



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ADRIANA BARBOSA DE LIMA FONSECA

ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DE MCP-1 rs1024611 E DE IL-17 rs
2275913 COM A HANSENÍASE

Aracaju (SE)
2016

ADRIANA BARBOSA DE LIMA FONSECA

ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DE MCP-1 rs1024611 E DE IL-17 rs
2275913 COM A HANSENÍASE

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação
em Medicina da Universidade Federal de
Sergipe como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Amélia Ribeiro de
Jesus

Aracaju (SE)
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

F676a Fonseca, Adriana Barbosa de Lima
Associação entre os polimorfismos de MCP-1
rs1024611 e de IL-17 rs2275913 com a hanseníase /
Adriana Barbosa de Lima Fonseca ; orientador Amélia
Maria Ribeiro de Jesus. - Aracaju, 2016.
79 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -
Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Hanseníase. 2. Polimorfismo (Genética). 3.
Imunopatologia. 4. Imunogenética. I. Jesus, Amélia
Maria Ribeiro de, orient. II. Título.

CDU 616.5-002.9

ADRIANA BARBOSA DE LIMA FONSECA

ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DE MCP-1 rs1024611 E DE IL-17 rs
2275913 COM A HANSENÍASE

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação
em Medicina da Universidade Federal de
Sergipe como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Orientador: Prof.(a) Dra. Amélia Ribeiro de Jesus

1º Examinador: Profa. Dra. Angela Maria da Silva

2º Examinador: Profa. Dra. Tatiana Rodrigues de Moura

3º Examinador: Profa. Dra. Nalu de Aguiar Teixeira Peres

4º Examinador: Prof. Dr. Rodrigo Anselmo Cazzaniga

PARECER

*Aos meus pais,
exemplos de amor, retidão e apoio incondicionais*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, meu amparo, pelas conquistas já alcançadas e pelas que ainda virão.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Amélia Ribeiro de Jesus**, pela confiança em meu trabalho, pelo apoio e exemplo irretocável de conduta profissional.

Ao meu marido **Wilson** pelo apoio, carinho, cumplicidade e paciência pelos muitos períodos de ausência e à minha flor, minha filha **Marília** – filha, meu colo a partir de agora é todo seu. Meu amor por vocês é do tamanho do universo.

Aos meus irmãos, **Ana Paula e Miguel Ângelo**, que sempre confiam e torcem por mim.

Às **Profas. Dras. Shirlei Otacílio da Silva e Tatiana Rodrigues de Moura** e ao **Prof. Dr. Rodrigo Anselmo Cazzaniga** sem os quais não teria sido possível concluir essa pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Enaldo Vieira de Melo**, amigo e colega de longa data, peça fundamental na análise dos dados.

Na pessoa do **Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida** agradeço aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular pelo agradável convívio nesses anos de pesquisa.

Às colegas **Marise Simon e Daniela Teles** e aos **estudantes** que contribuíram com a coleta de dados e inclusão de pacientes da pesquisa.

Às **médicas dermatologistas Jonnia Sherlock e Lenise Franco**, **médicas residentes e funcionários** do ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário e do CEMAR pela disponibilidade e atenção dispensadas.

Aos **pacientes, familiares e contactantes** que gentilmente se dispuseram a colaborar com a pesquisa.

RESUMO

Associação entre a hanseníase com os polimorfismos de IL-17 rs 2275913 e do MCP-1 rs1024611, Adriana Barbosa de Lima Fonseca, Aracaju, 2016.

A hanseníase é uma infecção crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* o qual afeta pele e nervos periféricos. Vários aspectos genéticos relacionados à patogênese e à variabilidade fenotípica da resposta imune do hospedeiro precisam ser mais estudados em hanseníase uma vez que polimorfismos de genes envolvidos na resposta imune ao patógeno podem estar associados à manifestação ou não da doença e sua evolução clínica. Trata-se de um estudo de caso-controle que teve como objetivo analisar a possível associação entre os polimorfismos rs2275913 de IL-17 e rs1024611 de MCP-1 com a hanseníase. A amostra foi composta de 199 pacientes e 85 contactantes saudáveis não consanguíneos coabitantes dos casos. Os polimorfismos foram analisados utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real Taqman. Para análise estatística foi utilizado o software SPSS versão 22.0 com emprego do teste T de Student para amostras independentes, teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher quando apropriado e análise de agrupamentos. Houve diferença na distribuição de genótipos GG de MCP-1 ($p=0,015$) e GG de IL-17 ($p=0,031$) entre doentes e contactantes. Não houve diferença quando da comparação da distribuição dos genótipos de MCP-1 e IL-17 entre os doentes estratificados pelas formas clínicas paucibacilar e multibacilar ($p=0,46$ e $p=0,14$ respectivamente). A análise dos indivíduos doentes e contactantes segundo as variáveis idades, sexo e genótipos de MCP-1 e IL-17 permitiu discriminar cinco grupos. Quando da análise de agrupamento segundo frequência genotípica e características clínicas, os grupos 1 e 5 foram constituídos por doentes que apresentavam somente o genótipo GG de IL-17 e maior frequência dos genótipos AG e GG de MCP-1 ($p=0,0001$). Possivelmente a presença do genótipo GG de MCP-1 e genótipo GG de IL-17 contribuíram para a manifestação da doença nos indivíduos estudados.

Descritores: Hanseníase. Resistência. Imunopatogênese. Imunogenética

ABSTRACT

Association between leprosy with polymorphisms of IL-17 rs 2275913 and MCP-1 rs1024611, Adriana Barbosa de Lima Fonseca, Aracaju, 2016.

Leprosy is a chronic infection caused by *Mycobacterium leprae* which affects skin and peripheral nerves. Various aspects related to genetic and phenotypic variability of the pathogenesis of immune response need to be further studied. In leprosy several polymorphisms of genes involved in the immune response of the host to pathogen were associated with leprosy per se and its clinical course. This present case-control study aimed to examine the possible association between polymorphisms rs2275913 of IL-17 and rs1024611 of MCP-1 with leprosy. The sample was composed of 199 patients and 85 healthy individuals unrelated households of the cases. The polymorphisms were analyzed using the PCR technique Taqman. For statistical analysis we used the software SPSS version 22.0 with employment of the Student T test for independent samples, Chi-square and Fisher's exact test where appropriate and analysis thereof. There were differences in the distribution of genotypes of MCP-1 and IL-17 between leprosy and contactant controls ($p = 0.015$ and $p = 0.031$ respectively) with greater frequency of genotype GG in the leprosy patients. The comparison of the distribution of genotypes between the groups stratified by multibacillary and paucibacillary clinical forms, did not show any difference in the distribution of genotypes of either MCP-1 or IL-17 in the patients with the operational forms ($p = 0.46$ and $p=0.14$ respectively). The analysis of sick and healthy individuals according to the variables age, sex and genotypes of MCP-1 and IL-17 allowed to discriminate five groups. Groups 1 and 5 were composed of patients who had only the GG genotype of IL-17 while the GG genotype of MCP-1 was more frequent in Group 1 which was composed of mostly patients ($p = 0.0001$). Possibly the presence of genotype GG of MCP-1 and IL-17 GG genotype contributed to the outcome of the disease in the studied subjects.

Keywords: Leprosy. Resistance. Immunopathogenesis. Immunogenetics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa representando as taxas de detecção de casos novos de hanseníase no mundo por 100.000 habitantes, relatados à OMS.....	15
Figura 2. Fluxograma do delineamento da pesquisa.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas dos indivíduos dos grupos doentes e sadios não consanguíneos distribuídos de acordo com o sexo e idade.....	47
Tabela 2 -	Frequência genotípica dos SNP de MCP-1 e IL-17 em indivíduos com hanseníase e contactantes sadios não consanguíneos.....	48
Tabela 3 -	Comparação das frequências genotípicas dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos indivíduos doentes pauci ou multibacilares em relação aos sujeitos sadios	48
Tabela 4 -	Comparação das frequências genotípicas dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos indivíduos doentes que manifestaram ou não reação em relação aos sujeitos sadios	49
Tabela 5 -	Comparação das frequências alélicas dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos indivíduos doentes em relação aos sujeitos sadios não consanguíneos.....	49
Tabela 6 -	Comparação das frequências alélicas dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos indivíduos doentes pauci ou multibacilares em relação aos sujeitos sadios	50
Tabela 7 -	Comparação das frequências alélicas dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos indivíduos doentes que manifestaram ou não reação em relação aos sujeitos sadios.....	50
Tabela 8 -	Caracterização dos agrupamentos conforme características clínicas e frequências genotípicas dos SNP de IL-17 e MCP-1 nos indivíduos doentes em relação aos sujeitos sadios.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Aspectos epidemiológicos da hanseníase	15
2.2	Formas clínicas e Imunopatogênese da hanseníase	16
2.2.1	O papel dos eventos iniciais da infecção por <i>M. leprae</i> na definição do desfecho clínico	16
2.2.2	Classificação clínica e imunopatogênese da hanseníase.....	20
2.2.3	Aspectos clínicos e imunopatogênese das complicações hansênicas.....	22
<u>2.2.3.1</u>	<u>Reações hansênicas</u>	22
<u>2.3.3.2</u>	<u>Lesão neurológica</u>	25
2.3	Aspectos Imunogenéticos na hanseníase	27
2.3.1	Padrões moleculares associados a patógeno (PAMP).....	29
2.3.2	SLC11A1 (Solute carrier Family 11 member 1)/ Proteína do macrófago associada à resistência natural 1 (NRAMP 1).....	32
2.3.3	PARKIN (PARK2/PACRG)	33
2.3.4	Receptor de vitamina D (VDR).....	34
2.3.5	MCP1/CCL2	34
2.3.6	Polimorfismos de TNF	35
2.3.7	MHC/HLA	36
2.3.8	IL-12	36
2.3.9	IFN- γ	37
2.3.10	IL-10	37
2.3.11	IL-17.....	38
3	JUSTIFICATIVA	39

4	OBJETIVOS	40
4.1	Objetivo geral	40
4.2	Objetivos Específicos	40
5	PACIENTES E MÉTODOS	41
5.1	Delineamento do estudo e amostra estudada	41
5.2	Genotipagem	43
5.2.1	Coleta de sangue e obtenção de DNA genômico.....	43
5.3	Análise Estatística.....	44
6	ASPECTOS ÉTICOS	45
7	FONTE DE FINANCIAMENTO	46
8	RESULTADOS	47
8.1	Caracterização da amostra	47
8.2	Distribuição genotípica dos SNPs	47
8.3	Distribuição alélica dos SNPs	49
8.4	Caracterização dos doentes e sadios conforme agrupamento genotípico	50
8.4.1	Caracterização do grupo 1.....	51
8.4.2	Caracterização do grupo 2.....	51
8.4.3	Caracterização do grupo 3.....	51
8.4.4	Caracterização do grupo 4.....	52
8.4.5	Caracterização do grupo 5.....	52
9	DISCUSSÃO	54
10	CONCLUSÕES	59
11	PERSPECTIVAS	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO	72
	APÊNDICE B - CONSENTIMENTO INFORMADO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE	75

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença causada por uma micobactéria intracelular obrigatória, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), de alta infectividade mas baixa patogenicidade, a qual possui longo período de incubação e provoca lesões na pele, mucosa do trato respiratório superior e nervos periféricos (RINALDI, 2005). A doença é complexa e a manifestação clínica depende não apenas do agente infeccioso, mas, sobretudo, de fatores ambientais, socioeconômicos e da predisposição individual do hospedeiro influenciada por fatores genéticos (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Trata-se de uma doença crônica, infectocontagiosa e de notificação compulsória em nosso país. É transmitida principalmente pela via aérea superior de pacientes multibacilares não tratados e tem como porta de entrada mais provável o trato respiratório. Os continentes asiático e africano são considerados como o berço dessa doença cujos relatos mais remotos são de 600 a.C. (BRASIL, 2014).

Em conformidade com os relatórios oficiais de 103 países e territórios, a prevalência global registrada da hanseníase no final do primeiro trimestre do ano 2014 foi de 180.464 casos (WHO, 2015). A doença manifesta-se através de um amplo espectro clínico cujas formas são influenciadas pela resposta imune do hospedeiro contra o bacilo. Tais manifestações clínicas incluem os polos denominados de **hanseníase tuberculóide** (HT), com predomínio de uma resposta Th1 específica e controle da multiplicação do *M. leprae*, e **hanseníase virchowiana** (HV), com uma resposta Th2 disseminada.

As complicações dessa doença, conhecidas como reações hansênicas, geralmente são decorrentes de fenômeno inflamatório agudo que pode ocorrer durante ou após o tratamento. Os danos neurológicos que surgem no curso de tais reações podem causar deformidade crônica irreversível.

Além disso, mesmo após o tratamento, os pacientes muitas vezes necessitam de cuidados por apresentar reações hansênicas, ou até mesmo déficits neurológicos permanentes (LOCKWOOD, 2004; GOULART, GOULART 2008; MEIMA, *et al.*, 2008; SCOLLARD, 2008). Em virtude das deformidades e incapacidades físicas comumente vistas nos casos avançados, a hanseníase está fortemente vinculada a estigmas de rejeição e ostracismo social. Esses estigmas prejudicam sobremaneira tanto o diagnóstico quanto o tratamento uma vez que dificultam a aceitação da doença por parte do indivíduo acometido e de seus familiares.

Alguns fatores justificam o difícil controle da hanseníase. A impossibilidade atual de

cultivo *in vitro* do seu agente etiológico, dificultando a realização de estudos experimentais e o desenvolvimento de vacinas; propagação do bacilo que se dá principalmente por via aérea; alta infectividade e baixa virulência e patogenicidade, e período de incubação longo variando de 2 a 5 anos, dificultando a identificação de indivíduos transmissores na população; tropismo pelas células do sistema nervoso periférico, o que possibilita sua multiplicação em um ambiente pouco permissivo à ação de medicamentos e dos produtos da resposta imune (BRASIL, 2014).

O indivíduo infectado, na dependência de sua resistência natural pode desenvolver uma das formas da doença, que tem uma expressão espectral, refletindo os variáveis graus de resposta imune dos pacientes. O controle de uma infecção depende da habilidade do organismo produzir uma resposta imune eficiente que controle o agente infeccioso, mas não induza muito dano tecidual. Na hanseníase, a natureza espectral da doença é altamente dependente do tipo de resposta imune que o indivíduo infectado desenvolve, tornando-se, então, um sistema atraente de investigação do mecanismo de regulação de respostas imunes, mecanismos de patogênese e a influência genética do hospedeiro (GULIA; FRIED; MASSONE., 2010; MASSONE, *et al.*, 2010).

Estudos sobre a resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae* e seu papel na determinação de susceptibilidade e respostas imunes inatas e adaptativas facilitam o entendimento acerca das formas clínicas manifestas pelo indivíduo. A susceptibilidade ou resistência ao *M. leprae*, assim como o comportamento clínico apresentado pelos pacientes que desenvolvem a doença, são influenciados por características genéticas do hospedeiro. A existência de polimorfismos (SNPs) genéticos, mutações pontuais no genoma que ocorrem em mais de 1% das populações, explicam essa susceptibilidade/resistência a diversas doenças de herança complexa, incluindo as infecciosas. Estudos nos últimos 30 anos sobre os determinantes genéticos dessas respostas imune tem esclarecido a imunopatogênese da hanseníase e sugerem fortemente que fatores genéticos influenciam a susceptibilidade à hanseníase e sua evolução clínica (CASANOVA, *et al.*, 2002; REMUS; ALCAIS; ABEL, 2003; ALCAIS, *et al.*, 2005). No entanto, ainda há muitas lacunas a serem elucidadas a respeito dos fatores do hospedeiro que regulam a susceptibilidade à doença.

O presente estudo objetiva criar um banco de informações fenotípicas e de ácido desoxirribonucléico (DNA) de doentes com hanseníase, seus controles e familiares, e realizar

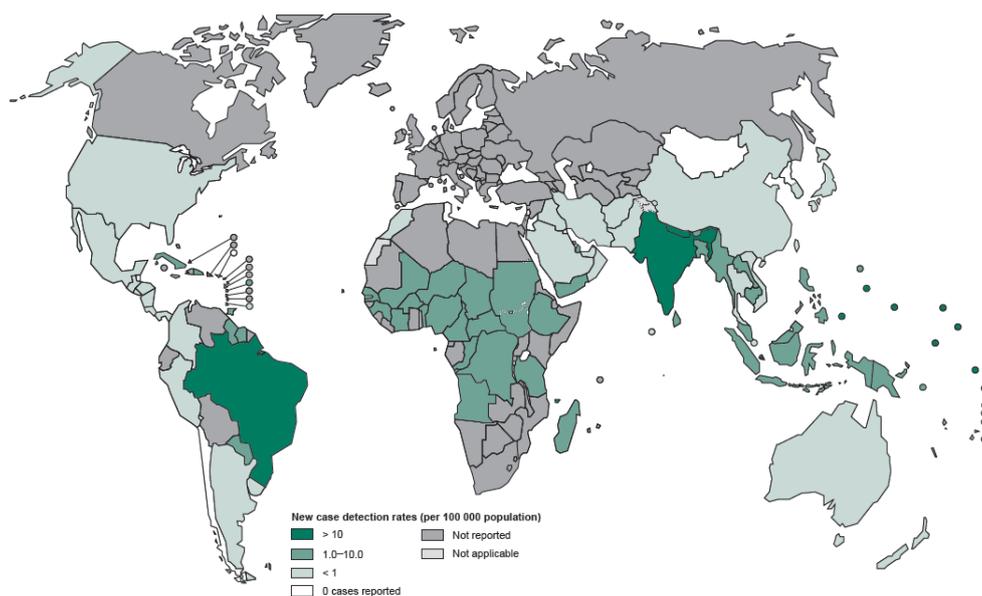
e estudos de associação de SNPs que foram associados a outras doenças causadas por agentes infecciosos intracelulares com a hanseníase e suas manifestações clínicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos da hanseníase

A hanseníase é uma doença endêmica em alguns países da África, Ásia e América Latina, inclusive no Brasil. Apesar de tratável, a detecção de casos novos indica transmissão continuada da infecção na comunidade e, de acordo com dados da OMS, no primeiro trimestre de 2014 foram detectados 180.618 casos novos em todo mundo (Figura1).

Figura 1. Mapa representando as taxas de detecção de casos novos de hanseníase no mundo por 100.000 habitantes, relatados à OMS, janeiro 2014



Fonte: WHO, 2015.

Por outro lado, no Brasil, segundo dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde em 18/06/2015, foram detectados no ano de 2014 cerca de 31.000 casos novos de hanseníase, dos quais cerca de 8% foram indivíduos com idade inferior a 15 anos. Considerando as regiões brasileiras, foram detectados 13.523 casos novos na região Nordeste e, no que se refere às unidades federativas, o coeficiente de prevalência de casos novos em Sergipe no ano de 2014 foi de 1,22/10.000 habitantes.

A proporção de indivíduos recém-diagnosticados com deformidades grau 2 em países com registro de ≥ 100 casos novos é um sensível indicador que reflete tanto grau de

conscientização da comunidade em relação à doença, como também na capacidade do sistema de saúde em detectar precocemente casos novos a fim de prevenir o aparecimento de deformidades.

2.2 Formas Clínicas e Imunopatogênese da Hanseníase

Em diversas doenças infecciosas apenas uma pequena proporção de indivíduos expostos a um patógeno torna-se infectado e desenvolve clinicamente a doença. Considerando-se a hanseníase, estima-se que cerca de 5% dos indivíduos infectados desenvolverão clinicamente a doença. Tal fato deve-se a diversos fatores tais como nutrição, diferenças genéticas da cepa e variabilidade individual. Essa variabilidade influencia tanto a manifestação ou não da doença per se quanto o subtipo da doença a ser desenvolvida devido a uma combinação de efeitos que controlam a quantidade e qualidade da interação hospedeiro/parasita e da resposta imune do hospedeiro (SHAW *et al.*, 2001; SCOLLARD, *et al.*, 2006a).

A ação coordenada do sistema imune envolve a mobilização de mecanismos inflamatórios, anti-inflamatórios ou moduladores da resposta imune. Entretanto, a falta de controle sobre uma resposta inflamatória exacerbada pode ser a maior causa de morbidade (CARVALHO, *et al.*, 2007).

2.2.1 O papel dos eventos iniciais da infecção por *M. leprae* na definição do desfecho clínico

A resposta imune inata parece decisiva na definição do curso da infecção por *M. leprae*. Os bacilos de *M. leprae* são inicialmente reconhecidos por vários receptores imunes inatos, incluindo os receptores Toll-like (TLRs). O bacilo *M. leprae* predominantemente ativa o heterodímero TLR2/1, o qual medeia a ativação de célula para iniciar a destruição do *M. leprae*. TLR2 e TLR1 são mais fortemente expressos nas lesões da forma HT localizada em comparação com a forma HV disseminada da doença (KRUTZIK, *et al.*, 2003; KRUTZIK, *et al.*, 2005; MAEDA, *et al.*, 2005; MODLIN, 2010).

Citocinas como IL-15 e IL-10 são produzidas durante a resposta imune inata e são conhecidas por regular a função de macrófagos. Elas são, no entanto, diferencialmente expressas nas lesões hansênicas. IL-15 é expressa em lesões de HT e induz a atividade

antimicrobiana do macrófago e vias antimicrobianas mediadas pela vitamina D resultando em fagocitose limitada de micobactérias e limitando sua capacidade de estabelecer a infecção (JULLIEN, *et al.*, 1997). Além disso, a vitamina D também regula o peptídeo antimicrobiano catelicidina o qual ajuda a eliminar o *M. leprae* e também tem sido detectado predominantemente na forma de HT. Neste contexto, a célula apresentadora ativada induz a diferenciação de células T para o fenótipo Th1 que, por sua vez, ativa os macrófagos infectados pela liberação de IFN- γ e GM-CSF.

Na HV, a IL-4 tanto diminui a expressão de TLR2/1 quanto inibe respostas de citocinas induzidas por essa via. Embora a IL-10 não tenha efeito sobre a expressão de TLR2/1 pode inibir fortemente a liberação da citocina TLR2/1-induzida (KRUTZIK, *et al.*, 2005). A ativação de leucócitos e de imunoglobulinas, tal como o receptor do membro da subfamília A 2 (LILRA2), inibe a liberação de IL-12 TLR2/1-induzido, mas mantém a liberação de IL-10. LILRA2 é mais expresso em HV em relação às lesões HT (PENNA, *et al.*, 2008) e as células que expressam LILRA2, identificadas nas lesões virchowianas, pertencem a uma linhagem de monócitos/macrófagos e expressam CD209. Essa molécula se liga a uma lectina tipo C (lipoglycan mannosylated lipoarabinomanano (ManLAM), o principal componente da parede celular de micobactérias. Da mesma forma, fosfolípidios oxidados também inibem TLR2/1-induzida por IL-12, mas preserva a liberação de IL-10 (BLEHARSKI, *et al.*, 2003). Complexos imunes, que são abundantes na forma HV, podem desencadear a diferenciação dos macrófagos para a produção de IL-10 (TRIPP, *et al.*, 1995; MOSSER, EDWARDS, 2008).

A via fagocítica induzida em macrófagos por IL-10 é mais evidente em pacientes acometidos pela hanseníase que progridem para a forma clínica HV (TRIPP; BECKERMAN; UNANUE. 1995; MOSSER, EDWARDS 2008). A IL-10-derivada do macrófago aumenta a fagocitose de lipoproteína de baixa densidade e micobactérias, sem a capacidade de desencadear a via antimicrobiana dependente de vitamina D. Essa divergência entre as vias fagocíticas e antimicrobianas provavelmente promove um ambiente intracelular que favorece a sobrevivência de micobactérias.

A absorção de lipídios inibe a resposta imune inata contra as bactérias por diminuir a atividade antimicrobiana induzida por TLR e desviar o equilíbrio de citocinas para induzir mais IL-10 e menos IL-12 (CRUZ, *et al.*, 2008). As biópsias de lesões de HV exibem macrófagos totalmente envoltos por gotículas lipídicas (LD). A aparência dessas células repletas de lipídios levou ao patologista Rudolph Virchow (VIRCHOW, 1963) a chamá-los de macrófagos espumosos (RUSSELL, *et al.*, 2009). Mecanismos adicionais, tais como a

sobrevivência celular aprimorada pela redução da apoptose, também podem contribuir para o aspecto espumoso característico do macrófago das lesões virchowianas (HALVORSEN, *et al.*, 2005).

O processo de absorção de lipídeos se inicia no complexo Golgi-retículo endoplasmático com a formação de vesículas contendo lipídios, fosfolipídios, éster de colesterol e colesterol. Esse processo é estimulado pela perilipina e a proteína de diferenciação adiposa relacionada (ADRP), que são marcadores moleculares para a formação de LD (TANIGAWA, *et al.*, 2008;). Além disso, há um aumento na síntese de receptores LDL com acúmulo intracelular de colesterol endógeno (MATTOS, *et al.*, 2014). Estudos recentes têm associado a infecção por *M. leprae* e outros patógenos intracelulares obrigatórios com uma desregulação dos lipídios do hospedeiro e o acúmulo de LD em alguns tipos de células (D'AVILA, *et al.*, 2006). No entanto, micobactérias não-patogênicas, tal como *Mycobacterium segmentalis*, não induzem a formação de LD (MATTOS, *et al.*, 2011a).

Durante a infecção, o *M. leprae* estimula o metabolismo lipídico e expressão gênica nos macrófagos (CRUZ, *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado que a formação de LD em resposta às bactérias é dependente da sinalização TLR, principalmente através de TLR2 e TLR6, uma vez que os macrófagos de camundongos deficientes em TLR não acumulam LD em resposta a agentes patogênicos (D'AVILA, *et al.*, 2006; MATTOS, *et al.* 2011b). Por outro lado, a formação de LD nas células de Schawnn depende apenas TLR6. Adicionalmente, o LD é formado "in vitro" nos macrófagos por células mortas ou moléculas purificadas do *M. leprae*, mas não são formados "in vitro" nas células de Schawnn, sugerindo diferentes mecanismos de formação de LD nessas células durante a infecção (D'AVILA, *et al.*, 2006).

É provável que a formação LD forneça nutrientes importantes para a manutenção dessa bactéria no hospedeiro (CARDOSO, *et al.*, 2011a). Isto é corroborado pelo fato de que o *M. leprae* apresenta um genoma relativamente pequeno faltando vários genes do metabolismo básico. Portanto, o patógeno é fortemente dependente do hospedeiro para funções metabólicas básicas e, assim, induz o metabolismo lipídico do hospedeiro. A possibilidade de que os ácidos graxos sejam a principal fonte de energia para o *M. leprae* é sugerida pela presença de dois genes de codificação lipase e fosfolipase em seu genoma, que são responsáveis pela degradação de lipídios do hospedeiro (HAGGE, *et al.*, 2002; RUSSELL, *et al.*, 2009).

Além de ser uma fonte de nutrientes, LDs são precursores de eicosanóides como leucotrienos (LTs), prostaglandinas (PGE2) e lipoxina (LTB4), que são mediadores inflamatórios ou inibidores potentes. Observou-se aumento da produção de PGE2 em

macrófagos e células de Schwann infectados com o *M. leprae*, fato que se correlaciona com a natureza imunossupressora e uma mudança para resposta Th2 em HV. Neste contexto, a presença de LD favorece a inibição da resposta Th1, que é importante para a eliminação do patógeno e parece contribuir para a fisiopatologia da forma virchowiana da doença (van der MEER-JANSSEN, *et al.*, 2010; MATTOS, *et al.*, 2011a).

Portanto, o conhecimento dos eventos que levam à formação de LD pode ajudar a elucidar os mecanismos da fisiopatologia da hanseníase. Para essas análises de etiologia da LD, somam-se estudos de SNPs genéticos associados a TLRs e outras moléculas envolvidas na formação de LD, dado que características genéticas podem ser associadas com infecção e a prevalência das formas clínicas da doença (CARDOSO, *et al.*, 2011a).

Além disso, as lesões da HV caracterizam-se por um déficit expressivo em DCs, tanto na derme quanto na epiderme (SIELING, *et al.*, 1999; SIMÕES-QUARESMA, *et al.*, 2009). DCs são indutores mais potentes de respostas de células T que macrófagos e sua deficiência poderia fornecer uma explicação simples para a resposta imune celular reduzida em lesões HV (RIDLEY, JOPLING, 1966). DCs se diferenciam dos precursores mielóides e esse processo pode ser interrompido por receptores inibitórios ou fosfolipídios oxidados derivados do hospedeiro (BLEHARSKI, *et al.*, 2003).

Vale também ressaltar que os monócitos periféricos de pacientes virchowianos não se diferenciam em CD1 + DC após a ativação de TLR (KRUTZIK, *et al.*, 2005). Ao contrário de outras micobactérias, *M. leprae* pode inibir diretamente a ativação e maturação de DC (MURRAY, *et al.*, 2007; SANTOS, *et al.*, 2007). As maiores quantidades de IL-4 e IL-10 produzida pelas células apresentadoras podem contribuir para a indução da diferenciação de células T para os fenótipos Th2 e T regs, que mantêm controle ineficaz da multiplicação de *M. leprae*.

A resposta imune mediada por células é um importante aspecto da resistência do hospedeiro à infecção por micobactérias e sua regulação se deve ao equilíbrio entre citocinas tipo 1 incluindo IL-2, IFN- γ , fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-12 e as citocinas tipo 2 tais como IL-4, IL-6 e IL-10. A IL-12 induz a diferenciação das células T helper 1 (Th1) e o IFN- γ participa da resposta imune contra as micobactérias via ativação de macrófagos. A IL-10, por sua vez, é uma citocina contrarregulatória que pode afetar os efeitos da IL-12. A produção de IL-10 durante a infecção bacteriana pode suprimir a produção de mediadores inflamatórios e ajudar no desenvolvimento da imunidade Th2 (KANG *et al.*, 2004).

2.2.2 Classificação clínica e imunopatogênese da hanseníase

Existem diversas classificações descritas para a Hanseníase, sendo que a classificação clínico-histopatológica considera seis formas da doença: indeterminada, tuberculóide, virchowiana, e as formas dimorfa (dimorfa tuberculóide, dimorfa dimorfa e dimorfa virchowiana). A forma **indeterminada** constitui a forma inicial da doença a qual se manifesta com aparecimento de manchas hipocrômicas ou eritemato-hipocrômicas ou, até mesmo, áreas circunscritas de pele aparentemente normal que apresentam distúrbios de sensibilidade, queda de pelos e ausência de horripilação. As lesões podem ser únicas ou múltiplas, e têm localizações e tamanhos variáveis. A biópsia apresenta infiltrado inflamatório mononuclear inespecífico, com agrupamento de células inflamatórias em torno de folículos pilosos e plexos nervosos da derme. Nesses casos não há comprometimento de troncos nervosos e, conseqüentemente, os indivíduos acometidos não apresentam incapacidades e não transmitem a doença (SCOLLARD, *et al.*, 2006).

A forma **tuberculóide** é caracterizada por máculas hipocrômicas ou eritematosas, difusamente infiltradas, de bordas bem delimitadas. Apresentam tendência ao aplainamento no centro da lesão, mantendo os limites externos bem nítidos e definidos. Podem surgir lesões únicas ou em pequeno número e, geralmente, apresentam distribuição assimétrica. A histopatologia da lesão evidencia infiltrado inflamatório rico em linfócitos e com formação de granulomas e pobres em bacilos. Os pacientes podem apresentar danos neurais manifestados como alterações sensitivas, tais como hipoestesia e anestesia, e alterações autonômicas, como, por exemplo, hipoidrose e alopecia. É comum o acometimento de troncos nervosos próximo às lesões cutâneas. Existe ainda uma forma clínica especial, variante da Hanseníase Tuberculóide, em que não há acometimento cutâneo, denominada Hanseníase Neural Pura (SCOLLARD, *et al.*, 2006; ALTER, *et al.*, 2008).

O TNF, além de ativar os macrófagos, induz a expressão nas células do endotélio vascular de moléculas de adesão que tornam a superfície endotelial adesiva para leucócitos e estimula células endoteliais e macrófagos a secretar quimiocinas as quais induzem a quimiotaxia de leucócitos (BELGAUMKAR *et al.*, 2007). Estas funções estão também envolvidas na produção de granulomas que limitam com sucesso a disseminação da bactéria.

Na hanseníase **virchowiana** existe uma ativação da resposta Th2 com produção da IL-4 e IL-10. A ativação da resposta Th2 suprime a resposta Th1, impedindo a formação de

granulomas e favorecendo a replicação da bactéria com contínua infiltração de pele e nervos. As lesões têm limites imprecisos e uma tonalidade ferruginosa típica. Quando há uma infiltração acentuada na face, com acentuação dos sulcos naturais e conservação dos cabelos, configura-se a clássica “fáscies leonina” da hanseníase. A histopatologia da lesão evidencia a presença de infiltrado inflamatório com grande maioria de macrófagos espongíoides ricos em bacilos que coram pelo método de Ziehl Nielsen, com escassez de linfócitos na lesão. Nessa forma clínica os doentes têm cargas altas de bacilos pelo corpo, configurando a forma multibacilar e mais contagiosa da doença. Felizmente o contágio cessa com instituição do tratamento específico (ALTER *et al.*, 2008). Os linfócitos T CD4⁺ Th2 produzem citocinas como IL-4, IL-13 e IL-10. IL-10 inibe os macrófagos e células dendríticas (DC) ativadas e tem uma potente ação inibidora nas células tanto da imunidade natural ou inata como nas células da imunidade adquirida, tanto Th1 quanto Th2 (SCRIBA; KALSDORF; ABRAHAMS, 2008).

Entre os dois pólos, o tuberculóide e o virchowiano, existem as formas intermediárias, “borderline”, classificadas como hanseníase **dimorfa**. Os casos típicos da forma dimorfa (**dimorfa dimorfa**), apresentam placas com uma área central circular de pele hipocrômica ou de aparência normal, bem delimitada, e que se difunde na periferia, perdendo os seus limites gradual e imprecisamente na pele circundante (lesões “esburacadas”, “em favos de mel”, ou “em queijo suíço”). As biópsias mostram um padrão misto de lesão, com áreas ricas em infiltrado inflamatório e presença de granulomas, com aspecto tuberculóide, e outras áreas com infiltrado rico em macrófagos intensamente infectados, com aspecto virchowiano. A carga bacilar tende a ser alta, sendo uma forma contagiosa. Os nervos periféricos são comprometidos com frequência e esse comprometimento é intenso e extenso. A forma dimorfa pode apresentar tanto lesões onde predomina o aspecto da forma tuberculóide (dimorfa tuberculóide), quanto aquelas com aspecto da forma virchowiana (dimorfa virchowiana) (BRITO *et al.*, 2008).

Os sinais cardinais da hanseníase são lesões cutâneas com alteração de sensibilidade, nervos periféricos espessados e a presença de bacilos álcool-ácido resistentes visualizada durante a biópsia de pele (VILLARROEL, *et al.*, 2007). De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), considerando o resultado do exame de esfregaço ou o número de lesões no momento do diagnóstico, os pacientes são classificados em dois grupos operacionais: paucibacilares (PB) e multibacilares (MB).

2.2.3 Aspectos clínicos e imunopatogênese das complicações hansênicas

2.2.3.1 Reações hansênicas

Os mecanismos responsáveis por desencadear as reações hansênicas ainda não estão totalmente esclarecidos. Os mediadores do dano tecidual nessas reações são parcialmente conhecidos; aumento dos níveis de citocinas Th1 como IFN- γ , IL-12 e IL-2 foram demonstrados na reação reversa e eritema hansênico nodoso (BRITTON, LOCKWOOD, 2004; SCOLLARD, *et al.*, 2006; MISCH, *et al.*, 2010). Contudo ainda se faz necessário esclarecer se o perfil inflamatório observado no local da lesão ou no sangue é causa ou consequência dessas reações.

Reação reversa (RR)

A reação reversa acontece em 30% dos pacientes e, além de representar a ativação súbita de uma resposta inflamatória aos antígenos do *M. leprae*, é a principal causa de lesão neurológica na hanseníase. Ela ocorre habitualmente, embora não exclusivamente, nas categorias dimórfas (DV, DT ou DD), muitas vezes após o início do tratamento e refletem um gatilho de uma resposta predominante Th2 em direção a uma resposta Th1 (LOCKWOOD, *et al.*, 1993; BRITTON, LOCKWOOD 2004; MISCH, *et al.*, 2010). Apesar de surgir em qualquer fase da doença, há um risco maior de ocorrência da RR nos dois primeiros meses de tratamento (BRITTON, LOCKWOOD, 2004; SHEN, *et al.*, 2009).

Edema das mãos e pés e envolvimento neural, caracterizada por espessamento de um ou mais nervos periféricos, manifestando como neurite silenciosa sem dor, mas principalmente como uma neurite extremamente dolorosa, são frequentes mas preveníveis. Alguns investigadores consideram também que estas reações podem se manifestar com apenas comprometimento neurológico, sem alteração nas lesões dermatológicas (KAHAWITA, LOCKWOOD, 2008).

A reação reversa deve ser diferenciada de recaídas, especialmente em formas de hanseníase dimórfica tuberculóide e HT. Geralmente considera-se que os casos de recaída ocorrem dentro de um ano da conclusão da multidrogaterapia (MDT). Ao contrário do que ocorre na RR, a recaída é insidiosa e pode ser acompanhada de eritema leve de algumas lesões antigas, geralmente com transtorno neurológico leve e sem grandes mudanças na condição geral do paciente (SIDDIQUI, *et al.*, 2002; van VEEN, *et al.*, 2009).

Tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adaptativa participam na patogênese das lesões de RR. As lesões da RR estão relacionadas a uma reação de hipersensibilidade do tipo IV e estudos de imunofenotipagem identificaram que o número e a porcentagem de células T CD4⁺ estão aumentadas em lesões de pele (STEFANI *et al.*, 2003; SCOLLARD, *et al.*, 2006; STEFANI, *et al.*, 2009). A via antimicrobiana dependente de vitamina D está ativada e IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 p40, IFN- γ e TNF, IL-2 R (TUNG, *et al.*, 1987) e CXC quimiocina-10 (CXCL10 ou IP10) são detectados tanto no soro ou plasma desses pacientes quanto nas lesões cutâneas (STEFANI, *et al.*, 2009). O padrão de expressão de citocinas nas lesões indica aprimoramento da resposta Th1 ou relacionado à ativação da resposta imune inata e produtos inflamatórios.

Eritema nodoso hansênico (ENH)

ENH envolve níveis elevados de fator de necrose tumoral (TNF) (SARNO, *et al.*, 1991), infiltração de tecido por células T CD4⁺ e neutrófilos (KAHAWIT; LOCKWOOD, 2008), deposição de complexos imunes e ativação do sistema complemento, resultando em vasculite associada a complexo imune (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

O ENH afeta pacientes com respostas imune celular pobre mas resposta humoral preservada e, portanto, surge em pacientes MB com altos níveis de imunoglobulinas anti-*M.leprae*. Embora o ENH apresente a tendência de ocorrer mais tarde durante a MDT (após o sexto mês de tratamento), ele pode preceder o diagnóstico ou surgir apenas após a conclusão da MDT (KAHAWITA, LOCKWOOD 2008; LOCKWOOD, *et al.*, 2008; SHEN, *et al.* 2009).

No ENH, as lesões preexistentes tendem a permanecer inalteradas, e há um início abrupto de nódulos eritematosos, habitualmente dolorosos. Os pacientes frequentemente apresentam edema de face, mãos e pés, estado geral de saúde precário além de sinais e sintomas gerais tais como febre, toxemia, ingurgitamento de linfonodos, dor muscular e óssea (geralmente tibial), artrite, irite, iridociclite, orquite, epididimite, neurite, glomerulonefrite e hepatoesplenomegalia. A neurite é menos agressiva do que a observada na RR (KAHAWITA; LOCKWOOD, 2008), apesar de ocorrer deterioração da função nervosa. Fenômeno de Lucio e eritema multiforme têm sido relatados como variantes ENH grave (SCOLLARD *et al.*, 1992; SCOLLARD *et al.*, 2006). No Fenômeno de Lúcio, ou necrótico Eritema nodoso hansênico, os nódulos cutâneos podem evoluir para pústulas e bolhas, com posterior ulceração e necrose.

O ENH pode persistir por anos como uma forma crônica e recorrente na maioria dos pacientes (KAHAWITA; LOCKWOOD 2008). Também são descritos quadros de reações

intermitentes com duração de uma a duas semanas intercalando períodos assintomáticos de um a dois meses. Muito raramente, o ENH pode ser confundido com a recaída, a qual leva ao aparecimento de novas lesões de esfregaço e progressão lenta inclusive com agravamento de lesões pré-existentes.

Imunologicamente, o ENH é consistente com uma reação de hipersensibilidade tipo III, geralmente iniciada pela deposição de imunocomplexos e ativação do complemento. O ENH é considerado uma doença mediada por complexos imune, com os níveis de imunoglobulinas aumentados e baixos níveis de componentes do complemento (um sinal de ativação do complemento) e a presença de fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB) (SCOLLARD *et al.* 2006; STEFANI, *et al.*, 2009). As citocinas se assemelham àquelas mencionadas para RR, embora em níveis mais elevados. Ademais, no ENH também há incremento nos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, IL-7 e TNF (TUNG *et al.*, 1987; SARNO, *et al.*, 1991; SMITH, *et al.*, 2004).

As lesões agudas existentes do ENH são caracterizadas por um infiltrado neutrofílico sobreposto a um padrão crônico virchowiano. As lesões do ENH se apresentam com depósitos de imunoglobulinas e complemento e algumas micobactérias constituintes (RIENECK, *et al.*, 1993). Além das citocinas, RNAs encontrados na RR, o aumento da expressão dos genes que codificam IL-6, IL-8 e IL-10 e expressão sustentada de IL-4 e IL-5 observadas nas lesões do ENH são consistentes com a quimiotaxia de neutrófilos e a produção de anticorpos (SCOLLARD, *et al.*, 2006; BELGAUMKAR, *et al.*, 2007). As reações mais graves estão associadas com aumento da produção de TNF e IFN- γ . Além disso, injeções de IFN- γ podem desencadear lesões típicas de ENH. Possíveis interpretações do papel do IFN- γ no ENH pode contribuir para a recuperação temporária da capacidade microbida dos macrófagos durante o tratamento da hanseníase (PARTIDA-SANCHEZ, *et al.*, 1998; MOTTA, *et al.*, 2010).

Os imunomoduladores que regulam a expressão de gene do TNF- α podem ser utilizados na terapia para ENH (SCOLLARD, *et al.*, 2006a; PENNA, *et al.*, 2008). A talidomida é eficaz no controle de sintomas cutâneos e sistêmicos do ENH graças à inibição do TNF (KAHAWITA, LOCKWOOD, 2008). A Talidomida pode ser usada na dose de 100 a 400 mg/dia e deve ser mantida até o controle clínico ser atingido. Devido a seus conhecidos efeitos teratogênicos, o tratamento de talidomida deve ser evitado em mulheres em idade fértil. Outras opções terapêuticas incluem pentoxifilina, clofazimina, azatioprina, metotrexato, corticosteróides e os anticorpos monoclonais anti-TNF (HAGGE, *et al.*, 2009). Os

corticosteróides são recomendados para pacientes com nefrite, irite ou iridociclite, orquiepidimite, fenômeno de Lúcio ou reação em mãos e pés.

2.2.3.2 Lesão neurológica

A neuropatia está presente em todas as formas de hanseníase. Com efeito, a lesão neurológica é a marca da infecção progressiva por *M. leprae* e envolve nervos mielinizados e amielínicos (HAGGE *et al.*, 2009; JOB). O principal fator determinante da lesão neurológica na hanseníase é a capacidade única do *M. leprae* se ligar e infectar as células de Schwann. O *M. leprae* infecta as células de Schwann, porque tal bacilo contém uma proteína de 21k Da, denominada proteína de ligação à laminina do *M. leprae* (ML-LBP₂₁), capaz de interagir com o receptor de laminina-2 localizado na membrana da célula de Schwann (MISCH *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2000; RAMBUKKANA, 2001). A ML-LBP₂₁ então medeia a entrada do *M. leprae* na célula de Schwann (RAMBUKKANA, 2001).

A deformidade física na hanseníase é definida como qualquer redução nas funções sensoriais ou motoras. A deformidade infelizmente é uma complicação comum e consequente ao curso natural da doença devido ao envolvimento neurológico inerente a todas as formas de hanseníase (KAHAWITA, LOCKWOOD, 2008). Pacientes afetados podem desenvolver mão em garra, pé caído, paralisia facial, lagofalmo e até mesmo cegueira, perda sensorial e espessamento neural focal ou segmentar.

A neurite, seja silenciosa ou sintomática, é responsável pela rápida deterioração funcional. Para evitar danos neurológicos irreversíveis, a identificação dos fatores de risco e sinais de neurite indicam a necessidade de tratamento adequado e premente (van VEEN, *et al.*, 2008). Estudos epidemiológicos indicam que os pacientes MB e aqueles com neurite têm um risco maior de desenvolver deformidades (PIMENTEL, *et al.*, 2004). Smith e colaboradores descobriram que qualquer envolvimento neurológico em pacientes MB, mesmo subclínico, é um preditor de lesões neurológicas permanentes (SMITH, *et al.*, 2004). Atraso diagnóstico, neurite ou danos neurológicos já presentes no momento do diagnóstico, e a ocorrência de RR são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de comprometimento neurológico.

A imunopatogênese do dano neural durante a hanseníase varia com o tipo de resposta imune que o paciente apresenta. Os pacientes com forma tuberculóide apresentam envolvimento dos troncos nervosos de início súbito e assimétrico enquanto pacientes com forma virchowiana geralmente apresentam neuropatia simétrica e insidiosa. O dano neural é

identificado clinicamente através de dor quando da palpação dos nervos afetados, parestesia ou dormência, força muscular reduzida e/ou imprecisão do movimento.

Os principais nervos acometidos na hanseníase são radial comum, ulnar, mediano, fibular e posterior da tibia (KAHAWITA; LOCKWOOD, 2008; SCHURING, *et al.*, 2008; SCOLLARD, 2008). Uma minoria dos pacientes pode apresentar neurite silenciosa. Fatores de risco para lesão neurológica incluem baciloscopia positiva, respostas positivas anti-PGL-I, reações hansênicas e envolvimento neurológico anterior (PIMENTEL, *et al.* 2004; SMITH, *et al.* 2004; SCHURING, *et al.*, 2008).

Medidas para a prevenção de deficiências neurológicas incluem exame neurológico sistemático durante o seguimento dos pacientes e o uso de corticoterapia assim que a neurite seja identificada. Exames neurológicos podem ser executados usando a escala de grau máximo de incapacidade estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A sensibilidade e os valores preditivos negativos de tais exames são em torno de 50% e 88%, respectivamente (VILLARROEL, *et al.*, 2007). Este exame deve ser realizado no início, meio e fim da MDT, ou a qualquer momento, caso o paciente apresente sintomas neurológicos.

A corticoterapia prolongada é o tratamento de escolha para neurite. É possível haver regressão do dano neural caso a duração da lesão seja inferior a seis meses (RICHARDUS, *et al.*, 2003; van VEEN, *et al.*, 2008).

Em pacientes no pólo tuberculóide, a resposta Th1 é ativada e o desenvolvimento expressivo da imunidade celular contribui para formação de granulomas tuberculóides e necrose caseosa, os quais podem culminar com o aparecimento de abscessos e contribuir para a destruição dos nervos (SCOLLARD, *et al.*, 2006).

Há uma associação entre a produção de IFN- γ e dano neural, com níveis de IFN- γ diretamente proporcionais ao número de nervos danificados. Isto poderia explicar a presença de lesões neurais em pacientes com forma clínica tuberculóide. Por outro lado, pacientes com a forma clínica virchowiana exibem resposta Th2 e a neuropatia está relacionada à infecção dos nervos periféricos pelo *M. leprae* (BELGAUMKAR, *et al.*, 2007).

A proteína 19 kDa do *M. leprae*, que é reconhecida pelo TLR2/1 heterodímero, provoca uma resposta robusta de citocinas pró-inflamatórias e induz a apoptose das células de Schwann (KRUTZIK, *et al.*, 2003). Além disso, as células de Schwann expostas a neurônios necróticos "in vitro" produzem TNF e óxido nítrico (LEE, *et al.*, 2006) e esses potentes mediadores inflamatórios podem perpetuar a lesão neuronal. Células infectadas em nervos

periféricos são capazes de processar e apresentar antígenos, que podem torná-las alvos da resposta imune. Em consonância a esse fato, foi demonstrado que células T CD8⁺ citotóxicas podem ter como alvo células de Schwann humanas infectadas com antígeno de *M leprae*. (MISCH, *et al.* 2010).

Como mencionado anteriormente, as reações hansênicas são a principal causa de lesões neurológicas na hanseníase. Na RR, uma hipersensibilidade do tipo tardia dirigida contra antígenos de *M. leprae* liberados pelas células de Schwann desencadeia a agressão neural e subsequentes danos. No ENH, por sua vez, a lesão neuronal é secundária à deposição local de complexos imunes e consequente dano tecidual (KAHAWITA, LOCKWOOD 2008; SCHURING, *et al.*, 2008; SCOLLARD, 2008).

2.3 Aspectos Imunogenéticos na hanseníase:

Em diversas doenças infecciosas apenas uma pequena proporção de indivíduos expostos a um patógeno torna-se infectado e desenvolve clinicamente a doença. Considerando-se a hanseníase, estima-se que cerca de 5% dos indivíduos infectados desenvolverão clinicamente a doença. Tal fato deve-se a diversos fatores tais como nutrição, diferenças genéticas da cepa e variabilidade individual. Essa variabilidade influencia tanto a manifestação ou não da doença per se quanto o subtipo da doença a ser desenvolvido devido a uma combinação de efeitos que controlam a quantidade e a qualidade da interação hospedeiro/patógeno e resposta imune do hospedeiro (SHAW *et al.*, 2001; SCOLLARD, *et al.*, 2006).

Vários procedimentos podem ser empregados para mapear e identificar genes de susceptibilidade do hospedeiro a uma determinada doença. Alguns dos procedimentos mais utilizados são modelo animal, especialmente camundongos, a varredura de genoma e estudo de genes candidatos. No uso do modelo animal assume-se que a história natural da doença infecciosa nesse modelo é semelhante à que ocorre em humanos. Sua principal contribuição se refere à identificação dos genes e das vias bioquímicas envolvidas na susceptibilidade à doença. Entretanto, a identificação das variações gênicas específicas da relação resistência/susceptibilidade pode ser prejudicada devido à possível divergência dessas variações entre as espécies (MARQUET; SCHURR, 2001).

Na varredura de genoma, por sua vez, os diversos microssatélites espaçados ao longo de todo genoma ou os SNPs são utilizados para análise de ligação empregando famílias com membros afetados pela doença em estudo (MARQUET, SCHURR, 2001; ALTER *et al.*, 2008). Entretanto, devido à amplitude das regiões analisadas, frequentemente vários genes candidatos são identificados tornando o procedimento muito laborioso e caro (ALTER *et al.*, 2008).

Os polimorfismos são variações genéticas que podem situar-se nas regiões de codificação de genes ou regiões intergênicas podendo afetar, ou não, a sequência de proteínas ou seus níveis de expressão. Os SNPs também existem como maiores sequências de nucleotídeos, por exemplo, sequências repetitivas de DNA representadas por um número variável de repetições consecutivas (SHA, *et al.*, 2010).

O estudo de gene candidato testa as variantes gênicas por associação com um fenótipo (ALTER, ALCAÏS, ABEL, 2008). Os genes são geralmente selecionados tendo como base o conhecimento anterior ou forte suspeita da participação dos supostos genes na patogênese da doença e presença de SNPs intra e/ou intergênicos de possível significado biológico. As variações dos genes candidatos podem ser estudadas por estudo de ligação, denominado estudo de família, e/ou por estudo de associação, o qual pode ser classificado como estudo de caso-controle, TDT (*Transmission disequilibrium test*) ou FBAT (*Family-based association test*) (MARQUET; SCHURR, 2001). Estudos genéticos têm sido realizados na área de doenças de herança complexa, como as infecto-parasitárias, autoimunes e neoplásicas, incluindo estudos de varredura do genoma e estudos de associação com genes candidatos, mostrando ligação e associação de diversos genes de citocinas com estas doenças (WILSON; DUFF, 1995).

A resposta imune contra agentes infecciosos é um processo que requer a interação das respostas imunes inata e adaptativa. Cada uma das etapas que compõem estas respostas pode estar afetada por SNPs genéticos, os quais determinam no indivíduo uma maior ou menor susceptibilidade aos patógenos e variações nos mecanismos patogênicos das doenças. Estudos recentes em tuberculose, doença de Chagas e leishmaniose, doenças essas causadas por agentes intracelulares, também mostram uma associação entre SNPs de genes que codificam citocinas, quimiocinas e seus receptores com as manifestações clínicas dessas doenças (CASTELLUCCI, 2005; MENEZES, 2007; RAMASAWMY, 2006; FLORES-VILLANUEVA *et al.*, 2005; KIRKALDY *et al.*, 2003).

Em hanseníase, muitos estudos têm demonstrado a influência genética na aquisição e curso clínico da doença, tanto no que se refere à forma clínica manifesta quanto ao surgimento de reações hansênicas (ALTER, *et al.*, 2008; GULIA, *et al.*, 2010).

Alguns genes candidatos mais promissores já estudados na hanseníase ou em outras doenças por agentes intracelulares serão descritos a seguir.

2.3.1 Padrões moleculares associados a patógeno (PAMP)

Padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) são estruturas microbianas que são exclusivas de patógenos e são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes nas células do sistema imunológico inato. A resposta imune inata é importante para a defesa inicial contra patógenos e também por orquestrar as respostas tardias induzidas pelas células T.

O primeiro nível de interação é o reconhecimento do *M. leprae* pelas células do hospedeiro pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - receptores Toll-like [TLRs] e NOD2) e pelos receptores associados à adesão do *M. leprae* propiciando adesão e sua entrada nas células de Schwann e macrófagos (receptor de manose C tipo 1, a2 laminina e receptor complemento). Variações genéticas nesses receptores podem afetar drasticamente o resultado da doença, simplesmente por modular a ativação de células, bloquear ou diminuir a taxa de absorção do *M. leprae* (CARDOSO, *et al.*, 2011a).

Polimorfismos de receptores do tipo Toll (TLR)

Estudos realizados em pacientes com hanseníase indicam uma associação entre o SNP em TLR1, TLR2 e TLR4 com a susceptibilidade/resistência a essa doença e em seus resultados clínicos. Um SNP envolvendo mudança de timina para guanina (1805T/G) em TLR1 resulta em uma substituição não sinônima na posição do aminoácido 602 (I602S), uma posição que reside na região citoplasmática proximal ao domínio do receptor transmembrana (HAWN, *et al.*, 2007). O alelo 1805G (I602S) é expresso em níveis inferiores na superfície da célula onde fortemente regula a sinalização de NF- κ B (HAWN, *et al.*, 2007) e está associada com a produção diminuída de IL-1 β , IL-6 e TNF em células mononucleares de sangue periférico estimuladas com *M. leprae* (MISCH, *et al.*, 2008).

Wong e colaboradores (2010) realizaram uma análise de associação com mais de 1.500 indivíduos usando estudo de caso-controle e família e observaram associações consistentes entre variantes genéticas em ambos TLR1 e as regiões de HLA-DRB1/DQA1 com proteção para hanseníase (WONG, *et al.*, 2010). A amplitude do efeito dessas associações sugerem que

TLR1 e HLA-DRB1/DQA1 são os principais genes que contribuem para a suscetibilidade à hanseníase (MISCH, *et al.*, 2008).

Polimorfismos em TLR2 também têm sido associados à susceptibilidade a várias doenças infecciosas, incluindo infecções micobacterianas (BOCHUD, *et al.*, 2007). Uma mutação de TLR2, Arg677Trp, tem sido associada significativamente a menor produção de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α , níveis mais elevados de IL-10, em comparação com PBMC daqueles com o gene TLR2 do tipo selvagem. Estes dados sugerem que esta mutação TLR2 fornece um mecanismo molecular que explica a resposta imune celular pobre dos pacientes HV (KANG, *et al.*, 2004).

Tanto o SNP 597C/T, o qual não afeta a sequência de aminoácidos (N199N) no domínio extracelular de TLR2, quanto o SNP de microssatélite TLR2 também têm sido associados à susceptibilidade a reações hansênicas. Bochud e colaboradores (2008), em um estudo de seguimento durante 8 anos envolvendo pacientes acometidos por hanseníase na Etiópia, demonstraram que o alelo 597T tinha um efeito protetor contra reações hansênicas (OR, 0,34 [95% CI, 0,17 – 0,68]; $p = 0,002$ sob um modelo dominante). A função deficiente de TLR4 tem sido geralmente associada com aumento da susceptibilidade a várias infecções por micobactérias. Bochud e colaboradores (2009) observaram frequências mais baixas de dois SNPs que estão associados a alterações de aminoácidos no TLR4 D299G (OR = 0,34, $P < 0,001$) e T399I (OR = 0,16, $P < 0,001$) entre os pacientes com hanseníase de origem etíope (BOCHUD, *et al.*, 2009). Por outro lado, um estudo menor não encontrou associação de proteção de TLR4 D299G entre os pacientes de hanseníase no Malawi (FITNESS; TOSH; HILL, 2002).

NOD2

Os receptores Nod-like (NLR) são uma família de PRRs citosólica que detectam produtos microbianos de parede celular. O receptor domínio de oligomerização da ligação de nucleotídeo 2 (NOD2) é ativado pela ligação a dipeptídeos muramil (MDP), peptídeos existentes no peptideoglicano de diversas micobactérias (FERWERDA *et al.*, 2005; FERWERDA, *et al.*, 2007). Sugere-se que variantes genéticas NOD2 influenciam a susceptibilidade à hanseníase e o desenvolvimento de RR e ENH (BERRINGTON, *et al.*, 2010).

Três estudos recentes de associação genética, incluindo estudos de associação de genética em larga escala (GWAS) examinaram o papel de SNPs no gene NOD2 na hanseníase

(ZHANG, *et al.*, 2009; BERRINGTON, *et al.*, 2010; WONG, *et al.*, 2010). O GWAS realizado nas populações afetadas pela hanseníase na China, identificou dois SNPs no gene NOD2, rs9302752 e rs7194886, associados à suscetibilidade à hanseníase (ZHANG, *et al.*, 2009). O mesmo grupo também discorreu sobre as associações da hanseníase com SNPs na molécula adaptadora (RIP2), uma molécula de sinalização via NOD2. Além disso, um multimapeamento da região do gene NOD2 identificou cinco SNPs, incluindo rs7194886, associado com hanseníase na Índia e no Mali (WONG, *et al.*, 2010).

Alguns SNPs no gene de NOD2 estão associados com susceptibilidade ao ENH. Uma análise genotípica, após ajuste para a etnia, sexo e idade, revelou que sete SNPs foram significativamente associados com ENH (rs2287195, rs8044354, rs7194886, rs6500328, rs17312836, rs1861759 e rs1861758). Tais SNPs foram associados à susceptibilidade em um modelo dominante, no qual o SNP rs8044354 foi o mais significativo (OR=2,17 [IC=95% 1,26-3,88], p = 0,003) (BERRINGTON, *et al.*, 2010).

Gene de Receptor de manose tipo 1 (MRC1)

O gene do receptor de manose do tipo C1 (MRC1), localizado na região cromossômica 10p 13, codifica o receptor de manose, o qual possui papel fundamental no reconhecimento e ligação de carboidratos na superfície da parede celular *do M. leprae* (SCHLESINGER, *et al.*, 1996).

Um GWAS revelou uma significativa ligação para vários marcadores microssatélites no cromossomo 10p 13, entre as populações indianas com hanseníase (SCHLESINGER, *et al.*, 1996). Dessa forma, o alelo G de 396 foi identificado como fator de risco para a hanseníase MB em um estudo de caso-controle em pacientes brasileiros. Em um estudo funcional, células de rim embrionário humano (HEK293) a superexpressão de MR com três haplótipos do exon 7 do MRC1 falharam em ligar e internalizar *M. leprae* viável, sugerindo que a interação MR-*M. leprae* pode ser modulada por uma molécula acessória adicional, ainda desconhecida (ALTER, *et al.*, 2010).

Lectina de ligação de manose 2 (MBL2, 10q21.1) é um outro componente importante da primeira linha de defesa contra infecções. MBL2 age como uma molécula PAMP reconhecer partes de açúcar como manose, N-acetil glucosamina, fucose e glicose presente na superfície de uma grande variedade de agentes infecciosos, levando não apenas à sua fagocitose (JACK; TURNER, 2003) como também a ativação do sistema complemento (JACK, *et al.*, 2001). MBL ajuda a aumentar a absorção de *M. leprae* por fagócitos (JACK, *et*

al., 2001; MIRA 2006; FERWEDA, *et al.*, 2007) e deficiência de MBL (< 100 ng/mL) é protetor contra o desenvolvimento da forma mais grave de hanseníase. O SNP G161A foi associado com proteção de HV em uma população de Nepal (SAPKOTA, *et al.*, 2010). O haplótipo LYPA (SNPs da região 5' não traduzida correspondente a um C a substituição de nucleotídeos T no exon 1 posição + 4, correlacionada com a expressão de MBL intermediário) de MBL2 foi associado com susceptibilidade à hanseníase per se e a progressão para a forma virchowiana e formas limítrofes da doença em indivíduos da região sul do Brasil (de MESSIAS-REASON, *et al.*, 2007).

2.3.2 SLC11A1 (Solute carrier Family 11 member 1)/ Proteína do macrófago associada à resistência natural 1 (NRAMP 1)

Alguns estudos têm sugerido que SNPs gênicos influenciam a capacidade dos macrófagos de destruir os bacilos do *M. leprae*. O gene SLC11A1, chamado anteriormente de NRAMP-1, está localizado em um único locus na região do cromossoma 2q35 em humanos e tem sido relacionado tanto à resistência inata quanto à relacionada ao macrófago (FITNESS, 2002; TEIXEIRA, *et al.*, 2010). Esse gene codifica a proteína com o mesmo nome, localizada no compartimento de endossoma tardio de macrófagos teciduais, sendo recrutada para o fagossoma durante a fagocitose de microorganismos (MARQUET, *et al.*, 2000; MIRA, *et al.*, 2003). Sua função é produzir uma bomba de efluxo de cátions divalentes como Fe^{2+} e Mn^{2+} (BIGGS, *et al.*, 2001; NEVO, NELSON, 2006), eliminando esses íons que são essenciais para a sobrevivência do patógeno no macrófago. Isto também priva as bactérias da produção de enzimas protetoras (catalase e superóxido dismutase), que poderia neutralizar componentes reativos de oxigênio (NEVO; NELSON 2006).

Os polimorfismos NRAMP1/SLC11A1 anteriormente associados com susceptibilidade à tuberculose não foram associados à hanseníase per se entre os pacientes com hanseníase do Mali. No entanto, na África Ocidental, um SNP de inserção/exclusão de 4-bp não traduzidas na região 3' foi significativamente associado com formas operacionais de hanseníase. Heterozigotos foram mais frequentes entre MB que casos PB (MEISNER, 2001).

Três variantes do gene NRAMP1/SLC11A1 (D543N, 3' UTR e INT4) foram associados à hanseníase, mas não à tuberculose, no sul de Sulawesi, Indonésia (HATTA, *et al.*, 2010). Além disso, nesse estudo, o SNP INT4 foi associado com a forma paucibacilar, mas não à forma multibacilar da hanseníase (HATTA, *et al.*, 2010). Teixeira e colegas estudaram três SNPs do gene NRAMP1/SLC11A1 (274C/T, D543N e 1729 + 55del4) e encontraram uma

associação do genótipo mutante TT de 274C/T com susceptibilidade à reação hansênica tipo 2 em pacientes de Recife (TEIXEIRA, *et al.*, 2010). Ferreira e seus colegas descobriram uma interação do SNP (GT) na região promotora do gene NRAMP1 com o teste de Mitsuda (uma avaliação intradérmica da resposta imune ao *M. leprae*) em pacientes com hanseníase e seus contatos. Respostas negativas à lepromina foram associadas com genótipos 22 e 23, que representa também uma chance 7 e 8 vezes maior de desenvolver hanseníase, respectivamente (FERREIRA, *et al.*, 2004).

2.3.3 PARKIN (PARK2/PACRG)

O produto da proteína PARK2, a Parkina, é uma E3-ubiquitina ligase envolvida na via de destruição de proteínas dependente de ubiquitinação (de LESELEUC, *et al.*, 2013). Alguns GWASs identificaram uma região cromossômica 6q25 que abriga variantes na região reguladora comum dos genes PARK2 e PACRG como fatores de risco para a suscetibilidade à hanseníase (MIRA, *et al.*, 2004) e uma região cromossômica 10p 13 que confere susceptibilidade às formas paucibacilares da hanseníase (SIDDIQUI, *et al.*, 2001; MIRA, *et al.*, 2004).

PARK2 pode mediar a produção de IL-6 e MCP-1/CCL2 por macrófagos e um conjunto comum de três SNPs *upstream* no promotor do gene PARK2 tem sido associado com a produção de IL-6 e MCP-1/CCL2. Esse mesmo conjunto de SNPs foi recentemente descrito como fator de susceptibilidade para hanseníase em pacientes vietnamitas e indianos (de LESELEUC, *et al.*, 2013). Embora a função de PACRG na patogênese da hanseníase seja ainda desconhecida, também tem sido associada ao sistema ubiquitina-proteassoma (de LESELEUC *et al.*, 2013; GIASSON; LEE, 2001).

Mira e colaboradores genotiparam 388 marcadores de microssatélites em todo o genoma de 86 famílias do Vietnã do Sul (MIRA, *et al.*, 2003). A análise de ligação nos subconjuntos dessas famílias com as formas clínicas paucibacilares e multibacilares da hanseníase mostrou que uma região no cromossomo 6q25-q27 foi associada a risco global de hanseníase (MIRA, *et al.*, 2003). Em outro estudo, o mesmo grupo mapeou um locus de susceptibilidade de hanseníase no cromossomo 6q25-P26 em 200 famílias vietnamitas e encontrou uma associação significativa entre a hanseníase e 17 marcadores localizados em um bloco de 80 kb na região 5' regulatória compartilhada pelo gene da doença de Parkinson PARK2 e PACRG. Tal achado foi confirmado em uma análise expandida de casos de hanseníase e controles no Brasil (BAKIJA-KONSUO, *et al.*, 2011). Estudos de mapeamento

de associação de alta densidade de SNPs PARK2/PACRG identificaram quatro SNPs (rs1333955, rs7744433, rs2023004, rs6936895) associados à hanseníase. Um estudo de caso-controle, incluindo 364 casos de hanseníase e 370 controles da Índia mostrou que dois destes SNPs (rs1333955 e rs2023004) foram replicados por análise multivariada entre ambos os grupos étnicos (ALTER, *et al.*, 2013).

2.3.4 Receptor de vitamina D (VDR)

O gene VDR, localizado na região de 12q13.11, codifica uma proteína que se liga ao metabólito ativo da vitamina D, a 1,25diidroxitamina D₃. Essa ligação leva à ativação de monócitos, macrófagos e de linfócitos ativados e influencia a função das células T (HAYES, *et al.*, 2003). A associação entre a fisiologia da vitamina D e doenças infecciosas é corroborado por estudos genéticos com envolvimento de SNPs do gene VDR na suscetibilidade a essas doenças (UITTERLINDEN, *et al.*, 2004). Além disso, SNPs no VDR, especialmente o SNP Taq1, têm sido associados à hanseníase (MODLIN, 2010). A genotipagem do SNP Taq1 do gene VDR (T/t), em conjunto com a realização de testes de Mitsuda, encontrou uma forte associação entre o genótipo tt e hanseníase em uma população brasileira (GOULART, *et al.*, 2006). Entretanto, SNPs no gene VDR não foram associadas com fenótipos de hanseníase entre os pacientes nepalesas (SAPKOTA, *et al.*, 2010).

2.3.5 MCP1/CCL2

A proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) é uma quimiocina cuja produção é regulada por um gene localizado no cromossomo 17 na região 17q11.2-q12. Essa quimiocina é secretadas em resposta à inflamação para regular o trânsito de células tais como monócitos, neutrófilos e linfócitos para o local da infecção (DESHMANE, *et al.*, 2009). O SNP -2518 G/A (rs 1024611) do gene MCP-1 afeta a atividade transcricional da região regulatória distal e produção de MCP-1 pelo monócito (BEM-SELMA; BOUKADIDA, 2011).

Os monócitos de indivíduos portadores de um alelo G -2518 produzem mais MCP-1 do que os monócitos de indivíduos homozigotos A/A. O efeito do alelo G parece ser dose dependente, no qual células de indivíduos homozigotos para o alelo G no SNP -2518 produzem mais MCP-1 do que células de heterozigotos G/A. O SNP funcional -2518 do gene de MCP-1 A/G é conhecido por estar associado com o aumento do risco de doenças inflamatórias, câncer e diabetes tipo 2 (BEM-SELMA; BOUKADIDA, 2011). O genótipo GG

do gene de MCP-1 também esteve associado a doenças infecciosas como a leishmaniose mucosa e tuberculose (RAMASAWMY *et al.*, 2010; FLORES-VILLANUEVA *et al.*, 2005).

Um estudo realizado no México, e posteriormente replicado com indivíduos coreanos, sugeriu que indivíduos com o genótipo GG de MCP-1 produzem altas concentrações dessa quimiocina, a qual inibe a produção de IL - 12p 40, com consequente supressão da resposta Th1, aumentando a probabilidade de que a infecção pelo *M. tuberculosis* progrida para tuberculose pulmonar ativa. O risco de desenvolver tuberculose foi 2,3 e 5,4 vezes maior em portadores de genótipos de MCP-1 AG e GG respectivamente do que nos homozigotos AA (FLORES-VILLANUEVA *et al.*, 2005). Por outro lado, em um estudo caso-controle, corroborado por estudo de análise baseado em família, forneceu evidências para a associação entre o alelo de G -2518 de MCP-1 com níveis elevados de MCP-1 no plasma e em macrófagos, e susceptibilidade à leishmaniose mucosa mas não cutânea causada por *Leishmania braziliensis* (RAMASAWMY *et al.*, 2010). Uma meta-análise indicou que o alelo G foi associado com a susceptibilidade à tuberculose entre asiáticos e hispânicos, mas não entre os africanos (FENG, *et al.*, 2012). Considerando que *M. leprae* pode residir e se multiplicar dentro de macrófagos, níveis de adequados de quimiocinas podem desempenhar um papel crucial no recrutamento eficaz de células T efetoras para o local da infecção (HUSSAIN, *et al.*, 2011).

2.3.6 Polimorfismos de TNF

O fator de necrose tumoral (TNF) tem um efeito proinflamatório e imunoestimulatório o qual interfere no metabolismo lipídico, coagulação, resistência à insulina e expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (SAPKOTA *et al.*, 2010). O locus TNF/LTA situa-se na classe III do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) no cromossomo 6p21. Foram identificados vários SNPs neste gene, especialmente na região promotora.

Vários estudos têm descrito associações genéticas de alelos de TNF com diferentes tipos de hanseníase (ROY, *et al.*, 1997; SARNO, *et al.*, 2000; FRANCESCHI, *et al.*, 2009; GOULART; GOULART 2009). Por exemplo, Roy e colegas (1997) observaram uma associação do SNP de TNF – 308 G/A com a apresentação de HV em uma população indígena (ROY, *et al.*, 1997). Foi comprovado que o alelo A induz alta transcrição gênica e níveis mais elevados de TNF- α . Em uma população brasileira do Sul, observou-se uma maior frequência de genótipo GG do SNP TNF-308G/A, juntamente com uma diminuição da frequência de genótipos AA e GA entre os pacientes com hanseníase em comparação com o grupo controle

(FRANCESCHI, *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que o gene do TNF- α é ativamente envolvido na resistência ao *M. leprae*. Estudos baseados em família (FBAT) e estudos caso-controle brasileiros mostraram um efeito protetor do alelo TNF-308A (rs1800629), corroborando a associação deste alelo com proteção contra a hanseníase (CARDOSO, *et al.*, 2011b).

2.3.7 MHC/HLA

Apesar da interpretação de estudos de ligação e associação do complexo HLA demandar cautela em virtude do desequilíbrio de ligação de longa distância (LD), um número substancial de estudos abordando o papel de qualquer HLA classe I ou alelos de classe II em hanseníase foram conduzidos (LINCOLN, *et al.*, 2005). Um GWAS de 71 famílias com múltiplos casos sugeriu a ligação para regiões do cromossomo 6p 21 (HLA-DQA LOD = 3.23), 17q22 (LOD = 2,38) e 20p 13 (LOD = 1,51), no qual esse foi atribuível quase inteiramente para as famílias contendo casos HV e BV (LOD = 1,36) (MILLER *et al.*, 2004). Um estudo prévio realizado nessa população, região do cromossomo 17q (especificamente 17q12 e 17q21.33) mostrou evidência de ligação das regiões 17q12 e 17q21.33 do cromossoma para o subtipo tuberculóide ($Z_{lr} = 2,58$) e hanseníase propriamente dita ($Z_{lr} = 2,67$), respectivamente (JAMIESON, *et al.*, 2004).

2.3.8 IL-12

Secretada por macrófagos e células dendríticas, a IL-12 é um potente indutor da diferenciação de células Th1 (TRINCHIERI, 1994). IL-12R é composto de duas subunidades de proteína (designadas $\beta 1$ e $\beta 2$), com expressão de cadeia de $\beta 2$ sendo um determinante crucial das respostas Th1/Th2 (NAEGER, *et al.*, 1999). Demonstrou-se que a expressão de IL-12R $\beta 2$ é maior em lesões de HT que lesões HV (KIM, *et al.*, 2001).

Possivelmente a susceptibilidade a várias doenças micobacterianas pode ser determinada pelo grau de expressão de IL-12R $\beta 2$, a qual pode ser regulada por SNPs IL12R $\beta 2$ (OHYAMA *et al.*, 2005; OHYAMA, *et al.*, 2008). Ali *et al.*, realizaram um estudo de caso-controle incluindo 843 pacientes com hanseníase e 1502 controles saudáveis de uma mesma área geográfica na Índia seguido por um estudo de interação de múltiplos genes anteriormente associados SNPs IL-12B e IL-12R $\beta 2$. Tais autores encontraram uma associação entre o IL-12B SNP rs2853694 com hanseníase (OR = 1,42).

2.3.9 IFN- γ

IFN- γ é produzido por células T CD4⁺ ativadas ou células T CD8⁺ e é fundamental para o controle de patógenos intracelulares pela resposta imune inata e adaptativa (SCHRODER, *et al.*, 2004). SNPs em IFN- γ já foram avaliados em diversos estudos epidemiológicos genéticos. O SNP + 874T/A é um polimorfismo funcional. O alelo + 874T induz maior liberação de IFN- γ espontânea por PBMC e está associado a proteção contra doenças infecciosas, incluindo tuberculose e hanseníase (PACHECO, *et al.*, 2008; CARDOSO, *et al.*, 2011a).

Em um estudo de caso-controle, no qual foram arrolados 2.125 sujeitos brasileiros do estado de São Paulo e 1.370 indivíduos do Rio de Janeiro, os SNPs +874 T / A (rs2430561), +2109 G/A (rs1861494) e rs2069727 mostraram efeito protetor para os portadores do SNP + 874T (OR ajustado= 0,75; p = 0,005) para ambas populações estudadas combinadas. Não surpreendentemente, combinando dados de tuberculose e hanseníase, os resultados indicam que o SNP + 874T/A desempenha um papel na resistência a doenças micobacterianas (CARDOSO, *et al.*, 2011a).

Em um estudo de caso-controle realizado na China, incluindo 527 indivíduos acometidos pela hanseníase e 583 indivíduos saudáveis, demonstrou-se uma associação do SNP rs3138557 do gene do IFN- γ com hanseníase MB (WANG, *et al.*, 2012).

2.3.10 IL-10

IL-10 é uma citocina imunorregulatória secretada pelas células da linhagem de monócitos/macrófagos e células T as quais suprimem a produção de mediadores inflamatórios e apresentação de antígeno (CARDOSO, *et al.*, 2011a).

Um estudo anterior, analisando o SNP na região promotora do gene da IL-10, indicou que haplótipos -819 C/- 592 C e - 1082A/-819 C/- 592C têm associações significativas com hanseníase (CARDONA-CASTRO, *et al.*, 2012). Pereira e colaboradores (2009), em um estudo de caso-controle que envolvendo 374 pacientes e 380 controles e uma meta-análise, incluindo 5 estudos (2702 indivíduos), também encontraram uma associação entre alelo - 819T com susceptibilidade a hanseníase. Análises funcionais revelaram que indivíduos portadores do alelo - 819T produziam menores níveis de IL-10, quando comparados aos não-portadores em PBMC estimulados com antígenos de *M leprae* (PEREIRA, *et al.*, 2009).

Além disso, um estudo de caso-controle que teve como base uma população composta por 2447 amostras de diferentes regiões da Índia encontrou associações de um grupo de genes com suscetibilidade a hanseníase. Oito SNPs foram associados com hanseníase propriamente dita, incluindo rs1800871, rs1800872 e rs1554286 de IL-10; rs3171425 e rs7281762 de IL-10RB; rs2228048 e rs744751 de TGFBR2; e rs1800797 de IL-6). Esta associação foi replicada para outros 4 SNPs (rs1554286 de IL-10, rs7281762 de IL-10RB, rs2228048 de TGFBR2 e rs1800797 de IL-6) (ALI, *et al.*, 2012). Tomados em conjunto, dados replicados na população brasileira e indiana sugerem fortemente o envolvimento do locus de IL-10 no desfecho da hanseníase.

2.3.11 IL-17

Há seis membros na família de citocinas interleucina-17 (IL-17) quais sejam IL-17A (habitualmente citada como IL-17), IL-17B, IL - 17C, IL - 17D, IL-17E (também conhecida como IL-25) e IL-17F. Dentre todos os membros, a regulação e função biológica das IL-17A e IL-17F são os mais elucidados atualmente. Do ponto de vista funcional tanto IL-17A quanto IL-17F mediam respostas pró-inflamatórias, diferindo apenas quanto ao tipo e local da inflamação (JIN, DONG, 2013).

Células T especializadas, denominadas células Th17, são a principal fonte de IL-17A e IL-17F em muitos mecanismos efetores de imunidade adaptativa. IL-17A e IL-17F assumem importante papel protetor na defesa do hospedeiro contra certos patógenos em barreiras epiteliais e mucosas. Tais citocinas são fundamentais na defesa contra bactérias extracelulares tais como *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, que infectam a pele e pulmão, respectivamente. Por outro lado, IL-17A também atua na defesa por infecção causadas por bactérias intracelulares tais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* além da *Candida albicans*. Assim, caso haja defeito na produção de IL-17A ou IL-17RA pode-se ter como resultado maior disseminação bacteriana, em virtude da redução de mediadores inflamatórios e recrutamento dos neutrófilos (JIN; DONG; 2013; SPARBER; LEIBUNDGUT-LANDMANN, 2015). Recentemente foi publicado uma pesquisa que revelou que o SNP IL-17F (7488T > C) está associado a suscetibilidade à hanseníase (CHAITANYA *et al.*, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

A hanseníase, apesar de ser uma doença tratável e seu esquema terapêutico ser fornecido gratuitamente pelos serviços de saúde, ainda apresenta número elevado de casos novos em nosso país. Com efeito, o Brasil, a Índia e a Indonésia respondem por 81% de todos os casos novos em todo o mundo (OMS, 2014). Considerando que o tratamento com a poliquimioterapia e a detecção precoce de casos constituem os pilares para o controle dessa doença, a implementação de novas ferramentas diagnósticas assume um papel decisivo no controle da hanseníase.

Desta forma, a identificação de SNPs que possam conferir susceptibilidade à hanseníase adquire caráter promissor nesse cenário, pois a vigilância de indivíduos mais susceptíveis, membros de famílias de casos da doença pode ser uma medida promissora para detecção e tratamento precoce da doença, interrompendo a cadeia de transmissão. Além disso, a identificação dos genes que interferem na relação resistência/susceptibilidade do hospedeiro permitirá melhor compreensão da patogênese da doença e facilitará o desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Associar polimorfismos em genes candidatos com a hanseníase.

4.2 Objetivos específicos

- Comparar as frequências alélicas e genóticas de polimorfismos dos genes de MCP-1 e IL-17 nos sujeitos doentes e contactantes não familiares;
- Realizar a análise de agrupamento para verificar o efeito de todos os genes em conjunto na ocorrência da doença.

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo e amostra estudada

Trata-se de um estudo de associação, do tipo caso-controle genético e de famílias. Os pacientes estudados foram provenientes de demanda espontânea dos ambulatórios de hanseníase (DES)MANCHA-SE do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe e do Centro de Especialidades Médicas de Aracaju (CEMAR), com diagnóstico confirmado de hanseníase por critérios reconhecidos pelo Ministério da Saúde (MS).

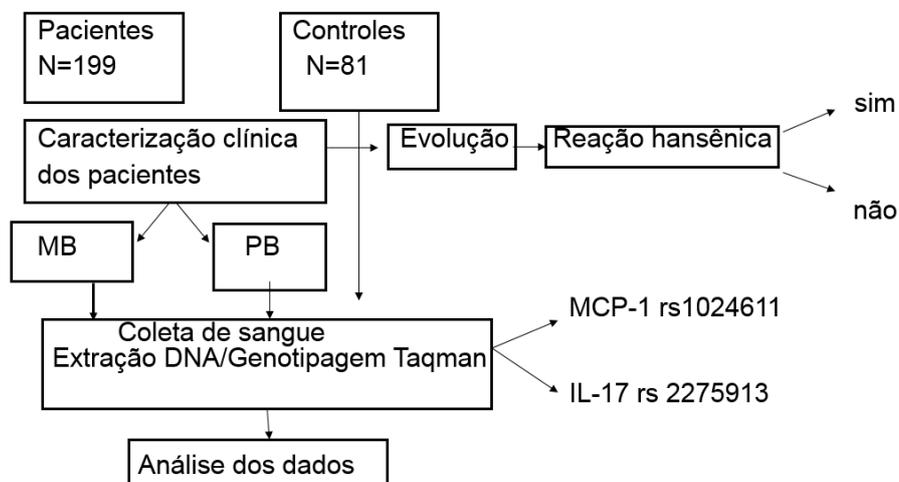
Os critérios para confirmação diagnóstica foram a presença de lesões de pele compatíveis clinicamente com hanseníase, com alteração da sensibilidade e baciloscopia positiva e/ou biópsia sugestiva ou confirmatória deste diagnóstico. Os pacientes foram classificados de acordo com as formas operacionais em paucibacilar, quando apresentavam menos do que 5 lesões cutâneas, ou multibacilar, aqueles que apresentavam mais de 5 lesões cutâneas. A exceção a esses critérios foram os pacientes com a forma neural, os quais não cursam com lesões cutâneas, mas apresentam lesões neurológicas, com confirmação diagnóstica faz-se por eletroneuromiografia. Foram eleitos como controles indivíduos co-habitantes não consanguíneos residentes na mesma casa ou vizinhança próxima e contactantes diretos dos pacientes, tais como cônjuge, genro, nora, cunhado (a). Os controles foram examinados clinicamente e considerados adequados para participação na pesquisa se ausência de queixas e lesões sugestivas de hanseníase.

Além disso, foram coletados informações fenotípicas, heredograma e sangue para isolamento de DNA dos casos e seus familiares assim como de seus controles. Todos os participantes da pesquisa receberam uma explicação verbal a respeito da natureza da pesquisa, assim como seus riscos e benefícios, e foram convidados a participar do estudo, sendo solicitada a assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (apêndice I). Houve, então, uma avaliação com emprego de questionário clínico-epidemiológico padronizado (apêndice II). Os sujeitos doentes foram examinados fisicamente para que se fosse feita a descrição das lesões e forma clínica da doença apresentada e submetidos a exame neurológico simplificado estabelecido pelo MS para classificação do grau de incapacidade física. Foram incluídos tanto pacientes já tratados, em tratamento quanto aqueles cujo tratamento ainda não tinha sido iniciado.

O **critério de inclusão** foi o diagnóstico confirmado da hanseníase por baciloscopia e/ou biópsia e foram considerados como **critérios de exclusão**: apresentar outra infecção ou condição clínica (tais como gravidez, HIV, HTLV-I, Diabetes mellitus) que pudessem interferir na resposta imune e na forma clínica da doença ou sua gravidade. Após caracterização das formas clínicas da doença, foi retirado sangue periférico para purificação de DNA e realização do estudo genético. Além disso, todos os pacientes foram acompanhados mensalmente para receber a dose supervisionada do tratamento e nessas visitas foram aplicados questionários nos doentes para detectar sintomas de neurite e outros quadros clínicos compatíveis com reações hansênicas e incapacidade física.

Do universo 510 indivíduos participantes dentre casos, controles e familiares, a amostra final para fins de análise da presente pesquisa foi composta por 199 indivíduos doentes e 81 sujeitos sadios contactantes intradomiciliares dos pacientes. Após o diagnóstico, os pacientes foram assistidos ambulatorialmente durante o tratamento contra a hanseníase e foram avaliados quanto ao surgimento ou não de reações hansênicas (figura 2). A definição diagnóstica da ocorrência de episódios reacionais foram: para reação hansênica tipo 1 o aparecimento repentino de novas lesões cutâneas associadas ou não a neurite ou manifestação isolada de neurite; e como reação tipo 2 o surgimento de nódulos subcutâneos dolorosos acompanhados ou não de neurite ou comprometimento sistêmico como febre, artralgia ou artrite e perda de peso.

Figura 2. Fluxograma do delineamento da pesquisa



5.2 Genotipagem

5.2.1 Coleta de sangue e obtenção de DNA genômico:

De todos os indivíduos foram coletados 8 mL de sangue venoso em tubo vacutainer contendo Ácido-Citrato-Dextrose (ACD). As amostras de sangue foram encaminhadas para posterior análise no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe para purificação de DNA genômico (gDNA) utilizando-se a técnica de “coluna” (SAMBROOK *et al.*, 1989) descrita a seguir.

Para extração de DNA foi inicialmente feita a lise de eritrócitos, onde o sangue total coletado foi dividido em dois tubos Falcom de 15 ml. Para perfazer o volume total de 15ml em cada tubo, utilizou-se uma solução para lise de eritrócitos composta de Sacarose 1.6M; Triton X-100; MgCl₂.6 H₂O 1M; Tris-HCl com pH7,5 1M. Em seguida tal material foi centrifugado a 8.000xg durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido com o “pellet” resultante. Em seguida procedeu-se lavagem do sedimento de leucócitos com 5ml de dH₂O e desprezado o sobrenadante após a centrifugação. Por fim, o botão de células brancas resultante foi levado para congelamento a -20°C. A extração do gDNA, foi realizada utilizando-se o kit de extração de DNA *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. A quantificação e a pureza das amostras de DNA foram realizadas por leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (260nm) em aparelho *Epoch Microplate spectrophotometer*, sendo as amostras posteriormente aliquotadas e congeladas a -20°C e -70°C.

Os polimorfismos de MCP-1 rs1024611 e IL-17 rs 2275913 foram avaliados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) semiquantitativa por método TaqMan® (*Life Technologies*). A técnica de PCR foi realizada no aparelho *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*) de acordo com as instruções do fabricante.

A PCR com sondas TaqMan® se baseia na atividade exonucleotídica 5' da Taq DNA polimerase, a qual causa a ruptura da ligação da sonda que hibridiza com a cadeia complementar, surgindo, assim, um sinal de fluorescência. Desta forma, são necessárias duas sondas TaqMan® que irão diferir no local polimórfico, uma será complementar do alelo selvagem e, a outra, complementar ao alelo variante. Tais sondas são marcadas com dois fluoróforos diferentes, um na extremidade 5', o *reporter*, e outro na extremidade 3', o *quencher*. Enquanto as sondas se mantêm inalteradas o “quencher” absorve a fluorescência emitida pela sonda “reporter”. Por sua vez a sonda se liga ao seu alelo específico e a

fluorescência é lida para o alelo presente na amostra. Quando ocorre a presença dos dois alelos, são lidos os dois tipos de fluorescência (Quadro 1).

Durante a PCR e na fase de pareamento, as sondas TaqMan® hibridizam com a cadeia complementar. Durante a fase de extensão a sonda “reporter” é clivada pela atividade 5’ da Taq DNA polimerase, ocorrendo a liberação do fluoróforo e, conseqüentemente, incremento do sinal de fluorescência. O aumento da intensidade da fluorescência é diretamente proporcional ao número de ciclos da PCR.

Quadro 1- Associação entre sinais da fluorescência e sequência da amostra

Sinal da fluorescência	Genótipo da amostra
Sinal VIC	Homozigose para alelo 1
Sinal FAM	Homozigose para alelo 2
Sinais VIC e FAM	Heterozigose para alelos 1 e 2

Fonte: Adaptado da Applied Biosystem

5.3 Análise Estatística

Os dados clínicolaboratoriais foram compilados em um banco de dados no programa SPSS versão 22.0.0. As variáveis categóricas foram descritas como frequência simples e percentagem enquanto as variáveis quantitativas como média e desvio-padrão. Para analisar a existência ou não de associação entre os genótipos e alelos com as variáveis forma clínica e reação hansênica foi utilizado teste do qui-quadrado ou exato de Fisher quando mais apropriado. Por sua vez, para a análise multivariada, foi empregado o teste de agrupamento *step by step*. O pressuposto básico para tal análise é que a distribuição dos genótipos e alelos permite discriminar os indivíduos da amostra em grupos com susceptibilidade à doença e características distintas. Uma vez definido o número de agrupamentos procedeu-se a análise de associação dos agrupamentos e características clínicas a fim de determinar as particularidades de cada agrupamento.

6 ASPECTOS ÉTICOS

Essa pesquisa envolve seres humanos, seguiu as instruções da resolução 196/96 e de um projeto que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe sob o número CAAE – 0152.0.107.000-07.

7 FONTE DE FINANCIAMENTO

Projeto financiado pelo Edital FAPITEC/SE/FUNTEC/CNPq N°12/2009, PROGRAMA DE APOIO A NÚCLEOS DE EXCELÊNCIA (PRONEX), Processo nº019.203.02712/2009-8.

8 RESULTADOS

8.1 Caracterização da amostra

A amostra foi composta por 280 indivíduos com idade média de $46,7 \pm 17,1$ anos, idade mínima 8 anos e máxima de 88 anos. Dentre os 280 indivíduos, 199 eram sujeitos doentes e 81 sujeitos sadios não consanguíneos.

As características demográficas dos indivíduos dos grupos doentes e sadios não consanguíneos estão descritas na Tabela 1. Quando da análise de tais características, observou-se que não houve diferença estatística no tocante à distribuição dos sujeitos em relação ao sexo. Por outro lado, no que se refere à idade, também não foi observado diferença estatística nos grupos doentes e sadios não consanguíneos considerando a classificação diagnóstica pauci ou multibacilar. No grupo dos doentes houve predominância dos sujeitos multibacilares (66,8%) em relação aos paucibacilares (33,2%) e, no que tange a ocorrência de reação hansênica, 46,7% dos doentes apresentaram reação durante o período analisado.

Tabela 1 - Características demográficas dos indivíduos da pesquisa

Variável	Doentes ¹ (%) (n=199)	Sadios não consanguíneos ¹ (%) (n=81)	p
Idade ²	46,6($\pm 17,9$)	46,8($\pm 15,0$)	0,939
Sexo			0,09
Feminino	103(51,8)	51(62,5)	
Masculino	96(48,2)	30 (37,5)	

Fonte: Dados coletados pela autora, 2010-2015.

1. Valores expressos em n (%); Teste t para dados independentes

2. Valores expressos como média \pm DP; Teste do qui-quadrado.

8.2 Distribuição genotípica do SNP rs 1024611 de MCP-1 e rs 2275913 de IL-17 em indivíduos com hanseníase e contactantes sadios não consanguíneos:

Ao analisar a distribuição de genótipos entre os indivíduos doentes e sadios foi identificada diferença na distribuição genotípica de MCP-1 e IL-17 ($p=0,015$ e $p=0,031$ respectivamente). Em relação ao MCP-1, houve maior frequência do genótipo GG nos doentes e menor frequência do AG quando comparados aos sadios. Por outro lado, o genótipo GG de IL-17 foi o mais frequente nos doentes enquanto o genótipo AA foi o menos evidenciado tanto em doentes quanto em sadios (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência genotípica dos SNPs de MCP-1 e IL-17 em pacientes e contactantes sadios não consanguíneos.

SNP	Doentes ¹ (%)	n	Sadios ¹ (%)	n	p
MCP-1		182		81	0,015
AA	86 (47,3)		31 (38,3)		
AG	81(44,5)		49 (60,5)		
GG	15(8,2)		1(1,2)		
IL-17		187		80	0,031
AA	7 (3,7)		2 (2,5)		
AG	45 (24,1)		32 (40)		
GG	135 (72,2)		46 (57,5)		

Fonte: Dados coletados pela autora, 2010-2015.

¹Valores expressos em n (%). Teste exato de Fisher.

A comparação da distribuição dos genótipos entre os doentes estratificados pela forma clínica paucibacilar e multibacilar não mostrou diferença tanto na distribuição dos genótipos de MCP-1 quanto na distribuição de genótipos de IL-17 (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência dos genótipos dos SNPs de MCP-1 e IL-17 em doentes pauci e multibacilares

Genótipo	PB	n	MB	n	p
MCP-1		63		119	0,458
AA	31(49,2)		55(46,2)		
AG	27(42,9)		54(45,4)		
GG	5(7,9)		10(8,4)		
IL-17		63		124	0,141
AA	1(1,6)		6(4,8)		
AG	20(31,7)		25(20,2)		
GG	42(66,7)		93(75)		

Fonte: Dados coletados pela autora, 2010-2015.

Em relação à apresentação de reação hansênica, foi possível observar que houve frequência semelhante dos genótipos AA, AG e GG do SNP 1024611 de MCP-1 nos indivíduos que manifestaram ou não reação hansênica ($p=0,445$). Por sua vez, em relação à IL-17, a frequência dos genótipos AA, AG e GG nos doentes que manifestaram ou não reação hansênica também foi similar ($p=0,666$) conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Frequência genotípica dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos doentes que manifestaram ou não reação hansênica

SNP	Doentes Sem Reação ¹ (%)	n	Doentes Com reação ¹ (%)	n	p
MCP-1		80		97	0,445
AA	33(41,2)		49(50,5)		
AG	39(48,8)		41(42,2)		
GG	8(10)		7(7,2)		
IL-17		84		97	0,666
AA	3(3,6)		4(4,1)		
AG	23(27,4)		21(21,6)		
GG	58(68,9)		72(74,2)		

Fonte: Dados coletados pela autora, 2010-2015.

¹Valores expressos em n (%). Teste exato de Fisher.

8.3 Distribuição alélica do SNP rs 1024611 de MCP-1 e rs 2275913 de IL-17 em indivíduos com hanseníase e contactantes sadios não consanguíneos

Ao se avaliar a distribuição de alelos entre os indivíduos doentes e sadios foi identificada diferença na distribuição dos alelos dos SNP de IL-17 ($p=0,019$) mas não de MCP-1 ($p=0,28$). Em relação ao MCP-1, tanto os doentes quanto os contatos sadios não consanguíneos apresentaram maior frequência do alelo A em relação ao alelo G. É importante ressaltar que, para IL-17, o alelo G também foi o mais evidenciado tanto nos doentes quanto nos sadios ($p=0,019$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação das frequências alélicas dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos indivíduos doentes em relação aos sujeitos sadios não consanguíneos.

Alelos Citocinas	Doentes ¹ (%) (n=199)	n	Sadios ¹ (%) (n=81)	n	p
MCP-1		364		162	0,28
A	254 (69,8)		111 (68,5)		
G	110 (30,2)		51 (31,5)		
IL-17		374		159	0,019
A	59 (15,8)		36 (22,6)		
G	315 (84,2)		123 (77,4)		

Fonte: Dados coletados pela autora, 2010-2015.

¹Valores expressos em n (%). Teste exato de Fisher.

Comparando-se a distribuição alélica entre os doentes de acordo com a estratificação das formas clínicas paucibacilar e multibacilar, não foi evidenciado diferença em relação aos alelos de MCP-1 e IL-17 ($p=0,913$ e $p=0,229$ respectivamente) segundo Tabela 6.

Tabela 6 - Comparação das frequências alélicas dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos indivíduos doentes pauci ou multibacilares

Alelos Citocinas	PB¹(%)	n	MB¹(%)	n	p
MCP-1		176		238	0,913
A	139 (78,9)		165 (69,3)		
G	37 (21,1)		73 (30,7)		
IL-17		126		248	0,229
A	22 (17,5)		37 (15)		
G	104 (82,5)		211 (85)		

Fonte: Dados coletados pela autora, 2010-2015.

¹Valores expressos n (%). Teste exato de Fisher.

Por outro lado, também não houve diferença na frequência da distribuição dos alelos dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos doentes quanto à ocorrência ou não de reação hansênica (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação das frequências alélicas dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos indivíduos doentes que manifestaram ou não reação hansênica

SNP	Doentes Sem Reação¹ (%)	n	Doentes Com Reação¹ (%)	n	p
MCP-1		160		194	0,67
A	113 (70,6)		135 (69,6)		
G	47 (29,3)		59 (30,4)		
IL-17		158		194	0,44
A	29 (12,1)		29 (15)		
G	139 (87,9)		165 (85)		

Fonte: Dados coletados pela autora, 2010-2015.

¹Valores expressos em n (%). Teste exato de Fisher.

8.4 Caracterização dos doentes e indivíduos contactantes sadios não consanguíneos conforme agrupamento genotípico do SNP rs 1024611 de MCP-1 e rs 2275913 de IL-17

A análise dos indivíduos doentes e contactantes sadios não consanguíneos segundo as variáveis idade, sexo e genótipos de MCP-1 e IL-17 permitiu discriminar cinco grupos (Tabela 8).

8.4.1 Caracterização do grupo 1

No que concerne à caracterização genotípica, o genótipo AA do MCP-1 foi o mais frequente (71,7%), o genótipo AG exibiu frequência intermediária (20%) enquanto o genótipo GG foi o menos observado (8,3%). Todos os indivíduos que compõem esse grupo apresentaram apenas o genótipo GG de IL-17.

Por outro lado, tal grupo foi constituído notadamente por sujeitos doentes (86,7%) e, dentre esses, a forma multibacilar foi a predominante (61,7%). Além disso, 50,9% dos doentes pertencentes a esse grupo evoluíram com reação hansênica.

8.4.2 Caracterização do grupo 2

Do ponto de vista da frequência genotípica, o genótipo AA do MCP-1 foi o mais observado (94,7%), não houve ocorrência do genótipo AG e o genótipo GG foi observado em 5,3% dos participantes. Em relação ao IL-17, genótipo AG do IL-17 foi o mais evidenciado (84,2%) seguido pelo genótipo AA (15,8%) e sem demonstração do genótipo GG.

No que tange as características clínicas, esse grupo foi composto predominantemente por indivíduos doentes (68,4%) em relação aos sadios (31,6%) apesar da distribuição de sujeitos com forma clínica paucibacilar (31,6%), multibacilar (36,8%) e sadios (31,6%) ter sido semelhante. Considerando a manifestação da reação hansênica, 39,5% dos indivíduos doentes que compuseram o grupo 2 não a apresentaram durante sua evolução.

8.4.3 Caracterização do grupo 3

Considerando a frequência genotípica dos SNPs estudados, a frequência do genótipo AG do MCP-1 foi mais expressiva (96,9%), seguida do genótipo AA de modo menos significativo (3,1%) e sem observação do genótipo GG. O genótipo AG do IL-17 (71,9%) foi o mais frequente seguido pelo genótipo AG (15,8%) e ausência do genótipo AA.

Ademais, esse grupo foi composto por sujeitos sadios (56,3%) em discreta maioria e, no que se refere aos doentes, a forma clínica multibacilar foi a mais frequente (34,4%), sem manifestação de reação hansênica em seu curso clínico (22,6%).

8.4.4 Caracterização do grupo 4

Em relação ao agrupamento genotípico dos indivíduos do grupo 4, o genótipo AG do MCP-1 foi observado em 82,5% dos participantes desse grupo, com menor ocorrência dos genótipos GG (11%) e AA (6,3%). Considerando o IL-17, o genótipo GG (68,3%) foi o mais frequente enquanto os genótipos AG (28,6%) e AA (3,2%) foram menos comuns. A caracterização clínica do grupo 4 é traduzida por discreta predominância de indivíduos doentes (54%) os quais apresentaram distribuição homogênea das formas clínicas pauci e multibacilar (25,4% e 28,6% respectivamente) e evoluíram com reação hansênica 31,7% dos casos.

8.4.5 Caracterização do grupo 5

Ao analisar o grupo 5, observou-se distribuição homogênea dos genótipos AA e AG do MCP-1 (51,4% e 48,6% respectivamente) e sem evidência do genótipo GG. Dos genótipos de IL-17, apenas o GG foi encontrado nesse grupo. Tal grupo foi composto apenas de indivíduos doentes, com forma clínica multibacilar em sua maioria (67,6%), que não diferiram em relação à manifestação de reação hansênica (48,6%) ou não (51,4%).

Tabela 8 - Caracterização dos agrupamentos conforme frequências genótípicas dos SNP de MCP-1 e IL-17 nos indivíduos doentes em relação aos sádios

Variáveis	Grupo 1 (n=60)	Grupo 2 (n=38)	Grupo 3 (n=32)	Grupo 4 (n=63)	Grupo 5 (n=37)	p
Idade¹	46±18,1	44±19,4	47,5±20,1	48,3±13,5	44,9±15,1	0,15
Sexo²						0,0001
Feminino	22(36,7)	25(65,8)	0	63(100)	18(48,6)	
Masculino	38(63,3)	13(34,2)	32(100)	0	19(51,4)	
Grupo²						0,0001
Doentes	52(86,7)	26(68,4)	14(43,8)	34(54)	37(100)	
Sádios	8(13,3)	12(31,6)	18(56,3)	29(46)	0	
MCP-1²						0,0001
AA	43(71,7)	36(94,7)	1(3,1)	4(6,3)	19(51,4)	
AG	12(20)	0	31(96,9)	52(82,5)	18(48,6)	
GG	5(8,3)	2(5,3)	0	7(11)	0	
IL-17²						0,0001
AA	0	6(15,8)	0	2(3,2)	0	
AG	0	32(84,2)	23(71,9)	18(28,6)	0	
GG	60(100)	0	9(28,1)	43(68,3)	37(100)	
Forma clínica²						0,0001
	15(25)	12(31,6)	3(9,4)	16(25,4)	12(32,4)	
PB	37(61,7)	14(36,8)	11(34,4)	18(28,6)	25(67,6)	
MB	8(13,3)	12(31,6)	18(56,3)	29(46)	0	
Sadio						
Reação²						0,0001
Doente sem reação	20(35,1)	15(39,5)	7(22,6)	14(22,2)	19(51,4)	
Doente com reação	29(50,9)	11(28,9)	6(19,4)	20(31,7)	18(48,6)	
Sadio	8(14)	12(31,6)	18(58,1)	29(46)	0	

Fonte: Dados coletados pela autora, 2010-2015.

¹Valores expressos em média ±DP. ²Valores expressos em n (%). Análise de agrupamento.

9 DISCUSSÃO

Embora a exposição ao *M leprae* seja necessária, ela por si só não é suficiente para desencadear a hanseníase. Considera-se que diversos conjuntos de genes podem influenciar a susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase em três diferentes fases, quais sejam: a) o controle de infecção propriamente dita, ou seja, hanseníase per se; b) após o estabelecimento da infecção influenciando na definição das diferentes formas clínicas da doença; c) a possibilidade de manifestar as reações hansênicas. Além de estudos observacionais que corroboram a presença de um componente familiar na susceptibilidade à hanseníase, diversas análises de segregação complexa têm sido realizadas para hanseníase em diferentes populações, com o intuito de identificar o modelo de ajuste mais adequado da herança do fenótipo.

A quimiocina MCP-1 é uma proteína de baixo peso molecular relacionada ao recrutamento de linfócitos e monócitos e a processos inflamatórios crônicos. O gene que codifica a MCP-1 está localizado na região cromossômica 17q11.2 – q12 e o SNP- 2518A/G (rs1024611) pode influenciar a secreção de MCP-1 (GONG *et al.*, 2013). Apesar do seu papel primordial na migração de células efectoras pouco se sabe sobre seus perfis das quimiocinas em pacientes de hanseníase (de SOUZA *et al.*, 2016).

No presente estudo houve diferença na distribuição dos genótipos de MCP-1 entre os grupos de doentes e coabitantes sadios não consanguíneos tendo sido o genótipo GG mais frequente nos doentes em relação aos sadios ($p=0,015$). Embora não tenha havido diferença na distribuição dos genótipos de MCP-1 conforme a forma clínica da hanseníase comparada aos sadios, o genótipo GG foi mais frequente nos doentes que apresentaram reação hansênica ($p=0,029$).

Em relação à tuberculose, doença causada por micobactéria intracelular, um estudo realizado no México envolvendo 445 doentes e 518 controles evidenciou que indivíduos com tuberculose portadores do alelo G apresentaram os níveis séricos mais elevados de MCP-1 e os níveis plasmáticos mais inferiores de IL12p40. Além disso, o risco de desenvolver tuberculose foi 2,3 e 5,4 vezes maior em portadores de genótipos de AG e GG de MCP-1 respectivamente do que nos homozigoto AA. Posteriormente esse estudo foi replicado com indivíduos coreanos pelo mesmo grupo arrolando 129 indivíduos com tuberculose e 162 sujeitos sadios. Nessa pesquisa o risco de desenvolver tuberculose foi 2,8 e 6,9 vezes maior em portadores de genótipos AG e GG de MCP-1 do que nos homozigotos AA. Diante de tais achados os autores concluíram que, provavelmente, os indivíduos que possuem genótipo GG

de MCP-1 produzem altas concentrações dessa quimiocina, a qual inibe a produção de IL - 12p 40, com conseqüente supressão da resposta Th1 e maior probabilidade de que a infecção pelo *M. tuberculosis* progrida para tuberculose pulmonar ativa. (FLORES-VILLANUEVA *et al.*, 2005).

Por sua vez, um grupo de pesquisadores brasileiros realizou um estudo de caso-controle, ratificado por análise baseada em família, o qual evidenciou associação entre o alelo G -2518 de MCP-1 de níveis elevados de MCP-1 no plasma e em macrófagos com leishmaniose mucosa. O genótipo recessivo GG - 2518 de MCP-1 foi mais comum nos indivíduos com leishmaniose mucosa (N = 67) do que nos indivíduos controle (N = 60) (OR= 1,78; IC=95% 1,01 – 3,14; p = 0,045), do que em controles combinado com teste cutâneo de sensibilidade tardia (DTH) positivo (N = 60; OR= 4.40; IC=95% 1,42 – 13,65; p= 0,010), e do que em controles combinados com doentes acometidos por leishmaniose cutânea (N = 60; OR= 2,78; IC=95% 1,13 – 6,85; p = 0,045). No estudo baseado em família (91 indivíduos com leishmaniose mucosa e 223 casos com leishmaniose cutânea nas famílias) confirmou a associação recessiva do alelo G com leishmaniose mucosa (Z = 2.679; P = 0,007). Níveis mais elevados de MCP-1 ocorreram no tanto plasma (p = 0,03) quanto em macrófagos (P < 0,0001) de indivíduos com genótipo GG em comparação com indivíduos com genótipo AA. Tais resultados sugerem que níveis elevados de MCP-1 aumentam risco de leishmaniose mucosa e uma associação entre o alelo G do promotor -2518 de MCP-1 e susceptibilidade à leishmaniose mucosa após infecção por *Leishmania braziliensis* (RAMASAWMY *et al.*, 2010).

Considerando que o alelo G do SNP rs1024611 de MCP-1 está associado a maior risco de tuberculose, é possível inferir que tal alelo também esteja associado a maior risco de hanseníase fato que corrobora o achado dessa pesquisa de maior frequência do genótipo GG em sujeitos doentes em relação aos sadios (p=0,015). No que tange a hanseníase, há dados conflitantes a respeito dos níveis séricos de MCP-1. Alguns pesquisadores analisaram a expressão das quimiocinas MCP-1, RANTES (CCL5) e IL-8 (CXCL8) em lesões hansênicas por hibridação *in situ* e, a despeito da elevação de todas as quimiocinas, não houve diferença no nível de expressão relacionada ao espectro da doença. Entretanto, os níveis de MCP-1 e RANTES foram elevados na reações reversas, indicando ação dessas quimiocinas na migração e ativação de monócitos e células T nessas lesões (KIRKALDY *et al.*, 2002).

Embora alguns estudos tenham relatado níveis elevados de MCP-1 e interleucina-8 relacionados à forma virchowiana da hanseníase (LEW *et al.*, 2002; HASAN, MAHMOOD, ZAFAR, 2004), uma pesquisa envolvendo indivíduos brasileiros mostrou níveis elevados de

apenas CCL3 (MIP-1 α) e eotaxina mas não de CCL2, CXCL9 e CXCL10 em sujeitos acometidos com hanseníase em relação aos sadios (MENDONÇA *et al.*, 2007). Em contrapartida, níveis reduzidos de MCP-1 associados a uma resposta de TNF α baixa podem contribuir para o crescimento desenfreado e disseminação das micobactérias encontradas na forma virchowiana da doença (HASAN *et al.*, 2006).

No presente estudo, em relação à IL-17, o genótipo GG foi mais observado não apenas sujeitos doentes (p=0,031) mas naqueles com a forma multibacilar da hanseníase (p=0,031). No entanto, comparando a frequência dos genótipos de IL-17 nos indivíduos sadios e nos acometidos que tenham manifestado ou não reação hansênica, não houve diferença na distribuição genotípica entre os grupos.

Atualmente sabe-se que a resposta imune de alguns indivíduos com hanseníase não se comportam segundo a dicotomia Th1 e Th2 das células T helper e respectivas citocinas. Habitualmente considera-se que os indivíduos com hanseníase virchowiana apresentam resposta tipo Th2 com produção de IL-4, IL-5 e ausência da ação de IFN- γ sobre o *M. leprae*. Na hanseníase tuberculóide predomina a resposta Th1 principalmente devido à ação de IL-2 e IFN- γ . Entretanto alguns pacientes em ambos os tipos de hanseníase apresentam um padrão de resposta presença concomitante de IL-4 e IFN- γ indicando um padrão de resposta não polarizada denominada Th0.

As células Th17 surgiram como um terceiro subconjunto de células Th e seu papel frente a algumas condições clínicas é controverso. Enquanto são consideradas como fundamentais na proteção do hospedeiro contra infecções fúngicas (LEIBUNDGUT-LANDMANN, 2015), desempenham um papel primordial na gênese de doenças autoimunes como colite ulcerativa (CHEN *et al.*, 2010), doença enxerto versus hospedeiro (ESPINOZA *et al.*, 2011) e asma (HAYASHI *et al.*, 2013) e conferem susceptibilidade a tuberculose (OCEJO-VINYALS *et al.*, 2013) e câncer gástrico. Tais células são independentemente reguladas pelas células T CD4⁺ e caracterizadas como produtoras de citocinas da família IL-17. Ademais estimulam a produção, por células epiteliais e endoteliais e monócitos, de citocinas como IL-6 e TNF e de quimiocinas (PITTA *et al.*, 2009).

O polimorfismo rs 2275913 de IL-17 está localizado na posição 152bp *upstream* do sítio inicial de RNA mensageiro de IL-17 (CHEN *et al.*, 2010). Em uma coorte envolvendo 438 pares de pacientes e seus doadores não relacionados a transplantados através do programa de doador de medula do Japão, o alelo de 197A de IL-17 do doador foi associado a um risco maior doença enxerto contra o hospedeiro aguda (OR= 1,46; intervalo de confiança de 95% [IC], 1,00 a 2,13; p = 0,05). Além disso, células T dos sujeitos sadios foram estimuladas *in vitro*

e as que possuíam o alelo -197A produziram significativamente mais IL-17 do que aqueles sem o alelo de 197A. Por sua vez, o alelo -197A apresentou maior afinidade às células T do fator nuclear ativado (NFAT), um fator de transcrição crítica envolvido na regulação de IL-17. Tais dados reforçam a importância funcional do SNP rs2275913 e mostram que a maior secreção de IL-17 por indivíduos com o alelo de 197A possivelmente está associado a risco aumentado para doença enxerto contra o hospedeiro aguda e certas doenças autoimunes (ESPINOZA *et al.*, 2011).

Em uma metanálise na qual foram arrolados nove estudos, envolvendo 3.181 casos e 4.005 controles, foram encontrados portadores da variante -197A alelo associados com um risco significativamente aumentado de câncer (GA/AA vs GG; OR = 1,27; IC=95%; p heterogeneidade = 0,374) [WANG *et al.*, 2015]. Recentemente foi publicado um estudo espanhol de caso controle envolvendo 192 indivíduos com tuberculose pulmonar e 266 controles saudáveis doadores de sangue que sugere associação entre rs2275913 IL-17A genótipo GG com susceptibilidade à tuberculose pulmonar (OR = 1,59, IC 95%= 1,09–2,31, p = 0.015) [OCEJO-VINYALS *et al.*, 2013].

Em um estudo realizado na Índia, foram encontradas evidências para a presença de células Th17 de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas com antígeno e fragmentos de biópsia de hanseníase tuberculóide. Isoformas de IL-17 mostraram significativamente maior expressão e liberação de sobrenadantes de cultura de PBMC estimuladas com antígeno sonicado de *M leprae* e lesões dérmicas de contatos saudáveis e doentes com hanseníase tuberculóide em comparação àqueles com hanseníase virchowiana (p=0,003). Vale ressaltar ainda a associação de IL-23R e não IL-6R com células Th 17 (SAINI, RAMESH, NATH, 2013).

No entanto em uma pesquisa envolvendo 75 mexicanos com diagnóstico da hanseníase, dos quais 62 tinham hanseníase virchowiana, e 69 controles saudáveis, não foi observada associação de susceptibilidade à hanseníase com genótipos ou frequências alélicas de IL-17A G-197A (rs227593) e IL-17F A7488G (rs763780), sugerindo que os SNPs de IL-17 não tem nenhum papel significativo na susceptibilidade genética para o desenvolvimento dessa doença na população mestiça mexicana (ESCAMILA-TILCH, *et al.*, 2014).

Os achados desse estudo mexicano estão em dissonância aos observados no estudo em tela no qual o genótipo GG foi o mais encontrado nos doentes (p=0,031), majoritariamente naqueles com a forma multibacilar da doença (p=0,031), assim como o alelo G foi o mais frequente nos doentes (p=0,019). Por outro lado os achados descritos na pesquisa em foco vão ao encontro aos relatados no estudo espanhol envolvendo indivíduos com tuberculose

pulmonar cujos resultados evidenciaram associação entre rs2275913 IL-17A e genótipo GG com susceptibilidade à tuberculose.

Quanto à análise de agrupamentos conforme características clínicas e frequências genótípicas, o grupo 1 foi composto eminentemente por doentes (86,7%) e o grupo 5 foi constituído apenas de acometidos. Em ambos os grupos o genótipo GG de IL-17 foi o único presente enquanto o genótipo GG de MCP-1 foi o mais encontrado no grupo 1 e ausente no grupo 5. Apesar da ausência do genótipo GG de MCP-1 do grupo 5, sendo que esse genótipo é associado a maior susceptibilidade à tuberculose, é válido inferir que a presença do genótipo GG de IL-17 tenha contribuído para a maior susceptibilidade dos sujeitos do grupo 5 à hanseníase.

Outro dado que corrobora para a provável contribuição do genótipo GG do IL-17 à susceptibilidade à doença é a ausência do alelo G de MCP-1 nos grupos 1 e 5 maior frequência ao alelo G de IL-17 em ambos grupos cujas composições foram primordialmente de doentes.

A realização de estudos funcionais é fundamental para melhor esclarecimento dos achados aqui descritos. Apesar das citocinas e quimiocinas serem proteínas de fase aguda inespecíficas, seu uso como marcadores biológicos associados ao títulos de PGL-I, principal glicolípido antigênico do *M. leprae*, juntamente com caracterização clínica e perfil genético pode subsidiar maior robustez às ferramentas imunodiagnósticas.

10 CONCLUSÕES

- Foi observada associação entre o genótipo GG de IL-17 com hanseníase per se;
- Foi observada associação entre o genótipo GG de MCP-1 com hanseníase per se;
- A análise de agrupamentos confirmou a associação entre o genótipo GG de IL-17 e GG de MCP-1 com maior susceptibilidade à hanseníase;
- O genótipo GG do IL-17 também está associado à ocorrência de reação hansênica.

11 PERSPECTIVAS

- Realizar estudos funcionais para averiguar ocorrência das associações encontradas em indivíduos contactantes com genótipos opostos desses genes;
- Verificar se as associações encontradas nesse estudo de caso-controle ocorrerão nos estudos de família.

REFERÊNCIAS

- ALCAIS, A., MIRA, M., CASANOVA, J.L, SCHURR, E, ABEL, L. Genetic dissection of immunity in leprosy. **Curr. Opin. Immunol.** v.17: p. 44–48, 2005.
- ALI, S. *et al.*, Association of variants in BAT1-LTA-TNF-BTNL2 genes within 6p21.3 region show graded risk to leprosy in unrelated cohorts of Indian population. **Hum. Genet.** v. 131: p. 703–716, 2012.
- ALTER, A. *et al.*, Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy. **Hum. Genet.** v. 132:p. 107–116, 2013.
- ALTER, A., *et al.*, Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. **Hum. Genet.** v. 127: p. 337–348, 2010.
- ALTER, A., *et al.*, Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. **Hum. Genet.** v. 123, p. 227–235, 2008.
- BAKIJA-KONSUO, A. *et al.*, Leprosy epidemics during history increased protective allele frequency of PARK2/PACRG genes in the population of the Mljet Island, Croatia. **Eur. J. Med. Genet.** v. 54: p. e 548–552, 2011.
- BELGAUMKAR, V.A. *et al.*, Circulating cytokine profiles in leprosy patients. **Lepr. Rev.** v. 78:p. 223–230, 2007.
- BEM-SELMA, W.; HARIZI, H.; BOUKADIDA. J. MCP-1 22518 A/G functional polymorphism is associated with increased susceptibility to active pulmonary tuberculosis in Tunisian patients. **Mol Biol Rep** v.38: p.5413–5419, 2011.
- BERRINGTON, W.R, *et al.*, Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. **J. Infect. Dis.** v. 201: p. 1422–1435, 2010.
- BIGGS, T.E. *et al.*, Nramp1 modulates iron homeostasis *in vivo* and *in vitro*: evidence for a role in cellular iron release involving de-acidification of intracellular vesicles. **Eur. J. Immunol.** v. 31: p. 2060–2070, 2001.
- BLEHARSKI, J.R. *et al.*, Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. **Science.** v. 301: p.1527–1530, 2003.
- BOCHUD, P. Y., *et al.*, Polymorphisms in TLR2 are associated with increased viral shedding and lesion rate in patients with genital herpes simplex virus Type 2 infection. **J. Infect. Dis.** v. 196: p. 505–509, 2007.
- BOCHUD, P.Y. *et al.*, Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 1055; p. 65, 2009.
- BOCHUD, P.Y. *et al.*, Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **J. Infect. Dis.** v. 197: p. 253–261, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados 2014**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/27/Dados-2014---final.pdf>, acessado

em: 28 dez 2015.

BRITO, A. F. M. *et al.*, Association between leprosy reactions after treatment and bacterial load evaluated using anti PGL-I serology and bacilloscopy. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 2, p. 67-72, 2008.

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

CARDONA-CASTRO, N., SANCHEZ-JIMENEZ, M., ROJAS, W., BEDOYA-BERRIO, G. IL-10 gene promoter polymorphisms and leprosy in a Colombian population sample. **Biomedica**. v. 32: p. 71–76, 2012.

CARDOSO, C.C. *et al.*, TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. **J. Infect. Dis.** v. 204: p. 1256–1263, 2011b.

CARDOSO, C.C., PEREIRA, A.C., DE SALES MARQUES, C., MORAES, M.O. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiol.** v. 6: p. 533–549, 2011a.

CARVALHO, L.P., *et al.*, Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. **Parasite Immunol**, v. 29(5): p. 251-258, 2007.

CASANOVA, J.L. *et al.*, Forward genetics of infectious diseases: immunological impact. **Trends Immunol**, v. 23(10):p. 469-472, 2002.

CASANOVA, J.L., ABEL, L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. **Annu. Rev. Immunol.** v. 20: p. 581–620, 2011.

CASTELLUCCI, L. *et al.*, Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73(1), p. 69-73, 2005.

CHAITANYA V.S., *et al.*, Interleukin-17F single-nucleotide polymorphism (7488T>C) and its association with susceptibility. **Int J Immunogenet.** v. p. 41(2):131-137, 2014.

CHEN, J. *et al.*, The Polymorphism of IL-17 G-152A was Associated with Childhood Asthma and Bacterial Colonization of the Hypopharynx in Bronchiolitis **J Clin Immunol.** v. 30: p. 539–545, 2010.

CHO, SN, *et al.*, Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clin. Diagn Lab. Immunol.** v. 8: p. 138–142, 2001.

CRUZ, D, Watson, AD, Miller, CS, Montoya, D, *et al.*, Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. **J. Clin. Invest.** v. 118:p. 2917–2928, 2008.

D'AVILA, H. *et al.*, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **J. Immunol.** v.176: p.3087–3097, 2006.

de LÉSÉLEUC, L. *et al.*, PARK2 mediates interleukin 6 and monocyte chemoattractant

- protein 1 production by human macrophages. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 7: e2015.
- de MESSIAS-REASON, I.J. *et al.*, The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. **J. Infect. Dis.** v. 196: p.1379–1385, 2007.
- DESHMANE, S.L., KREMLEV, S., AMINI, S., SAWAYA, B.E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J. Interferon Cytokine Res.** v. 29: p.313–326, 2009.
- ESCAMILLA-TILCH *et al.*, Lack of Association of the Polymorphisms IL-17A (-197G/A) and IL-17F (+7488A/G) with Multibacillary Leprosy in Mexican Patients. **Int J Genomics:** Article ID 920491, 2014.
- ESPINOZA, J.L. *et al.*, A Genetic Variant in the IL-17 Promoter Is Functionally Associated with Acute Graft-Versus-Host Disease after Unrelated Bone Marrow Transplantation. **PLoS ONE** 6(10): e26229, 2011.
- FENG, W.X. *et al.*, CCL2-2518 (A/G) polymorphisms and tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.** v. 16:p. 150–156, 2001.
- FERREIRA, F. R., *et al.*, Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMPI promoter polymorphisms and the lepromin response. **Int J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 72: 457–467, 2004.
- FERWERDA, G. *et al.*, Mycobacterium paratuberculosis is recognized by Toll-like receptors and NOD2. **J. Leukoc. Biol.** v.82: p.1011–1018, 2007.
- FERWERDA, G. *et al.*, NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog.** v. 1: p.279–285, 2005.
- FITNESS, J.; TOSH, K.; HILL, A.V.S. Genetics of susceptibility to leprosy. **Genes and Immunity**, v.3, p. 441-453, 2002.
- FLORES-VILLANUEVA, P.O. *et al.*, A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. **J. Exp. Med.**v. 202: p.1649–1658, 2005.
- FRANCESCHI, D. S. *et al.*, Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **Int. J. Infect. Dis.** v.13: p.493–498, 2009.
- GIASSON, B. I., LEE, V. M. Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. **Neuron** v.31: p.885–888, 2001.
- GOULART, I.M., GOULART, LR. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Arch. Dermatol. Res.** v. 300: p.269–290, 2008.
- GOULART, L.R., FERREIRA, F.R., GOULART, I.M. Interaction of TaqI polymorphism at exon 9 of the vitamin D receptor gene with the negative lepromin response may favor the occurrence of leprosy. **FEMS Immunol. Med. MicroBiol.** v.48: p.91–98, 2006.
- GULIA, A, FRIED, I, MASSONE, C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. **F1000 Med. Rep** 2, 2010.

HAGGE, D. A. *et al.*, A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. **J. Infect. Dis.** v.186: p.1283–1296, 2002.

HAGGE, D.A. *et al.*, Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. **Am. J. Pathol.** v.174:p. 1379–1389, 2009.

HALVORSEN, B. *et al.*, Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms. **J. Lipid Res.** v.46: p.211–219, 2005.

HASAN Z. *et al.*, Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.**; v.72:p.35-44, 2004.

HASAN, Z. *et al.*, Elevated Serum CCL2 Concomitant with a Reduced *Mycobacterium*-Induced Response Leads to Disease Dissemination in Leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology.** v. 63(3), p. 241–247, 2006.

HASAN, Z. *et al.*, Elevated Serum CCL2 Concomitant with a reduced *Mycobacterium*-Induced Response Leads to Disease Dissemination in Leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology.** v. 63(3), p. 241–247, 2006.

HATTA, M. *et al.*, NRAMP1/SLC11A1 gene polymorphisms and host susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae* in South Sulawesi, Indonesia. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.** v. 41: p.386–394, 2010.

HAWN, T.R. *et al.*, A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. **Eur. J. Immunol.** v. 37: p. 2280–2289, 2007.

HAYASHI, R. *et al.*, Influence of IL17A polymorphisms (rs2275913 and rs3748067) on the susceptibility to ulcerative colitis. **Clin Exp Med.** v. 13: p .239–244, 2013.

HAYES, C.E., NASHOLD, F.E., SPACH, K.M., PEDERSEN, L.B. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. **Cell. Mol. Biol.** v. 49: p. 277–300, 2003.

HUSSAIN, R. *et al.*, CCL2/MCP-I genotype-phenotype relationship in latent tuberculosis infection. **PLoS One.** v.6: e25803, 2011.

JACK, D.L., KLEIN, N.J., TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunol. Rev.** v. 180: p. 86–99, 2001.

JACK, D.L., TURNER, M.W. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. **Biochem. Soc. Trans.** v. 31: p. 753–757, 2003.

JAMIESON, SE, *et al.*, Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. **Genes Immun.** v. 5:p. 46–57, 2004.

JARDIM, M.R, *et al.*, Pure neural leprosy: steroids prevent neuropathy progression. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 65: p. 969–973, 2007.

JULLIEN, D., *et al.*, IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. **J. Immunol.** v. 158: p.800–806, 1997.

KAHAWITA, I.P., LOCKWOOD, D.N. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. **Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 102: p. 329–337, 2008.

KANG, T.J. *et al.*, Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunology**, v. 112, p. 674–680, 2004.

KIM, J. *et al.*, A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. **J. Immunol.** v.167: p. 779–786, 2001.

KIRKALDY, A.A. *et al.* Expression of CC and CXC chemokines and chemokines receptors in human leprosy skin lesions. **Clin Exp Immunol.**, v. 134, p. 447-53, 2003.

KRISTIANSEN, M. *et al.*, Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**. v. 409: p.198–201, 2001.

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

KRUTZIK, S.R. *et al.*, TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat. Med.**v. 11: p. 653–660, 2005.

LEE, H., *et al.*, Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 350: p. 742–747, 2006.

LINCOLN, M.R. *et al.*, A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. **Nat. Genet.** v. 37: p. 1108–1112, 2005.

LOCKWOOD, D.N. Leprosy. **Clin. Evid.** v. 12: p. 1103–1114, 2004.

LOCKWOOD, D.N., VINAYAKUMAR, S., STANLEY, J.N., MCADAM, K.P, COLSTON, M.J. Clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad, India. **Int J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**v. 61:p. 8–15, 1993.

MAEDA, Y., MUKAI, T., SPENCER, J., MAKINO, M. Identification of an immunomodulating agent from *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.** v. 73: p. 2744–2750, 2005.

MARQUET, S. *et al.*, Complete nucleotide sequence and genomic structure of the human NRAMP1 gene region on chromosome region 2q35. **Mamm. Genome** v. 11: p. 755–762, 2000.

MARQUET, S.; SCHURR, E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. **Drug Metab Dispos**, v. 29(4), p. 479-483, 2001.

MARTINIUK F, *et al.*, Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **J Drugs Dermatol.** v. 11: p. 626–630, 2012.

MASSONE, C. *et al.*, T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? **Am. J. Dermatopathol.** v.32:p. 251–256, 2010.

- MATTOS, K. A. *et al.*, Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cell. Microbiol.** v. 13: p. 259–273, 2011a.
- MATTOS, K. A. *et al.*, *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. **Cell. Microbiol.** v. 16: p. 797–815, 2014.
- MATTOS, K. A., *et al.*, TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. **J. Immunol.** v. 187: p. 2548–2558, 2011b.
- MEIMA, A, VAN VEEN, N.H., RICHARDUS, J.H. Future prevalence of WHO grade 2 impairment in relation to incidence trends in leprosy: an exploration. **Trop. Med. Int Health.** v. 13:p. 241–246, 2008.
- MEISNER, S.J. *et al.*, Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. **Am J. Trop. Med. Hyg.** v. 65: p. 733–735, 2001.
- MENDONCA V.A. *et al.*, Differentiation of patients with leprosy from non-infected individuals by the chemokine eotaxin/CCL11. **Am J Trop Med Hyg.** v. 77: p. 547-550, 2007.
- MENEZES, E., *et al.*, Association between polymorphisms in genes that influences the immune response with cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Proceedings of the 13th International Congress of Immunology.** p. 423-428, 2007.
- MILLER, E.N. *et al.*, Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. **Genes and Immunity.** v. 5: p. 63-67, 2004.
- MIRA, M.T. *et al.*, Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nat. Genet.** v. 33: p. 412–415, 2003.
- MISCH, E.A, BERRINGTON, W.R, VARY, J.C, JR, HAWN, T.R. Leprosy and the human genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 74: p. 589–620, 2010.
- MODLIN, R.L. The innate immune response in leprosy. **Curr. Opin. Immunol.** v. 22: p. 48–54, 2010.
- MOSSER, D.M., EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.** v. 8: p. 958–969, 2008.
- MOTTA, AC. *et al.*, The recurrence of leprosy reactional episodes could be associated with oral chronic infections and expression of serum IL-1, TNF- α , IL-6, IFN- γ and IL-10. **Braz. Dent. J.** v. 21: p. 158–164, 2010.
- MURRAY, RA, SIDDIQUI, MR, MENDILLO, M, KRAHENBUHL, J, KAPLAN, G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. **J. Immunol.** 2007; 178: 338–344.
- NAEGER, L.K., *et al.*, Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling. **J. Biol. Chem.** 274: 1875–1878, 1999.

NEVO, Y., NELSON, N. The NRAMP family of metal-ion transporters. **Biochim Biophys. Acta.** v. 1763: p. 609–620, 2006.

NG, V. *et al.*, Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell.** v.103: p. 511–524, 2000.

OCEJO-VINYALS, J.G. *et al.*, The IL-17 G-152A single nucleotide polymorphism is associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain **Cytokine** v. 64, p. 58–61, 2013.

OHYAMA, H. *et al.*, Differential effects of polymorphisms in the 5' flanking region of IL12RB2 on NK- and T-cell activity. **J. Interferon Cytokine Res.** v. 28: p. 563–569, 2008.

OHYAMA, H. *et al.*, Polymorphism of the 5' flanking region of the IL-12 receptor β 2 gene partially determines the clinical types of leprosy through impaired transcriptional activity. **J. Clin. Pathol.**v. 58: P. 740–743, 2005.

PACHECO, A.G, CARDOSO, C.C, MORAES, M.O. IFNG +874T/A, IL10-1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Hum. Genet.** v. 123: p. 477–484, 2008.

PALERMO, M.L. *et al.*, Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 86: p. 878–883, 2008.

PARTIDA-SANCHEZ, S. *et al.*, IgG antibody subclasses, tumor necrosis factor and IFN- γ levels in patients with type II lepra reaction on thalidomide treatment. **Int. Arch. Allergy Immunol.** v. 116: p. 60–66, 1998.

PENNA, G.O. *et al.*, Clinical and epidemiological study of leprosy cases in the University Hospital of Brasilia: 20 years—1985 to 2005. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 41: p. 575–580, 2008.

PEREIRA, A.C, *et al.*, Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. **Genes Immun.** v. 10: p. 174–180, 2009.

PHILIPPIDIS, P. *et al.*, Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis—antiinflammatory monocyte-macrophage responses *in vitro*, in resolving skin blisters *in vivo*, and after cardiopulmonary bypass surgery. **Circ. Res.** v. 94: p. 119–126, 2004.

PIMENTEL, M. I., *et al.*, 2004. Impairments in multibacillary leprosy; a study from Brazil. **Lepr. Rev.** v. 75: p. 143–152, 2004.

PITTA, M.G. *et al.*, IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani* **J. Clin. Invest.** v. 119: p. 2379–2387, 2009.

PLATT, N. *et al.*, Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 93: p. 12456–12460, 1996.

RAMASAWMY, R., *et al.*, BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic Chagas cardiomyopathy. **J. Infect. Dis.** v. 93(10), p. 1394-1399, 2006.

RAMBUKKANA, A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium*

leprae. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 4: p. 21–27, 2001.

RATLEDGE, C., DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 54: p. 881–941, 2000.

REMUS, N., ALCAIS, A., ABEL, L. Human genetics of common mycobacterial infections. **Immunol. Res.** v. 28: p. 109–129, 2003.

RICHARDUS, J. H., *et al.*, Adverse events of standardized regimens of corticosteroids for prophylaxis and treatment of nerve function impairment in leprosy: results from the 'TRIPOD' trials. **Lepr. Rev.** v. 74: p. 319–327, 2003.

RIDLEY, D.S., JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** v. 34: p. 255–273, 1996.

RIDLEY, DS, JOPLING, WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 1966; 34: 255–273.

RIENECK, K. *et al.*, In vitro immunomodulatory effects of pentoxifylline. **Immunol. Lett.** v.37 (2–3): p.131–138, 1993.

RINALDI, ANDREA. The global campaign to eliminate leprosy. **PLoS Medicine**, v. 2 (12), p. 1222-1225, 2005.

ROY, S. *et al.*, Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. **J. Infect. Dis.** v. 176: p. 530–532, 1997.

RUSSELL, D.G. *et al.*, Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nat. Immunol.** v. 10: p. 943–948, 2009.

SAINI C., RAMESH V., NATH I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 9(7): e 2338, 2013.

SAINI, C., RAMESH, V., NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis** 9(7): e2338, 2013.

SALGAME, P., YAMAMURA, M., BLOOM, B.R, MODLIN, R.L. Evidence for functional subsets of CD4+ and CD8+ T cells in human disease: lymphokine patterns in leprosy. **Chem. Immunol.** v. 54 :p. 44–59, 1992.

SANTOS, DO, CASTRO, HC, BOURGUIGNON, SC, BASTOS, OM, RODRIGUES, CR, VAN HEUVERS WYN, H, NERY, JA, MIRANDA, A. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. **Clin. Exp. Dermatol.** 2007; 32: 75–80.

SAPKOTA, B.R. *et al.*, Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. **Hum. Immunol.** v.71(10): p.992–998, 2010.

SARNO, E.N., GRAU, G.E., VIEIRA, L.M., NERY, J.A. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 β during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.** v. 84: p. 103–108, 1991.

- SCHLESINGER, L.S. *et al.*, Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. **J. Immunol.** v. 157 : p. 4568–4575, 1996.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P.J., RAVASI, T., HUME, D.A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.** v. 75: p. 163–189, 2004.
- SCHURING, R. P. *et al.*, Preventing nerve function impairment in leprosy: validation and updating of a prediction rule. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 2: e 283, 2008.
- SCOLLARD, D. M. *et al.*, Immune complexes and antibody levels in blisters over human leprosy skin lesions with or without erythema nodosum leprosum. **Clin. Immunol. Immunopathol.** v. 63: p. 230–236, 1992.
- SCOLLARD, D.M. *et al.*, The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19:p. 338–381, 2006b.
- SCOLLARD, D.M. The biology of nerve injury in leprosy. **Lepr. Rev.** v. 79: p.242–253, 2008.
- SCOLLARD, D.M., *et al.*, Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. **Clin. Infect. Dis.** v. 43: e19–22, 2006a.
- SCRIBA, T. J.; KALSDORF, B.; ABRAHAMS, D. Human mycobacteria-specific IL-17₊ and IL -22₊ t cells. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 1962–1970, 2008.
- SHA, W., TANG, S.J., XIAO, H.P. Advances in the study of human genetic polymorphisms in tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. **Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi** v.33: p.534–536, 2010.
- SHAW, M-A *et al.*, Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumor necrosis factor genes. **Genes and Immunity**, v. 2 p. 196-204, 2001.
- SHEN, J., LIU, M., ZHOU, M., WENGZHONG, L. Occurrence and management of leprosy reaction in China in 2005. **Lepr. Rev.** v.80: p.164–169, 2009.
- SIDDIQUI, M. R., *et al.*, A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nat. Genet.** v.27: p.439–441, 2001.
- SIDDIQUI, M. R., *et al.*, Local nerve damage in leprosy does not lead to an impaired cellular immune response or decreased wound healing in the skin. **J. Infect. Dis.** v. 186: p.260–265, 2002.
- SIELING, P. A., *et al.*, CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. **J. Immunol.** v. 162: p. 1851–1858, 1999.
- SIMÕES QUARESMA, J. A., *et al.*, CD1a and factor XIIIa immunohistochemistry in leprosy: a possible role of dendritic cells in the pathogenesis of *Mycobacterium leprae* infection. **Am. J. Dermatopathol.** p. 31: v. 527–531, 2009.
- SINSIMER, D. *et al.*, *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. **Infect. Immun.** v. 78: p. 293–300, 2010.

SMITH, W.C. *et al.*, Steroid prophylaxis for prevention of nerve function impairment in leprosy: randomised placebo controlled trial (TRIPOD 1). **BMJ**. v. 328: p. 1459–1464, 2004.

SOUZA, V.N.B. *et al.*, Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge. **Clinics in Dermatology**. v. 34, p. 82–95, 2016.

SPARBER, F., LEIBUNDGUT-LANDMANN, S. Interleukin 17-Mediated Host Defense against *Candida albicans* **Pathogens**. v. 4, p. 606-619; 2015.

STEFANI, M. M., *et al.*, In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. **J. Infect. Dis.** v. 188: p. 1024–1031, 2003.

STEFANI, M.M. *et al.*, Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infect. Dis.** v. 9: p. 75, 2009.

TANIGAWA, K. *et al.*, Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 289: p. 72–79, 2008.

TEIXEIRA, M.A. *et al.*, NRAMP1 gene polymorphisms in individuals with leprosy reactions attended at two reference centers in Recife, northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.** v. 43: p. 281–286, 2010.

TERPSTRA, V.; BIRD, D.A.; STEINBERG, D. Evidence that the lipid moiety of oxidized low density lipoprotein plays a role in its interaction with macrophage receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.95: p.1806–1811, 1998.

TIAN, G.; MEI Y., LING, QI; MIN, S.; YUKAI, DU. Association of MCP-1 -2518A/G and -362G/C variants and tuberculosis susceptibility: A meta-analysis. **Infection, Genetics and Evolution**: v, 20; p. 1–7, 2013.

TOWERS, T.L.; FREEDMAN, L.P. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transcription is directly repressed by the vitamin D3 receptor. Implications for allosteric influences on nuclear receptor structure and function by a DNA element. **J. Biol. Chem.** v. 273: p. 10338–10348, 1998.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. **Blood**. v. 84: p. 4008–4027, 1994.

TRIPP, C.S., BECKERMAN, K.P., UNANUE, E.R. Immune complexes inhibit antimicrobial responses through interleukin-10 production. Effects in severe combined immunodeficient mice during *Listeria* infection. **J. Clin. Invest.** v.95: p.1628–1634, 1995.

TUNG, K.S. *et al.*, Soluble serum interleukin 2 receptor levels in leprosy patients. **Clin. Exp. Immunol.** v.69: p.10–15, 1987.

UITTERLINDEN, A. G., *et al.*, 2004. Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v. 89–90: p.187–193, 2004.

van der MEER-JANSSEN, *et al.*, Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. **Prog. Lipid. Res.** v.49: p. 1–26, 2010.

van VEEN, N. H., *et al.*, Interventions for erythema nodosum leprosum. **Cochrane Database Syst. Rev.**: CD006949, 2009.

van VEEN, N.H., NICHOLLS, P.G., SMITH, W.C., RICHARDUS, J.H. Corticosteroids for treating nerve damage in leprosy. A Cochrane review. **Lepr. Rev.** v. 79: p. 361–371, 2008.

VILLARROEL, M.F., ORSINI, M.B., GROSSI, M.A., ANTUNES, C.M. Impaired warm and cold perception thresholds in leprosy skin lesions. **Lepr. Rev.** v. 78: p. 110–121, 2007.

VIRCHOW, R., KRANKHAFTEN GESCHWÜLSTE Die, HIRSCHWALD August, Berlin, Germany, 1863.

WANG, D. *et al.*, Genetic variants of the MRC1 gene and the IFNG gene are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. **Hum. Genet.** 131,p.1251–1260, 2012.

WANG, H. *et al.*, The IL-17A G-197A and IL-17F 7488T/C polymorphisms are associated with increased risk of cancer in Asians: a meta-analysis. **Drug Design, Development and Therapy.** v. 9: p. 5159–5168, 2015.

WEI, J., CHEN, D. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. **Emerging Microbes and Infections** v. 2, e58-60, 2013.

WHO. **Weekly epidemiological record.** 4 September 2015, 90th YEAR / 4 SEPTEMBRE 2015, 90e ANNÉE No. 36 (90), p. 461–476, 2015.

WILSON, A.G.; DUFF, G.W. Genetic traits in common diseases. **BMJ**, v. 310(6993), p.1482-1483, 1995.

WONG, S.H. *et al.*, Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. **PLoS Pathog.** v. 6: e1000979, 2010.

WOOK, L. *et al.*, Serum monocyte chemoattractant protein-1 is elevated in lepromatous leprosy patients with high bacterial indices. **Int J Lepr Other Mycobact Dis.** v. 70: p. 129-31, 2002.

YAMAMURA, M. *et al.*, Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **J. Immunol.** v. 149: p.1470–1475, 1992.

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

YOUJIN, L.; COLLINS, M., KUCHROO, V. K. Unexpected Targets and Triggers of Autoimmunity. **J Clin Immunol** v. 34 (Suppl 1):S56–S60, 2014.

ZHANG, F.R. *et al.*, Genomewide association study of leprosy. **N. Engl. J. Med.** v. 361: p. 2609–2618, 2009.

ZHOU L., *et al.*, IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol.** v. 8: p. 967–974, 2007.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO		
Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase		
1. N ^o Estudo: _____ - _____		
3. Classificação: <input type="checkbox"/> CASO <input type="checkbox"/> ÍNDICE (1) <input type="checkbox"/> CONTROLE ÍNDICE (2) <input type="checkbox"/> PARENTE do CASO (3)		
2. Família de Relação _____		
IDENTIFICAÇÃO		
4. Se <u>PARENTE</u> :	<input type="checkbox"/> Pai/Mãe (1) <input type="checkbox"/> Irmãos (2) <input type="checkbox"/> Filho(a) (3) <input type="checkbox"/> Avós (4) <input type="checkbox"/> Primos (5) <input type="checkbox"/> Sobrinho(a) (6) <input type="checkbox"/> Tio(a) (7) <input type="checkbox"/> Cônjuge (8) <input type="checkbox"/> Não se aplica (99)	
Relação com caso índice:		
5. Data de Nascimento _____ / _____ / _____ (dd/mm/aaaa)	6. Idade: _____ anos	7. Sexo: <input type="checkbox"/> F (1) <input type="checkbox"/> M (2)
8. Raça: <input type="checkbox"/> branca(1) <input type="checkbox"/> negra(2) <input type="checkbox"/> parda(3) <input type="checkbox"/> indígena(4)		
9. Escolaridade: <input type="checkbox"/> Analfabeto (1) <input type="checkbox"/> Ensino fundamental (completo/incompleto) (2) <input type="checkbox"/> Ensino médio (completo/incompleto) (3) <input type="checkbox"/> Ensino superior (completo/incompleto) (4)		
10. Ocupação:	11. <input type="checkbox"/> Urbana (1) <input type="checkbox"/> Rural (2)	
12. Endereço:	13. Telefone:	
14. Cidade:	15. Estado:	

FATORES AMBIENTAIS	
16. Já trabalhou como caçador ou acompanhou-os?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
17. Caso a resposta seja afirmativa , por quanto tempo (aproximado)?	_____ meses <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
18. Que tipo de animal caçou?	_____ ou <input type="checkbox"/> NA(99) [Se 16 for (2)]
19. Tem luz elétrica na casa?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2)
20. Tem água encanada?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2)
21. Tem rede de esgoto?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2)
22. Etilismo?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2)
23. Caso a resposta seja afirmativa, tempo total?	_____ meses ou <input type="checkbox"/> NA(99) [Se 22 for (2)]
24. Ex-Etilista?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) ou <input type="checkbox"/> NA(99)
25. Caso a resposta seja afirmativa, há quanto tempo parou?	_____ meses ou <input type="checkbox"/> NA(99) [Se 24 for (2)]
26. Há quanto tempo mora na mesma casa que o [caso índice]?	_____ meses ou <input type="checkbox"/> NA(99)
27. Há mais alguém [além do caso índice] com Hanseníase na família?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2)
28. Caso a resposta seja afirmativa , quantos parentes?	_____ parentes ou <input type="checkbox"/> NA(99) [Se 27 for (2)]
29. Caso a resposta seja afirmativa , qual o grau de parentesco?	<input type="checkbox"/> Pai/Mãe (1) <input type="checkbox"/> Irmãos (2) <input type="checkbox"/> Filho (a) (3) <input type="checkbox"/> Avô (ó) (4) <input type="checkbox"/> Primo (a) (5) <input type="checkbox"/> Tio (a) (7) <input type="checkbox"/> Sobrinho(a) (6) <input type="checkbox"/> Cônjuge (8) <input type="checkbox"/> Outro (10) <input type="checkbox"/> NA (99) [Se 27 for (2)]
30. Esta(as) pessoa(as) RESIDEM na mesma casa que você?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NA(99) <input type="checkbox"/> Reside na mesma casa, mas não é parente (4)
31. Você já recebeu BCG?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3)
32. Você já recebeu a segunda dose da BCG?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3)
33. Algum dos seus parentes recebeu a 2 ^a dose da vacina BCG?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3)
34. Caso a resposta acima seja afirmativa , quais familiares?	<input type="checkbox"/> Pai/Mãe (1) <input type="checkbox"/> Irmãos (2) <input type="checkbox"/> Filho(a) (3) <input type="checkbox"/> Avós (4) <input type="checkbox"/> Primos (5) <input type="checkbox"/> Sobrinho(a) (6) <input type="checkbox"/> Tio(7) <input type="checkbox"/> Cônjuge(8) <input type="checkbox"/> NA(99) <input type="checkbox"/> Outro(10)

HEREDOGRAMA

HISTÓRIA DA DOENÇA PREGRESSA

35. Já teve lesão cutânea da Hanseníase anteriormente? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 44 .	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
36. Caso a resposta seja afirmativa , qual foi a data de início? ____ / ____ (mm/aaaa)	OU a idade de início? ____ anos <input type="checkbox"/> NA(99)
37. Caso a resposta seja afirmativa , apresentou quantas lesões?	____ lesões cutâneas <input type="checkbox"/> NA(99)
38. Tem até hoje cicatrizes cutâneas características de Hanseníase?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
39. Você recebeu tratamento para a Hanseníase?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
40. Caso a resposta seja afirmativa , você completou o tratamento?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
41. Quanto tempo durou o seu tratamento?	____ meses <input type="checkbox"/> NA(99)
42. Desenvolveu algum tipo de Reação?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
43. Caso a resposta seja afirmativa , quando desenvolveu (em relação ao tratamento)?	<input type="checkbox"/> Antes(1) <input type="checkbox"/> Durante(2) <input type="checkbox"/> Depois(3) <input type="checkbox"/> NA(99)

HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL

44. Observa-se lesão cutânea ativa?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
45. Caso a resposta seja afirmativa , apresenta quantas lesões?	____ lesões ou <input type="checkbox"/> NS(3*) <input type="checkbox"/> NA(99)
46. Caso a resposta seja afirmativa , há quanto tempo apresenta essas lesão(ões)?	____ (meses) ou <input type="checkbox"/> NS(3*) <input type="checkbox"/> NA(99)
47. Você está tratando a Hanseníase ativa? Caso sim responder a questão 77	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NA(99)
48. Houve confirmação da Hanseníase por biópsia?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
49. Qual o nome do Hospital/UBS que recebe atendimento?	____ ou <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
50. Qual a Forma Clínica?	<input type="checkbox"/> HI (1) <input type="checkbox"/> HT (2) <input type="checkbox"/> HDT (3) <input type="checkbox"/> HD (4) <input type="checkbox"/> HDV (5) <input type="checkbox"/> HV(6) <input type="checkbox"/> Neural (7) <input type="checkbox"/> NA(99)
51. Qual o esquema terapêutico ou drogas utilizadas?	<input type="checkbox"/> PQT/PB (1) <input type="checkbox"/> PQT/MB (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
52. Tem a marca da vacina BCG?	<input type="checkbox"/> Sim (1) <input type="checkbox"/> Não (2) <input type="checkbox"/> NS (3) <input type="checkbox"/> NA(99)
53. Grau de incapacidade avaliado no exame neurológico:	<input type="checkbox"/> Grau Zero (1) <input type="checkbox"/> Grau 1 (2) <input type="checkbox"/> Grau 2 (3) <input type="checkbox"/> Grau 3 (4) <input type="checkbox"/> NA(99)

INFORMAÇÃO ADICIONAL

<hr/> <hr/> <hr/> <hr/>

DETECÇÃO DE DOENÇAS ALÉRGICAS - ASMA

54. Alguma vez na vida, você teve sibilos (chiado no peito)? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 59 .	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
55. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 59 .	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
56. Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos você teve?	<input type="checkbox"/> Nenhuma(1) <input type="checkbox"/> 1 a 3 crises(2) <input type="checkbox"/> 4 a 12 crises (4) <input type="checkbox"/> + de 12 (5) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
57. Nos últimos 12 meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?	<input type="checkbox"/> Nunca acordou com chiado (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 noite por semana (2) <input type="checkbox"/> 1 ou mais noites por semana (4) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
58. Nos últimos 12 meses seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de duas palavras entre cada respiração?	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)

59. Alguma vez na vida você teve asma?	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
60. Nos últimos 12 meses você teve chiado no peito após exercícios físicos?	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
61. Nos últimos 12 meses você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)

DETECÇÃO DE DOENÇAS ALÉRGICAS – RINITE (13 A 14 anos)

OBS: Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você não estava gripado ou resfriado!

62. Alguma vez na vida você teve problema com espirros ou coriza (corrimento nasal), quando não estava resfriado ou gripado? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 67 .	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
63. Nos últimos 12 meses você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal quando não estava gripado ou resfriado? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 67 .	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
64. Nos últimos 12 meses esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
66. Nos últimos 12 meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por esse problema nasal?	<input type="checkbox"/> Nada(1) <input type="checkbox"/> Um pouco(2) <input type="checkbox"/> Moderado(4) <input type="checkbox"/> Muito (5) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
67. Alguma vez na vida você teve rinite alérgica?	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)

DETECÇÃO DE DOENÇAS ALÉRGICAS – DERMATITE ATÓPICA

68. Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele, que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses? Se a resposta for não , passe para a questão 73 .	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
69. Nos últimos 12 meses você teve essas manchas na pele (eczema)? Se a resposta for não , passe para a questão 73 .	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
70. Alguma vez essas manchas com coceira afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
71. Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) desapareceram completamente nos últimos 12 meses?	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
72. Nos últimos 12 meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa de coceira na pele?	<input type="checkbox"/> Nunca nos últimos 12 meses (1) <input type="checkbox"/> Menos de 1 noite por semana (2) <input type="checkbox"/> 1 ou mais noites por semana (4) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)
73. Alguma vez você teve eczema?	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2) <input type="checkbox"/> NS(3) <input type="checkbox"/> NA(99)

EXAMES COMPLEMENTARES

74. Baciloscopia	<input type="checkbox"/> Positiva(1) <input type="checkbox"/> Negativa(2) <input type="checkbox"/> NA(99)		
75. Biópsia (descrever)			
76. Parasitológico de Fezes:	1º Exame	2º Exame	3º Exame
77. Há quantos meses trata a Hanseníase ativa?	_____ (meses)		
78. É Tabagista? Se a resposta for sim responda a questão seguinte	<input type="checkbox"/> Sim(1) <input type="checkbox"/> Não(2)		
79. Quantos cigarros diários?	_____		

DADOS DA ENTREVISTA

DATA:	____ / ____ / ____ (dd/mm/aaa)
ENTREVISTADOR:	

APÊNDICE B - CONSENTIMENTO INFORMADO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE

Nome do Projeto: Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase

Nome do Paciente: _____ **REGISTRO.HU:** _____ **Nº:** ____ - ____

Investigador Principal: Amelia Ribeiro de Jesus, médica, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracajú,-Brazil., Tel: (79)3218-1805.

Convite e Objetivo:

Você é convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm Hanseníase. Este estudo incluirá 90 pessoas com esta doença que apresentam formas diferentes de feridas na pele. Além das informações deste documento você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado(a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da Hanseníase.

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela bactéria que causa esta doença. Para isto estudaremos o seu sangue e uma parte do exame de biópsia de sua ferida na pele.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, realizar biópsia da lesão, teste intradérmico e exame de secreção de sua orelha, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença, você doará 40ml de sangue (mais ou menos 3 colheres de sopa) para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo. A retirada do pedaço da pele ou da ferida para diagnóstico da sua doença será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material poderá ser utilizado para os estudos da defesa do seu corpo contra a bactéria que causa a doença. Caso o diagnóstico de Hanseníase não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento sua participação no estudo é de 5 anos, a contar do primeiro dia de tratamento, caso você tenha Hanseníase. Periodicamente, você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de novo tratamento, que também lhe será fornecido gratuitamente.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica e do órgão que protege o indivíduo em pesquisas (Comitê de ética do Hospital Universitário) Você e qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo. Apenas os representantes do Comitê de Ética em Pesquisa poderão ver sua ficha clínica.

Análises de riscos e benefícios: A retirada de seu sangue e de um pedaço da ferida são feitos se você tiver ferida, ainda antes do tratamento, para confirmar o diagnóstico da doença. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue provoca sangramento ou mancha roxa na pele. Como anestesia local é utilizada, a retirada de um pedaço da ferida não é acompanhada de dor. O tratamento que você receberá é igual ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. A participação lhe trará como benefício um acompanhamento clínico mais frequente. Um médico lhe visitará em sua casa para examinar também sua família. Você deve retornar às consultas médicas regularmente de acordo com marcação de seu cartão do Ambulatório do HU

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: A Hanseníase é relacionada a reação do seu organismo contra a bactéria que causa a doença e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle os sintomas e também formas de prevenir a doença.

Custos: Você não terá custos com o tratamento. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contactar um dos seguintes Médicos pelo telefone (79)3237-7353: Dra. Amélia Ribeiro de Jesus Dr. Emerson Ferreira da Costa ou Dr. Roque Almeida. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (79) 3218-1805.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Assinatura do participante

Data

Hora

Assinatura do pesquisador

Data

Hora

Assinatura da testemunha (apenas analfabetos)

Data

Hora

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA O ESTUDO GENÉTICO

Nome do Projeto: Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase

Nome do Paciente: _____ **REGISTRO.HU:** _____
 Nº: ____ - ____

Investigador Principal: Amelia Ribeiro de Jesus, médica, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracajú,-Brazil., Tel: (79)3218-1805.

Este documento foi feito para explicar uma pesquisa e perguntar a você se concordaria de participar desta pesquisa. Se você é o pai/mãe de uma criança menor de 18 anos a palavra você neste documento se refere a seu filho. Você sera solicitado a ler e assinar este documento para dar a permissão ao seu filho para participar desta pesquisa.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo identificar pessoas que têm ou que tiveram Hanseníase. Além disso, estudaremos todos os membros de sua família para verificar se existe alguma predisposição genética para o desenvolvimento desta doença. Após lhe ser explicado o que contém neste questionário você pode perguntar tudo sobre o estudo a seu médico. Todas as famílias dos pacientes com Hanseníase diagnosticados no Hospital Universitário as Universidade Federal de Sergipe serão convidadas a participar do estudo. Caso decida participar do estudo você será solicitado a assinar este formulário de consentimento. Aproximadamente 2000 pessoas participarão deste estudo.

Participação voluntária:

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo, não afetará de modo algum qualquer tratamento que você pode estar recebendo no Hospital Universitário.

Finalidade do estudo: Este estudo visa determinar se familiares de pacientes com Hanseníase têm mais esta doença do que vizinhos que não tem Hanseníase. Adicionalmente, nós tentaremos demonstrar através de estudo genético se existe uma associação entre alguns genes que são transmitidos aos seus filhos que influenciam no desenvolvimento desta doença.

Procedimentos: Caso você aceite participar do estudo um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação, seus hábitos e se você já teve Hanseníase. Um médico examinará você para ver se existe qualquer lesão que indique se você tem ou já teve Hanseníase. Realizaremos também um teste injetando uma pequena quantidade de material da bactéria (duas gotas) na sua pele para verificar se você já teve contato com a bactéria e com a que provoca tuberculose. Caso seja detectada lesão ativa na pele, você será convidado a comparecer no Hospital Universitário para realizar exames de rotina para o diagnóstico da doença, como a biópsia / baciloscopia da lesão para ver a bactéria que causa a doença. Se você concordar em retirar sangue para realização dos estudos de pesquisa genética para avaliar a susceptibilidade a Hanseníase, 10 ml de sangue serão colhidos (equivalente a 1 colher de sopa). Este sangue será utilizado para a obtenção de seu DNA, material que transmite as características genéticas dos pais para os filhos. Este DNA será armazenado no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário, sob a responsabilidade dos Professores Amélia Ribeiro de Jesus (Coordenadora deste projeto) e Roque Pacheco de Almeida (Chefe deste Laboratório), os quais garantirão que este seja utilizado apenas para estudos de Pesquisa em Hanseníase.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada, com outros membros da equipe médica. Do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes.

Análise de riscos e benefícios: A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. O exame da sua pele, poderá documentar que você tenha Hanseníase. Neste caso você será tratado com o mesmo remédio utilizado em todos os pacientes, fornecido gratuitamente. A detecção da doença na fase inicial trará vantagem para você. Este tratamento será acompanhado no Hospital Universitário e caso haja necessidade da realização de exames, ou você apresente complicações do tratamento, você será internado no Hospital Universitário.

Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O diagnóstico precoce da Hanseníase poderá ser feito através do exame. Desde quando toda a família vai ser examinada, se houver algum caso de outra doença na família, uma orientação ou tratamento adequado vai ser oferecido. O melhor conhecimento sobre a Hanseníase poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo e caso necessite de tratamento para Hanseníase a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dra. Amélia Ribeiro de Jesus, Dr. Roque Pacheco de Almeida, responsáveis por este estudo (Tel.: (71)3237-7353 ou 3339-6234). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço consta no início deste consentimento, Tel: (79) 3218-1805.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter as suas amostras de sangue armazenadas para estudos futuros, ressaltando que estas serão utilizadas para finalidade de pesquisa e em estudos aprovados sobre Hanseníase.

ACEITO que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre Hanseníase.

NÃO ACEITO que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre Hanseníase.

Assinatura ou impressão do participante

Data

Hora

Nome/Assinatura do pesquisador

Data

Hora

Nome/Assinatura da testemunha (apenas analfabetos)

Data

Hora

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18)
ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE

Nome do Projeto: Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase

NOME DO PACIENTE: _____ Registro.HU: _____
 N°: ____ - ____

Investigador Principal: Amelia Ribeiro de Jesus, médica, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracajú,-Brazil., Tel: (79)3218-1805.

Convite e objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo científico para determinar as razões porque pessoas desenvolvem Hanseníase. Nós perguntaremos a você sobre a sua saúde. Um médico fará exame físico em você, incluindo boca e nariz. Isto não causará dor em você. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de duas colheres de sopa) de seu braço usando uma seringa e agulha descartáveis para realizar alguns exames que ajudarão a explicar a doença. Nós também iremos fazer um teste na pele, onde nós injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço usando uma agulha fina. Nós também vamos precisar remover um pequeno pedaço da pele ou do nariz para confirmar se você tem a doença. Isso será feito por um médico no hospital, com anestesia local para evitar dor. Nós esperamos através deste estudo esclarecer mais sobre a doença, entendê-la e assim poderemos preveni-la no futuro.

Você pode não participar deste estudo. Se você quer nos ajudar, por favor, assine ou coloque sua impressão

digital abaixo.

 Assinatura ou impressão do paciente

 Data

 Hora

 Assinatura ou impressão do responsável

 Data

 Hora

 Testemunha

 Data

 Hora

 Pesquisador

 Data

 Hora

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18)

ESTUDO GENÉTICO

Nome do Projeto: Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase

NOME DO PACIENTE: _____ Registro.HU: _____ Nº: ____
 ____ - ____ - ____

Principal Investigador: Amelia Ribeiro de Jesus, médica, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracajú,-Brazil., Tel: (79)3218-1805..

Convite e objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo de pesquisa. O propósito deste estudo é determinar se você ou as pessoas que vivem na sua vizinhança tem maior propensão para ter doenças infecciosas. A doença que nós estudaremos é chamada Hanseníase, doença que provoca uma mancha na pele. Nós queremos entender se alguns dos seus genes (que são características que seus pais passam para você e seus familiares) fazem você ter mais chance de ter esta doença. Nós também queremos saber se coisas do seu dia a dia fazem de você mais propenso às infecções.

Nós perguntaremos a seus pais sobre sua saúde. Um médico fará exame físico em você, incluindo sua boca e nariz. Isto não causará dor em você. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de uma colher de sopa) de seu braço usando uma seringa e agulha. Algumas vezes nós faremos um teste na pele, onde nós injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço usando uma agulha fina. Nós esperamos que este estudo nos esclareça porque você e sua família têm Hanseníase, então poderemos prevenir isto no futuro.

Você pode não participar deste estudo. Se você quer nos ajudar, por favor, assinie ou coloque sua impressão digital abaixo.

 Assinatura ou impressão do paciente

 Data

 Hora

 Assinatura ou impressão do responsável

 Data

 Hora

 Testemunha

 Data

 Hora

 Pesquisador

 Data

 Hora