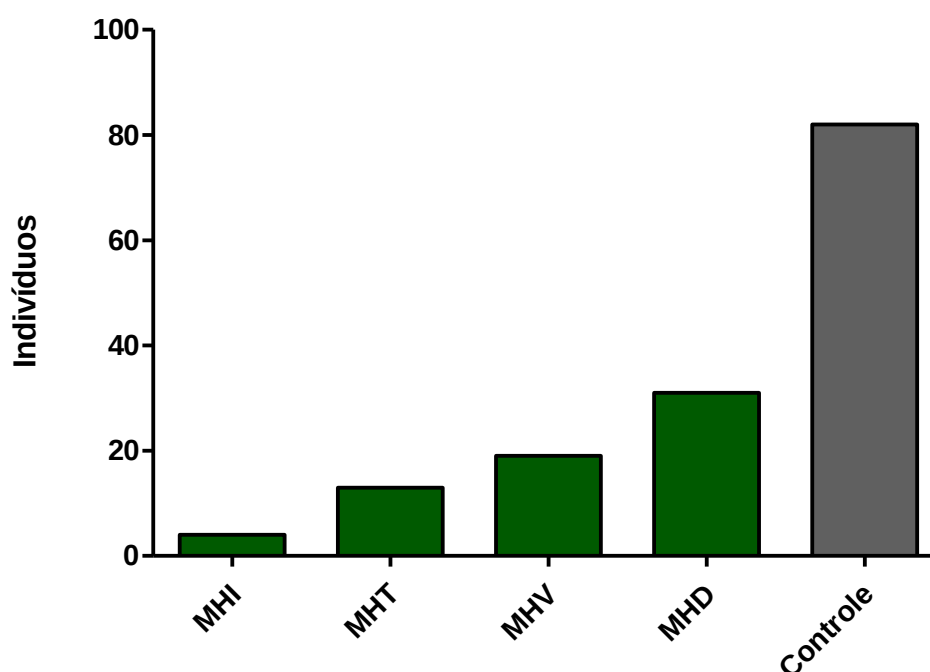


Figura 2: Distribuição numérica dos indivíduos participantes do estudo.

Tabela 4: Características gerais dos indivíduos participantes da pesquisa.

Variáveis	Hanseníase n (%)	Controle n (%)
<i>Sexo</i>		
Homens	137 (65 %)	137 (65%)
Mulheres	74 (35%)	74 (35%)
<i>Idade</i>		
Média	45,09	36,97
Idade mínima	10	19
Idade máxima	93	69

Dos 422 indivíduos recrutados para este estudo, 149 destes foram genotipados. Sendo 67 amostras do grupo Caso e 82 do grupo Controle. A forma clínica majoritária foi a MHD seguida da MHV, MHT e por último MHI (**Figura 3**).

**Figura 3: Distribuição numérica dos indivíduos genotipados no estudo.**

Nas amostras genotipadas, o grupo controle não segue a mesma proporção de homens e mulheres comparados ao grupo caso (**Tabela 5**). A média de idade nos grupos genotipados caso e controle (**Tabela 5**) segue a mesma proporção do total de sujeitos da pesquisa (**Tabela 4**).

Tabela 5: Características gerais dos indivíduos da pesquisa que foram sequenciados.

Variáveis	Hanseníase n (%)	Controle n (%)
<i>Sexo</i>		
Homens	40 (60 %)	71 (87%)
Mulheres	27 (40%)	11 (13%)
<i>Idade</i>		
Média	49,53	37,83
Idade mínima	13	19
Idade máxima	89	66

6.2- Genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)

Para esse projeto, foi desenvolvido um ensaio multiplex, em que em um único tubo, é possível identificar os marcadores rs352140, rs1718119, rs1327474 e rs3751143. Através desse multiplex Caso e Controles (149 sujeitos da pesquisa) foram genotipados (**Figura 4**).

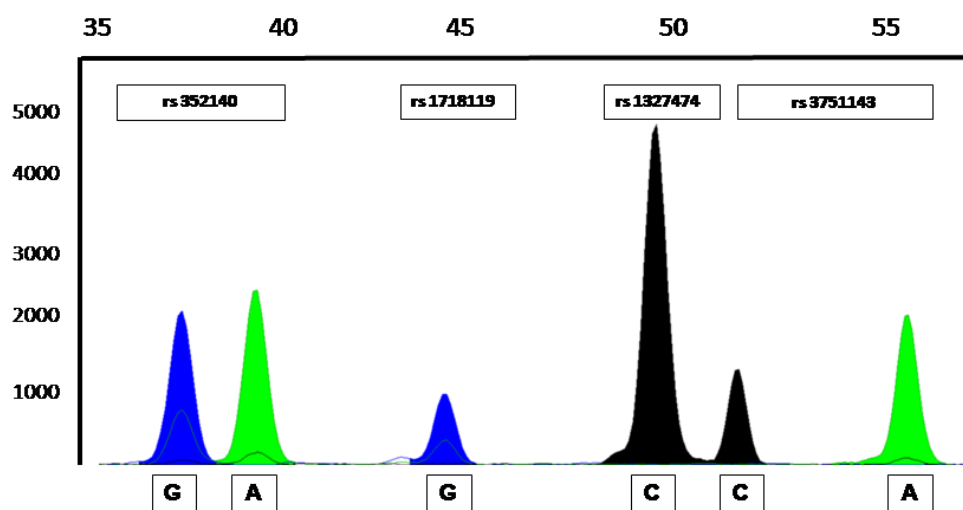


Figura 4: Eletoferograma representativo dos perfis alélicos obtidos por sequenciamento por extensão de único nucleotídeo em multiplex. A amostra do sujeito da pesquisa do grupo caso H26 possui os seguintes genótipos rs352140-G/A, rs1718119-G, rs1327474-C, rs3751143-C/A.

As frequências alélicas obtidas, através da genotipagem desses marcadores na nossa população alvo, foram comparadas com as da população CEU, com ascendência europeia e da população YRI, os lorubás africanos como é mostrada na **Tabela 6**.

Os marcadores P2X7_rs3751143 e TLR9_rs352140 foram genotipados nos 149 indivíduos. O marcador P2X7_rs1718119 foi genotipado apenas no grupo Caso. Em relação ao SNP IFNGR1_rs1327474 apesar de no SNPdb a frequência do alelo polimórfico C ser menos frequente (MAF: 0,2) todas as amostras são homozigotas para o alelo C. Acreditamos que este fato tenha acontecido devido a falhas no reconhecimento do alelo T durante as genotipagens. Devido a essas intercorrências na genotipagem dos marcadores P2X7_rs1718119 e IFNGR1_rs1327474, não puderam ser realizadas análises estatísticas de associação desses marcadores com a doença e sua severidade.

Tabela 6: Frequências alélicas para os marcadores *TLR9_rs352140*, *P2X7_rs3751143*, *P2X7_rs1718119* dos indivíduos de Campos dos Goytacazes, comparadas às frequências alélicas no CEU e YRI.

SNP	Alelos	Frequência alélica em Campos/RJ	Frequência alélica CEU	Frequência alélica YRI
<i>TLR9_rs352140</i>	A	0,43	0,47	0,3
	G	0,57	0,53	0,7
<i>P2X7_rs3751143</i>	A	0,68	0,83	0,91
	C	0,31	0,17	0,09
<i>P2X7_rs1718119</i>	A	0,26	0,44	0,48
	G	0,74	0,56	0,52
<i>IFNGR1_rs1327474*</i>	T	-	0,61	0,97
	C	1	0,39	0,03

*Falha no reconhecimento do alelo T.

6.2.1- Associação de *P2X7_rs3751143* com a severidade da doença

O marcador rs3751143 do gene *P2X7* possui o alelo polimórfico C menos frequente que o alelo A (**Tabela 6**). Essa diferença entre os alelos também é reproduzida nas populações CEU e YRI. No entanto, a população de Campos apresenta uma frequência maior deste alelo (0,31) em comparação à CEU (0,17) e YRI (0,09). A taxa de Heterozigose observada foi de 0,37 ($H_E=0,43$) na amostragem de Controle, enquanto no grupo Caso a taxa de Heterozigose observada foi de 0,24 ($H_E=0,44$). Este marcador na população controle se encontra em equilíbrio Hardy-Weinberg ($p=0,286$).

A fim de observar se havia associação do *P2X7_rs3751143* com a hanseníase *per se*, observou-se as frequências alélicas do grupo Controle e Caso, independente do tipo clínico. No entanto, não houve diferença estatística significativa para esta análise, indicando que esse SNP provavelmente não esteja contribuindo para a manifestação da hanseníase *per se* na nossa população (**Tabela 7**).

Tabela 7: Análises de associação genética do polimorfismo rs3751143 em uma amostragem das populações caso e controle.

<i>P2X7_rs3751143</i>				
	Hanseníase	Controle	OR (IC95%)	P
A	83	113	0,9137 (0.5545-1.505)	0,723
C	41	51		

OR: Odds Ratio (razão de chance), IC: Intervalo de Confiança.

Para avaliar a influência do polimorfismo *P2X7_rs3751143* na gravidade da doença, foi comparado a frequência alélica do grupo controle em relação às formas clínicas na classificação de Madri. Foi encontrada significância estatística somente entre controles e MHI, indicando que indivíduos carreadores do alelo polimórfico C em homozigose apresentam maior predisposição para a forma clínica MHI em relação aos controles (**Tabela 8**).

Tabela 8: Análises de associação genética do polimorfismo *P2X7_rs3751143* comparando controle e as formas clínicas da Hanseníase na classificação de Madri.

	MHT	Controle	OR (IC95%)	P	MHV	Controle	OR (IC95%)	p
C	9	51	1,329 (0.5458-3.238)	0,5297	9	51	0,7976 (0.3476-1.831)	0,5931
A	15	113			25	113		
	MHI	Controle	OR (IC95%)	P	MHD	Controle	OR (IC95%)	p
C	6	51	15,35 (1.840-128.0)	0,001**	17	51	0,8760 (0.4565-1.681)	0,6903
A	0	113			43	113		

OR: Odds Ratio (razão de chance), IC: Intervalo de Confiança.

Devido ao número amostral pequeno quando se estratificou o grupo Caso em quatro subgrupos segundo a classificação de Madri existe a possibilidade do erro amostral do tipo I. Com o objetivo de esclarecer melhor o papel do alelo polimórfico C na gravidade da doença, também foi realizada outra análise estatística para esse marcador, dessa vez considerando-se a classificação da OMS. Nessa análise, o grupo Caso foi estratificado em 2 grupos: paucibacilares

e multibacilares, de menor e maior gravidade da doença, respectivamente. Observou-se que indivíduos carreadores do alelo polimórfico C apresentam 2,65 vezes mais chance de serem paucibacilares comparado aos multibacilares. Tanto na estratificação utilizando a classificação de Madri ou a classificação da OMS o polimorfismo P2X7_rs3751143 teve associação na manifestação das formas clínicas mais brandas da doença (**Tabela 9**).

Tabela 9: Análises de associação genética do polimorfismo P2X7_rs3751143 comparando as formas clínicas da Hanseníase segundo a classificação da OMS.

	PB	MB	OR (IC95%)	P
C	15	26	2,65	0,0235 *
A	15	68	(1,122-6,09)	

OR: Odds Ratio (razão de chance); IC: Intervalo de Confiança; PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar

Como verificamos que o marcador P2X7_rs3751143 estava ligado à manifestação da forma clínica MHI comparado a controles e dentre os pacientes estava associada à manifestação mais branda da doença (paucibacilares), fomos observar se havia associação significativa entre os pacientes quando esses eram agrupados segundo a classificação de Madri: MHI, MHT, MHV e MHD (**Tabela 10**). Observamos que pacientes que carregam o alelo C polimórfico tem 11,2 vezes mais chance de desenvolver a forma clínica MHI em comparação à forma clínica MHT. Do mesmo modo, pacientes que portam o alelo C polimórfico apresentam 17,11 vezes mais chance de desenvolver a forma clínica MHI do que MHD. E com uma relação mais forte, 18,2 vezes mais chance de desenvolver MHI em relação à MHV. Esses dados corroboram com os anteriores, revelando que este polimorfismo está associado à manifestação mais branda da hanseníase MHI na nossa população de estudo.

Tabela 10: Análises de associação genética do polimorfismo P2X7_rs3751143 comparando a forma clínica MHI às outras formas clínicas da Hanseníase na classificação de Madri.

	MHI	MHT	OR (IC95%)	P
C	6	9	11,20 (1.193-105.2)	0,0153*
A	0	15		
	MHI	MHD	OR (IC95%)	P
C	6	43	17,11 (1,961-149,3)	0,0012 **
A	0	17		
	MHI	MHV	OR (IC95%)	P
C	6	9	18,2 (1,978-167,4)	0,0017 **
A	0	25		

OR: Odds Ratio (razão de chance), IC: Intervalo de Confiança.

6.2.2- Associação de *TLR9_rs352140* com a manifestação da forma clínica MHT

Para o polimorfismo rs352140 do gene *TLR9* pôde-se observar que nessa população o alelo menos frequente do SNP *TLR9_rs352140* foi o alelo polimórfico A, com frequência de 0,43. Comparada essa frequência às frequências das populações CEU e YRI (**Tabela 6**), 0,47 e 0,3, respectivamente, a frequência desse alelo na população de Campos se assemelha mais àquela frequência encontrada na população CEU.

A taxa de heterozigose observada para esse marcador foi de 0,39 ($H_E=0,43$) no grupo Controle e uma taxa de heterozigose observada de 0,37 ($H_E=0,48$) na amostragem populacional de indivíduos portadores de hanseníase. Este marcador se encontra em equilíbrio Hardy-Weinberg no grupo Controle ($p=0,051$). Foi realizada análise de frequência alélica comparando os grupos Caso e Controle para verificar a influência do marcador *TLR9_rs352140* na manifestação da doença *per se*. Observou-se uma tendência de proteção nos indivíduos carreadores do alelo polimórfico G (**Tabela 11**). Dizemos que é uma tendência, pois o valor de p e o intervalo de confiança deram muito próximo ao ponto de corte de significância.

Tabela 11: Análises de associação genética do polimorfismo *TLR9_rs352140* nos grupos Caso e Controle.

	Hanseníase	Controle	OR (IC95%)	P
G	39	88	0,6 (0.3607-1.003)	0,0505
A	56	76		

OR: Odds Ratio (razão de chance), IC: Intervalo de Confiança.

Com o objetivo de verificar a associação do marcador TLR9_rs352140 com a manifestação da doença, foi realizada análise estatística comparando as formas clínicas (MHI, MHT, MHD, MHV) ao grupo Controle. Observou-se associação somente entre o grupo Controle e a forma clínica MHT, sugerindo que indivíduos carreadores do alelo polimórfico G tem menor risco de ter a forma clínica MHT (**Tabela 12**). De outro modo, não teve diferença estatística significativa quando o grupo Controle foi comparado com a estratificação das formas clínicas realizadas de acordo com a classificação da OMS (**Tabela 13**).

Tabela 12: Análises de associação genética do polimorfismo TLR9_rs352140 comparado controles e as formas clínicas na classificação de Madri.

	MHT	Controle	OR (IC95%)	P	MHV	Controle	OR (IC95%)	P
G	6	88	0,3239	0,0201*	16	88	0,7677	0,4831
A	16	76	(0.1207-0.8694)		18	76	(0.3662-1.609)	
	MHI	Controle	OR (IC95%)	P	MHD	Controle	OR (IC95%)	P
G	4	88	1,727	0,53	13	88	0,5614	0,1347
A	2	76	(0.3077-9.698)		20	76	(0.2618-1.204)	

OR: Odds Ratio (razão de chance); IC: Intervalo de Confiança;

Tabela 13: Análises de associação genética do polimorfismo TLR9_rs352140 comparando controle e as formas clínicas da Hanseníase na classificação usada pela OMS.

	PB	Controle	OR (IC95%)	p	MB	Controle	OR (IC95%)	p
G	10	88	0,4798	0,0792	29	76	0,6591	0,1524
A	18	76	(0.2088-1.102)		38	88	(0.3718-1.169)	

OR: Odds Ratio (razão de chance); IC: Intervalo de Confiança; PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar

Nas associações realizadas entre as formas clínicas entre si da hanseníase, tanto na classificação de Madri quanto na classificação da OMS, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes (**Tabelas 14 e 15**).

Tabela 14: Análises de associação genética do polimorfismo rs352140 comparando controle e as formas clínicas da Hanseníase na classificação de Madri.

	MHT	MHV	OR (IC95%)	P	MHT	MHD	OR (IC95%)	P
G	6	16	0,4218	0,187	6	13	0,5759	0,3544
A	16	18	(0.1329-1.339)		16	20	(0.1791-1.859)	
	MHT	MHI	OR (IC95%)	p	MHV	MHD	OR (IC95%)	P
G	6	4	0,1875	0,0742	16	13	1,368	0,5267
A	16	2	(0.02695-1.305)		18	20	(0.5182-3.609)	
	MHV	MHI	OR (IC95%)	p	MHD	MHI	OR (IC95%)	P
G	16	4	0,4444	0,3758	13	4	0,3250	0,2153
A	18	2	(0.07154-2.761)		20	2	(0.05183-2.038)	

OR: Odds Ratio (razão de chance), IC: Intervalo de Confiança.

Tabela 15: Análises de associação genética do polimorfismo rs352140 entre as formas clínicas da Hanseníase na classificação utilizada pela OMS.

	PB	MB	OR (IC95%)	P
G	10	29	0,7280	0,6605
A	18	38	(0.2925-1.812)	

OR: Odds Ratio (razão de chance); IC: Intervalo de Confiança; PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar

6.3- Genotipagem do alelo CCR5delta32

Para esse projeto, foi desenvolvido um ensaio uniplex para identificar o alelo CCR5delta32 nos indivíduos dos grupos Caso e Controle (**Figura 5**).

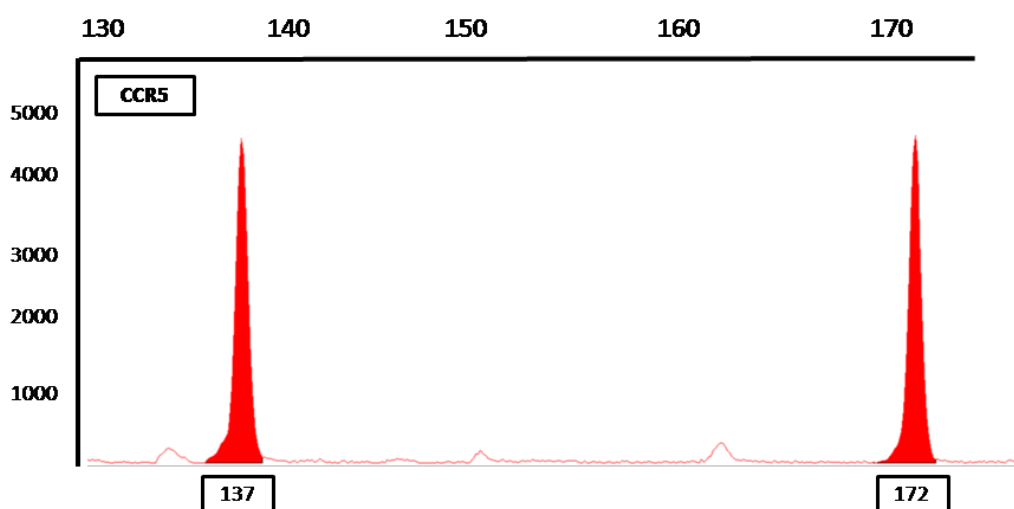


Figura 5: Eletoferograma representativo do perfil alélico para o marcador CCR5 em um indivíduo portador de hanseníase. O paciente é heterozigoto, ou seja, apresenta os alelos de 137pb (CCR5delta32) e de 172pb (CCR5/WT).

6.3.1- Associação da variante CCR5 delta 32 na manifestação da hanseníase *per se* e na gravidade da doença

A frequência do alelo CCR5delta32 no grupo Caso foi de 0,015, enquanto que no grupo Controle foi de 0,11. A taxa de Heterozigose observada no grupo caso foi de 0,03 ($H_E = 0,03$), e no grupo controle foi de 0,2 ($H_E = 0,03$).

A análise de associação do grupo Controle em relação ao grupo Caso se mostrou estatisticamente significativa. Onde podemos observar que indivíduos portadores do alelo CCR5delta32 têm menos risco de ter hanseníase, sugerindo que ter o alelo polimórfico mesmo que em heterozigose é um fator protetor (**Tabela 16**). Não foi encontrado indivíduos portadores de hanseníase homozigotos para a mutação CCR5delta32.

Tabela 16: Análise de associação genética do polimorfismo CCR5delta32 do gene CCR5 nos grupos Caso e Controle.

	Hanseníase	Controle	OR (IC95%)	P
CCR5delta32/WT	2	23	0,1232 (0.02854-0.5317)	0,0005*
CCR5/WT	132	187		

Quando a análise foi realizada comparando o grupo Controle a cada forma clínica da hanseníase com as definições de Madri, não foi observada diferença estatística significativa como é mostrado na **Tabela 17**.

Tabela 17: Análises de associação genética do polimorfismo CCR5delta32 entre Controle e as formas clínicas da Hanseníase na classificação de Madri.

	MHT	Controle	OR (IC95%)	p	MHV	Controle	OR (IC95%)	P
CCR5delta32/WT	1	23	0,3011 (0.03904-2.323)	0,2231	1	23	0,2323 (0.03036-1.777)	0,1267
CCR5/WT	27	187			35	187		
	MHI	Controle	OR (IC95%)	p	MHD	Controle	OR (IC95%)	P
CCR5delta32/WT	0	23	0,8704 (0.1055-7.177)	0,8973	0	23	0,2956 (0.06765-1.292)	0,0867
CCR5/WT	8	187			52	187		

No entanto, quando a estratificação do grupo Caso seguiu a classificação da OMS, pode-se observar diferença estatística na correlação do grupo Controle com a forma clínica multibacilar, sugerindo que indivíduos carreadores do alelo

mutado tem menor risco de apresentar a forma clínica multibacilar (**Tabela 18**), mas não paucibacilar.

Tabela 18: Análises de associação genética do polimorfismo CCR5delta32 comparando o grupo controle às formas clínicas da Hanseníase na classificação operacional usada pela OMS.

	PB	Controle	OR (IC95%)	P	MB	Controle	OR (IC95%)	P
CCR5delta32/WT	1	23	0,2323 (0.03036-1.777)	0,1267	1	23	0,09345 (0.01241-0.7036)	0,0045*
CCR5/WT	35	187			87	187		

Não foi observada diferença estatística significativa quando comparada a frequência alélica da variante genética CCR5delta32 entre pacientes estratificados segundo a classificação de Madri e OMS (**Tabelas 19 e 20**).

Tabela 19: Análises de associação genética do polimorfismo CCR5delta32 entre as formas clínicas na classificação de Madri.

	MHT	MHV	OR (IC95%)	P	MHT	MHD	OR (IC95%)	P
CCR5delta32/WT	1	1	1,296 (0.07745-21.70)	0,8563	1	0	3,786 (0.3285-43.62)	0,2545
CCR5/WT	27	35			27	52		
	MHT	MHI	OR (IC95%)	P	MHV	MHD	OR (IC95%)	P
CCR5delta32/WT	1	0	0,6429 (0.05194-7.956)	0,7289	1	0	2,944 (0.2571-33.72)	0,3644
CCR5/WT	27	8			35	52		
	MHV	MHI	OR (IC95%)	P	MHD	MHI	OR (IC95%)	p
CCR5delta32/WT	1	0	0,5000 (0.04064-6.151)	0,5819	0	0	0,3333 (0.02729-4.072)	0,3687
CCR5/WT	35	8			52	8		

Tabela 20: Análise de associação genética do alelo CCR5delta32 entre as formas clínicas na classificação adotada pela OMS.

	PB	MB	OR (IC95%)	P
CCR5delta32/WT	1	1	2,486 (0.1511-40.88)	0,5101
CCR5/WT	35	87		

7- DISCUSSÃO

Neste estudo foi observada uma predominância de indivíduos do sexo masculino em relação ao sexo feminino, esses dados corroboram com a OMS, onde apesar da doença afetar ambos os sexos, indivíduos do sexo masculino são mais frequentemente afetados que as mulheres, com proporções de 2:1 respectivamente (WHO, 1998). No Brasil, a taxa de incidência de homens com a doença é de 25,66/100.000 e de mulheres de 18,85/100.000. No entanto, Martins e colaboradores (2016), através de um estudo epidemiológico retrospectivo com abordagem descritiva que utilizou dados de notificação de hanseníase nos sistemas informatizados da Secretaria Municipal de Saúde e do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) do Ministério da Saúde no período de 2013 a 2014 em Cuiabá, Mato Grosso, observaram uma predominância em indivíduos do sexo feminino. A diferença entre a ocorrência da doença entre os gêneros pode ser explicada pelas características culturais e sociológicas da doença (CASTRO *et al.*, 2016). Nas amostras genotipadas, o grupo controle não segue a mesma proporção de homens e mulheres comparados ao grupo caso. Isto aconteceu pois inicialmente as amostras de casos e controles foram selecionadas de forma pareada quanto ao sexo para o estudo genético que contemplava um número amostral maior. No entanto, com os dados das amostras genotipadas, o efeito da seleção pareada não pôde ser observado.

Estudos genéticos de associação se mostram fundamentais para elucidar os mecanismos inerentes a doenças de um modo geral, sejam elas infecciosas ou não. A ocorrência dessas doenças é controlada por componente genético, resultado da ação integrada de um número variado de genes, associado a fatores ambientais, socioeconômicos, culturais, entre outros. Estudos de associação se baseiam na comparação das frequências alélicas de um marcador genético entre os indivíduos afetados e não afetados. Determinado alelo é considerado associado com o fenótipo estudado quando ocorre com frequência diferente entre indivíduos afetados em comparação com um grupo controle de não afetados.

Em hanseníase ainda não é esclarecido porque indivíduos que entram em contato com *M. leprae* podem desenvolver ou não a doença, ou ainda aqueles

que desenvolvem apresentam diferentes formas clínicas, variando da forma clínica de menor severidade à de maior severidade. Por isso, estudos de associação genética com uma população afetada por *M. leprae* pode ajudar a compreender quais genes estão envolvidos no processo da manifestação da doença *per se* e/ou na severidade da forma clínica desenvolvida. Neste trabalho, foram genotipadas cinco variantes genéticas, destas quatro são SNPs e um é uma deleção.

Este é o primeiro estudo que associa um variante genético de *P2X7* a hanseníase. O SNP *P2X7_rs3751143* é um polimorfismo exônico onde ocorre uma troca do alelo A para o alelo C. Com essa troca ocorre mudança de aminoácido na proteína codificada (*GAG*→*GCG*:Glutamina→Alanina) e está associada a perda de função (Sun *et al.*, 2010). Foi observado que monócitos de indivíduos homozigotos para o alelo polimórfico C expressaram receptor não funcional, enquanto indivíduos heterozigotos apresentaram metade da expressão de *P2X7* comparado a proteína funcional (Gu *et al.*, 2001). Polimorfismos de perda de função levam não apenas à redução da função de *P2X7*, mas também ao comprometimento da morte de micobactérias induzida por ATP em macrófagos (Sun *et al.*, 2010). Ainda não se sabe o envolvimento de *P2X7* na imunopatologia da hanseníase, no entanto, *P2X7* tem importante regulação na infecção causada por *Mycobacterium tuberculosis* e outros patógenos intracelulares; sugerindo que mecanismos anti-micobacterianos possam ser geneticamente regulados.

O marcador *rs3751143* do gene *P2X7* possui o alelo polimórfico C menos frequente que o alelo A na população estudada. Essa diferença entre os alelos também é reproduzido nas populações CEU e YRI. No entanto, a população de Campos apresenta uma frequência maior deste alelo (0,31) em comparação à CEU (0,17) e YRI (0,09). Este marcador apresentou associação quando comparados somente o grupo Caso, estratificado nas formas clínicas paucibacilares e multibacilares. Pacientes carreadores do alelo C apresentam 2 vezes maior razão de chance de apresentarem a forma clínica paucibacilar. Sugerindo ser um fator de determinação para a condução da resposta imunológica para o polo de menor gravidade da hanseníase. Outros estudos associam esse polimorfismo à tuberculose: Bem-Selma e colaboradores (2011) associaram o alelo C e os genótipos CC e AC a forma clínica extrapulmonar da

tuberculose em comparação com o grupo controle. Além disso, eles foram associados com 3,83, 11,86 e 3,15 vezes os riscos de desenvolver esta forma clínica da tuberculose, respectivamente. Wu e colaboradores (2015) também associaram os genótipos AC e CC à suscetibilidade à tuberculose, considerando ser fator de risco para a doença. Além da associação com a doença infecciosa tuberculose, o genótipo CC foi associado com o aumento do risco de osteoporose em mulheres na China (WANG *et al.*, 2017). O alelo C também foi associado a aumento de risco de carcinoma hepatocelular em um estudo caso-controle de uma população chinesa (DUAN *et al.*, 2016). Estes dados sugerem complementar o estudo de associação genética com estudos de avaliação da expressão do receptor P2X7 em pacientes portadores de hanseníase. No entanto, não foi encontrada associação do polimorfismo P2X7_rs3751143 quando comparado à frequência alélica do grupo controle em relação aos pacientes portadores de hanseníase.

Outro marcador analisado neste estudo foi o *TLR9_rs352140*. Receptores do tipo *Toll* são ativados por antígenos e estes levam a diferentes perfis de ativação da resposta imune adequada ao patógeno (JOHNSON *et al.*, 2007). Estes receptores reconhecem lipoproteínas presentes no bacilo e promovem a diferenciação de monócitos em macrófagos e em células dendríticas, que por sua vez ativam linfócitos que liberam citocinas como TNF- α e IL-12 promovendo uma atividade antimicrobica (KRUTZIK *et al.*, 2003). Foi observada uma significativa expressão de TLR-9 em indivíduos que sofreram episódios inflamatórios agudos conhecidos como eritema nodoso leproso (ENL) quando comparados com pacientes lepromatosos não reacionais, tanto localmente nas lesões cutâneas quanto em células circulantes mononucleares, indicando que TLR-9 constitui uma importante via da imunidade inata envolvida na patogênese e evolução da ENL (DIAS *et al.*, 2016). Este é o primeiro estudo que associa o marcador *TLR9_rs352140* a manifestação da hanseníase *per se* ou a manifestação da forma clínica da doença. Quando comparada o grupo controle a cada forma clínica na classificação de Madri observamos diferença estatística em relação a forma clínica MHT, sugerindo que indivíduos carreadores do alelo polimórfico G tem menor risco de ter essa forma clínica. Entretanto, não foi encontrada diferença estatística da frequência alélica da população controle em relação à população portadora de hanseníase. O valor de *p* considerado (*p* <

0,05) para ser significativa está no limite e somente com um número amostral maior poderemos observar se existe associação significativa do polimorfismo a manifestação da hanseníase *per se*. O alelo G já foi associado com a retinocoroidite causada por *Toxoplasma gondii* (PEIXOTO-RANGEL *et al.*, 2009).

É conhecido o envolvimento de CCR5 na infecção por HIV, um co-receptor importante para a entrada do vírus na célula hospedeira (DENG *et al.*, 1996; OPPERMANN 2014). A deleção de 32 nucleotídeos no gene *CCR5* em homozigose causa a ausência da proteína CCR5. Essa ausência tem efeito protetor na infecção pelo vírus. Quando em heterozigose, os portadores apresentam menores quantidades da proteína CCR5 e, portanto, a progressão da doença é mais lenta comparada à progressão em indivíduos homozigotos para o alelo normal (HUANG *et al.*, 1997). *CCR5delta32* também foi associado a dengue (MARQUES *et al.*, 2015), foi observado que camundongos *CCR5* deficientes eram resistentes a infecção por DENV, pois *CCR5* é um fator hospedeiro necessário para a replicação do vírus e o desenvolvimento da doença (MARQUES *et al.*, 2015). A expressão de *CCR5* também desempenha um papel na distribuição de células efectoras em locais de infecção microbiana onde podem contribuir para controle e/ou eliminação microbiana. Estudo envolvendo camundongos nocautes para *CCR5* resultou em um aumento do número de células dendríticas e bacilos de *M. tuberculosis* nos gânglios linfáticos devido ao aumento da expansão dos linfócitos T, levando ao aumento da inflamação nos pulmões. Eles consideraram que pode haver níveis aumentados de quimiocinas não ligadas induzindo a migração de células imunes através de receptores diferentes de *CCR5*, aumentando o infiltrado celular global e o tamanho dos granulomas (AGOOD *et al.*, 2004). Ainda não é conhecido se *CCR5* tem envolvimento direto na imunopatologia da hanseníase. Este é o primeiro estudo de associação genética com uma população portadora de hanseníase. Os dados demonstram uma redução do alelo polimórfico em pacientes portadores de hanseníase comparado ao grupo controle. Foi observado que indivíduos portadores do alelo *CCR5delta32* têm menos risco de ter hanseníase, sugerindo que ter o alelo polimórfico mesmo que em heterozigose é um fator protetor (OR: 0,1232, IC 95%:0.02854-0.5317, *p*: 0,0005). Apesar de promissores, estes dados são preliminares, pois não foi alcançado a

genotipagem do número de sujeitos da pesquisa inicialmente estabelecido para que tivesse maior poder estatístico nas análises de associação. Entretanto, acreditamos que com as genotipagens de todos os sujeitos da pesquisa inicialmente estabelecido, as associações encontradas serão similares às encontrados nesse estudo preliminar. Sendo assim acredita-se que as associações significativas já encontradas ficarão fortalecidas, as que estão *bordeline* irão ter associação significativa e as que não foram encontradas associação significativas permanecerão assim.

8- CONCLUSÃO

- *P2X7_rs3751143* (C) teve associação com a forma clínica MHI, na classificação de Madri e PB, na classificação usada pela OMS.
- *TLR9_rs352140* (A) teve associação com a forma clínica MHT.
- O polimorfismo CCR5 delta 32 foi associado com menor risco na manifestação da hanseníase *per se* e menor risco na manifestação da forma clínica multibacilar.

9- REFERÊNCIAS

- AGOOD, H. M. S *et al.* CCR5-Deficient Mice Control *Mycobacterium*. **J Immunol.** v. 173, p: 3287-3296, 2004.
- ARAUJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.3, p.372-382, 2003.
- AREESHI, M.Y. P2X71513 A>C Polymorphism Confers Increased Risk of Extrapulmonary Tuberculosis: A Meta-analysis of Case-Control Studies. **Current Genomics.** v.17, n.5, p.450-458, 2015
- BAFICA, A. *et al.* TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.202, n.12, p.1715-1724, 2005.
- BAHARI, G.*et al.* Association of P2X7 gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. **Genetic Molecular Research**, v.12 p.160-166, 2013.
- BATISTA, E. S. *et al.* Socio-demographic profile and clinical-epidemiological study of patients diagnosed with leprosy in Campos of Goytacazes, RJ. **Revista Brasileira Clínica Médica**, v.9, n.2, p.101-106, 2011.
- BEIMA-SOFIE, K. M. *et al.* Toll-like Receptor (TLR) variants are associated with infant HIV-1 acquisition and peak plasma HIV-1 RNA level. **AIDS**, v.27, n.15, p.2431–2439, 2013.
- BIEDERMANN, T. *et al.* TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell Mediated Immune Responses of the Skin. **JID Symposium Proceedings**, v.9, n.1, p.5-14, 2004.
- BRASIL. LEI Nº 9.010, DE 29 DE MARÇO DE 1995. Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9010.htm>. Acesso em: dezembro de 2016.

BRASIL/Ministério da saúde. 2017. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/27487-em-10-anos-o-numero-de-novos-casos-de-hanseníase-cai-34>>. Acesso em março de 2017.

BRIGHTBILL, H. D. *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v.285, p.732-736,1999.

BRITTON W, J; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Lancet**, v.363, p.1209-1219, 2004.

BULAT-KARDUM, L. *et al.* Interferon- γ Receptor-1 receptor-1 gene promoter polymorphisms (G-611A; T-56C) and susceptibility to tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.63, n.2, p.142-150, 2006.

CARDOSO, C.C. *et al.* IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. **Human Genetics**, v.128, p.481–490, 2010.

CASANOVA, J. L. *et al* Inborn errors of immunity to infection: The rule rather than the exception. **J Exp Med**. v.202, p:197-201, 2005.

CASTRO, S. S. *et al.* Leprosy incidence, characterization of cases and correlation with household and cases variables of the Brazilian states in 2010. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 91, n. 1, p. 28-33, 2016 .

COOPER, A. M. *et al.* Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **Journal of Experimental Medicine**. v.178, p.2243–2247, 1993.

COSTA, R.D. *et al.* Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 β) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.99-103, 2008.

DENG, H. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, v.20, n.381, p.661-6, 1996.

DIAS *et al.* DNA Sensing via TLR-9 Constitutes a Major Innate Immunity Pathway Activated during Erythema Nodosum Leprosum. **J Immunol.** v.197, n.5, p: 1905-1913, 2016.

EIDT. L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, v.13, n.2, p.76-88, 2004.

ELAHI, M. M. *et al.* Tumor necrosis factor alpha -308 gene *locus* promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v.1792, n.3, p.163-172, 2009.

FONSECA *et al.* The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, v.6, n.5, 2017

FOSS, N. T. Imunopatologia. In:___ Talhari S, Neves RG (Eds.) **Hansenologia**. 3ª edição. Gráfica Tropical, Manaus, cap.9, p.97-102, 1997.

FRANCESCHI, D. S. *et al.* Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.13, n.4, p.493–598, 2009.

GOULART, I. M. B. *et al.* Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35 n.4, p.365-375, 2002.

GRAUSTEIN, A.*et al.* TLR9 Gene Region Polymorphisms and Susceptibility to Tuberculosis in Vietnam. **Tuberculosis**, v.95, n.2, p.190–196, 2015.

GU, B. J. et al. A Glu-496 to Ala Polymorphism Leads to Loss of Function of the Human P2X7 Receptor*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 11135-11142, 2001

HUANG, Y. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. **Nature Medicine**, v.2, n.11, p.1240-3, 1996.

HUNGRIA, E.M. et al. Antigen-specific secretion of IFN γ and CXCL10 in whole blood assay detects Mycobacterium leprae infection but does not discriminate asymptomatic infection from symptomatic leprosy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2017.

JOHNSON, C.M.; LYLE, E.A.; OmuETI, K.O. Cutting Edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **J. Immunol**. v.178, p:7520-7524, 2007.

KASAHARA, T. et al. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. **Journal of Immunology**, v.130, n.4, p.1784-1789, 1983.

KENT, W.J. et al. The human genome browser at UCSC. **Genome Research**, v.12, n.6, p.996-1006, 2002.

KINDLER, V. et al. The inducing role of tumour necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, v.56, p.731-740, 1989.

KRUTZIK, S.R. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat. Med**. V.9,p:525-532, 2003.

LASTÓRIA, J. C.; MORGADO DE ABREU M. A. M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – Part 1*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.89, n.2, p.205-218, 2014.

LASTÓRIA, J.C. *et al.* Leprosy: reality of the clinical diagnosis. ***Hansenologia Internationals***, v.28, n.1, p.53-58, 2003.

LECONIAT, M. Human interferon gamma receptor 1 (*IFNGRI*) gene maps to chromosome region 6q23-6q24. ***Human Genetics***, v.84, p.92-94, 1989.

LEE, S.-W. *et al.* Interferon gamma polymorphisms associated with susceptibility to tuberculosis in a Han Taiwanese population. ***Journal of Microbiology, Immunology and Infection***, v.48, n.4, p.376-380, 2015.

LI C. M. *et al.* Association of a polymorphism in the P2X7 gene with tuberculosis in a Gambian population. ***Journal Infect Diseases***, v.186, n.10, p.1458-62, 2002.

LOCKWOOD, D. N. Leprosy – a changing picture but a continuing challenge. ***Tropical Doctor***, v.35, n.2, p.65-67, 2005.

LU, J. *et al.* Genetic polymorphisms of *IFNG* and *IFNGR1* in association with the risk of pulmonary tuberculosis. ***Gene***, v.543, p.140-144, 2014.

MARQUES, R.E. *et al.* Dengue virus requires the CC-chemokine receptor *CCR5* for replication and infection development. ***Imunology***, v.145, n.4, p.583-96, 2015.

MARTINS, R. F. *et al.* Sociodemographic and epidemiological profile of leprosy patients in an endemic region in Brazil. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v.49, n.6, p.177-780, 2016

MASCARENHAS, A. C. Secretaria de Saúde oferece exame para hanseníase na Baixada. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br>. Acesso em 28 de outubro, 2015.

MENDONÇA, V. A. Immunology of leprosy. ***Anais Brasileiro de Dermatologia***, v.83, n.4, p.343-350, 2008.

MIRA, M. T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. ***Microbes and Infection***, v.8, p.1124-1131, 2006.

MIRANZI, S. S. C. *et al.* Epidemiological profile of leprosy in a Brazilian municipality between 2000 and 2006. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v.43, n.1, p.62-67, 2010.

MISCH, E. *et al.* Leprosy and the human genome. ***Microbiology and molecular biology reviews: MMBR***, v.74, n.4, p.589-620, 2010.

MODLIN, R. L. Th1- Th2 paradigm: insights from leprosy. ***Journal Investigative Dermatology***, v.102, p.828-832, 1994.

MONOT, M. *et al.*, Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. ***Nat Genet.*** v.41, p:1282-1289, 2009.

MORAES, M. O. *et al.* Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. ***Genes and Immunity***, v.5, p.592–595, 2004.

MORTAZ, E. *et al.* Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. ***Journal of Clinical Immunology***, v.35, p.1-10, 2015.

MOURA, R. S. *et al.* Sorologizada hanseníase utilizando PGL-1: revisão sistemática. ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical***, v.41, p.11-18, 2008.

NATH, I. *et al.* Immunology of leprosy and diagnostic challenges. ***Clinics in Dermatology***, v.33, p.90–98, 2015.

NATHAN C F. *et al.* Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy. ***The New England Journal of Medicine***, v.315, p.6-15, 1986.

NICCHIO, M. V.C *et al.* Spatial and ´ temporal epidemiology of Mycobacterium leprae infection among leprosy patients and household contacts of an endemic region in southeast Brazil. **Acta Tropica**
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.019>

OKAMOTO, H. *et al.* Human monocyte-derived multinucleated giant cells. **Europe PMC**, v.73, n.3, p.245-51, 2004.

OPPERMANN, M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. **Cell Signal**, v.16, n.11, p.1201-10, 2004.

PEIXE, R. G. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the interferon gamma gene are associated with distinct types of retinochoroidal scar lesions presumably caused by Toxoplasma gondii infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, p.99-107, 2014.

PEIXOTO-RANGEL, A. B. *et al.* Candidate gene analysis of ocular toxoplasmosis in Brazil: evidence for a role for toll-like receptor 9 (TLR9). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.8, p.1187-1190, 2009.

QIDWAI, T; KHAN, F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.74, n.6, p.522-547, 2011.

RICCI, E. *et al.* Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Translational Medicine**, v.8, p.49-53, 2010.

ROACH, D. R. *et al.* TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of Mycobacterial infection. **Journal of Immunology**, v.168, p.4620-4627, 2002.

SALES, M. P. *et al.* Genetic diversity among Mycobacterium bovis isolates: a preliminary study of strains from animal and human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.12, p.4558- 4562, 2001.

SANTOS, A. R. *et al.* Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. ***Journal of Infect Diseases***, v.186, p.1687-1691, 2002.

SANTOS, A. R. *et al.* Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. ***International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial***, v.68, n.3, p.325-327, 2000.

SANTOS, M.B. *et al.* Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. ***Scandinavian Journal of Immunology***, v.86, n.1, p.40-49, 2017.

SARNO, E. N. *et al.* Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF alpha □ ***Leprosy Review***, v.71, p.154-8, 2000.

SAUER, B. P. *et al.* Genetics of leprosy: Expected—and unexpected—developments and perspectives. ***Clinics in Dermatology***. V.33, n.1, p:99-107, 2015.

SHEN, C. *et al.* IFNG polymorphisms are associated with tuberculosis in Han Chinese pediatric female population. ***Molecular biology reports***, v.40, n.9, p.5477-5482, 2013.

SELING, P. A.; MODLIN, R. L. Regulation of cytokine patterns in leprosy. ***Annals of the New York Academy of Sciences***, v.730, p.42-52, 1994b.

SELING, P. A.; MODLIN, R. L. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. ***Springer Seminars in Immunopathology***, v.13, p.413-426, 1992.

SILVA JUNIOR, G. B. *et al.* Leprosy nephropathy: a review of clinical and histopathological features. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.57, n.1, p.15-20, 2015.

SILVA, G.A.V. *et al.* Association of TNF –1031 C/C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. **Human Immunology**, v.76, n.2-3, p.137-141, 2015.

SILVA, L. M. *et al.* Immunohistochemical analysis of the expression of cellular transcription NFκB (p65), AP-1 (c-Fos and c-Jun), and JAK/STAT in leprosy. **Human Pathology**, v.46, p.746–752, 2015.

SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação - MS/SVS/CGHDE - Coordenação Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação. <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/hansenias/cnv/hanswRJ.def>>. Acesso em março de 2017. Acesso em julho de 2017.

SOUZA V. N. B.; PEREIRA, A. C. Genética humana na susceptibilidade à hanseníase. **Hansen International**, v.32, n.1, p.81-93, 2007.

SOUZA, C. S. Leprosy: clinical forms and differential diagnosis. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.30, p.325-334, 1997.

TARIQUE *et al.* Fate of T cells and their secretory proteins during the progression of leprosy. **Current Protein Peptide Science**. 2017.

TEKIN, D. *et al.* Polymorphism in the *P2X7* gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis in Turkish children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.29, p.779–782, 2010.

TRUMAN, R. W. *et al.* Probable zoonotic leprosy in the southern United States. **N Engl J Med**. V.364, p:1626-1633, 2011.

VISENTAINER, J.E.L. Importância de polimorfismos de genes reguladores de citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.4, p.739-748, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A guide to leprosy control. 2nd edition Geneva: WHO; 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Geneva 5 september 2014. **Weekly epidemiological Record**, v.89, n.36, p.389-400, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy update, 2014: need for early case detection. **Wkly Epidemiol Rec**. v. 90, n. 36, p:461–74, 2015

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record. v. 92, n. 35, p.501–520, 2017.

WU, J. *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms in *P2X7* Gene Are Associated with Serum Immunoglobulin G Responses to *Mycobacterium tuberculosis* in Tuberculosis Patients. Hindawi Publishing Corporation. **Disease Markers**, p.1-7, 2015.

YAMAMURA, M. *et al.* Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v.254, p.277-279, 1991.

YAWALKAR, S.J. Leprosy for medical practitioners and paramedical workers. **Basle.: Novartis Foundation for Sustainable Development**, 2002.

YI, L. *et al.* A Meta-Analysis of *P2X7* Gene-762T/C Polymorphism and Pulmonary Tuberculosis Susceptibility. **PLoS ONE**, v.9, n.5, 2014.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa intitulada:

“Determinação da densidade molecular e polimorfismos genéticos de receptores CR1 em células de indivíduos acometidos por diferentes formas clínicas da hanseníase no município de Campos dos Goytacazes”.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: O motivo que nos leva a estudar o problema da hanseníase é o fato de sabermos que nesta região do estado do Rio de Janeiro esta doença afeta muitas pessoas, e em muitos casos com gravidade doentes. A pesquisa se justifica porque tentando entender o que acontece no sistema imunológico das pessoas com a hanseníase e naquelas sem a hanseníase poderemos planejar melhor para lidar com esta doença, ou seja, podemos tratar os casos de forma diferente e acompanhar como estão evoluindo, por exemplo. A hanseníase pode causar incapacidades físicas irreversíveis quando o diagnóstico é tardio, pois esta doença atinge nervos. O objetivo desse projeto é avaliar a presença e quantidade de uma molécula do nosso sistema imunológico que é importante na defesa do nosso organismo, chamada CR1. Além disso, estamos nos propondo a estudar o que determina a nível genético a variação na quantidade desta molécula importante na defesa contra a *Mycobacterium leprae*, o microrganismo que causa a hanseníase. Estudando isso, poderemos no futuro ajudar aos médicos com proposta de tratamento mais eficaz no combate a hanseníase e específico para cada pessoa. O procedimento de coleta de amostras de sangue será da seguinte forma: durante sua consulta médica, no **Centro de Referência da Hanseníase, pertencente à Secretaria Municipal de Saúde**, profissionais habilitados coletarão seu sangue em tubos a vácuo, como ocorre numa coleta de sangue de rotina para fazer um hemograma por exemplo. Será coletado no total 30mL de sangue, equivalente a 3 tubos. Essas amostras irão para Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) onde vão ser processadas para o estudo que explicamos acima.

DESCONFORTOS E RISCOS E BENEFÍCIOS: Existe um desconforto e risco mínimo para você que se submeter à coleta do sangue para o estudo da hanseníase, sendo que se justifica pelo fato de que poderemos ajudar a entender porque o sistema imunológico de uma pessoa ajuda ela a não ter a doença na sua forma mais severa e de outra não.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA:

Em caso de você ter a doença hanseníase diagnosticada clinicamente, você será acompanhado durante o período do tratamento. Você retornará ao médico dermatologista do Centro de Referência da Hanseníase de acordo como ele

determinar. Além disso, assistência lhe será prestada quando você julgar necessário voltar ao dermatologista durante o período de tratamento.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores e médicos irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame clínico, laboratorial da pesquisa e quaisquer outros serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma via deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, visto que a coleta das amostras de sangue a serem utilizadas nesta pesquisa ocorrerão na ocasião da sua ida ao Centro de Referência da Hanseníase para consulta médica. Portanto, sua participação não acarretará custos extras pra você, mas caso você venha a ter qualquer despesa extra como consequência da sua participação nesta pesquisa, tais como transporte, alimentação e hospedagem você será ressarcido.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE: Eu, _____ fui

informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e mudar minha decisão se assim o desejar. A professora Alba Lucinia Peixoto Rangel e Dr. Edilbert Pellegrini Nahn Junior certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o Dr. Edilbert ou a Professora Alba nos telefones (22) 999839552 ou (22) 999 721 002 ou 2739 7255 ou ainda Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Campos situado à Avenida Alberto Torres, 111 Centro, Campos dos Goytacazes RJ (22) 2101-2929.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. Ainda, fui informado que este termo foi elaborado em duas únicas vias, tendo sido uma via entregue a mim e a outra via ficado em posse dos pesquisadores responsáveis pela pesquisa.

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------