



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS GENES DE RECEPTORES
TOLL-LIKE E DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE EM
UMA POPULAÇÃO DA BAHIA AFETADA PELA
HANSENÍASE**

Nadja de Lima Santana

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI – UFBA.

Santana, Nadja de Lima

Avaliação do papel dos genes de receptores Toll-Like e do perfil de resposta imune em uma população da Bahia afetada pela Hanseníase/Nadja de Lima Santana.- Salvador, 2016.

108f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Cristina Castellucci

Tese (pós-graduação) Programa de Pós-graduação Ciências da Saúde. Faculdade de Medicina da Bahia. Universidade Federal da Bahia.

1.Hanseníase. 2.Receptores Toll-Like. 3. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. 4.Citocinas. 5. Quimiocinas. I.Castellucci, Léa Cristina. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU: 616-002.73



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS GENES DE RECEPTORES
TOLL-LIKE E DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE EM
UMA POPULAÇÃO DA BAHIA AFETADA PELA
HANSENÍASE**

Nadja de Lima Santana

Professor-orientador: Léa Cristina Castellucci

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração em Imunogenética.

Salvador (Bahia), 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

I) *Ana Carla Pereira Latini*, pesquisadora do Instituto Lauro de Souza Lima (com ênfase em genética da susceptibilidade à hanseníase). Doutorado em Biociências Aplicadas À Farmácia pela Universidade de São Paulo (2005) e Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo (2001).

II) *Silvane Maria Braga Santos*, Professor Adjunto da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pesquisadora associada do Serviço de Imunologia do Com-HUPES-UFBA. Mestre e Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia e Farmacêutica Bioquímica do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia (Com-HUPES-UFBA).

III) *Sara Timóteo Passos*, pesquisadora associada do Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, Docente Permanente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (Faculdade de Medicina/UFBA) e do Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIm/UFBA). Post-Doc na University of Pennsylvania (UPENN) em Patobiologia (2009), Doutorado em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia (2006) e Mestrado em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia (2004).

Membro Suplente:

IV) *Dra. Léa Cristina Castellucci* - Pós-doutora em Genética de Doenças Infecciosas pela Universidade de Cambridge. Pesquisador associado do Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia e Professora Permanente do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

*“A maior doença hoje não é a lepra ou a tuberculose,
é, antes, o sentimento de não ser desejado”.*

Madre Teresa de Calcutá.

*Dedico a realização desse trabalho, em primeiro lugar
a Deus por sua presença. “ Em uma das minhas
inquietações, respondeu-me, aos meus ouvidos, em uma
passagem bíblica (2Reis 5) ”.*

A Ele toda Glória!

*Aos meus pais, Amália e José Lídio, por serem
colunas fortes com suas orações e fé.*

*Aos meus irmãos e familiares com quem pude
partilhar meus momentos de orações, alegrias e
conquistas.*

*Ao meu esposo Ricardo Moreira de Carvalho, pelo
amor e carinho, além da compreensão e incentivo
durante essa fase inesquecível.*

*E às pessoas que sempre estiveram ao meu lado me
acompanhando e apoiando, fazendo parte da
minha vida e deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Dr. Paulo Machado, chefe do Serviço de Imunologia (SIM), pelo seu envolvimento em tudo que tem relação com a ciência e a saúde, e pelas preciosas sugestões dadas no desenvolvimento das minhas atividades de pesquisa.

Ao Prof. Edgar Marcelino de Carvalho, por sua paixão inspiradora que sempre mostrou nas suas atividades de pesquisador, professor e médico, pela oportunidade oferecida para a realização desse trabalho e disponibilidade em atividades desenvolvidas no seu laboratório.

A Dra. Angela Giudice, por ter aberto para mim, o portão de entrada da pesquisa científica, acreditando em meu potencial e estando sempre disponível, como profissional e amiga, para contribuir com o meu crescimento como pesquisadora.

Aos companheiros do grupo da Genética, de maneira especial a Joyce Oliveira, Jamile Leão Rêgo, Lucas Almeida e as estudantes de iniciação científica Thaís Magalhães e Thailamar Vieira pela amizade, momentos de descontração, incentivo, apoio técnico e científico durante a realização das etapas deste trabalho e oportunidades de construção do conhecimento.

A equipe do Ambulatório Magalhães Neto e Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes, em especial a **Dra. Lídia Machado, Dra. Mayume Shibuya e Sr. Salles**, pelo suporte durante a etapa de coleta, principalmente em relação à sensibilização dos pacientes.

Aos pacientes e doadores de sangue voluntários, objetivo maior de toda atividade científica, por colaborarem de forma tão generosa com o nosso estudo.

A Dra. Andrea Magalhães, por ter aderido desde o começo a minha causa acadêmica, por ter sido a bússola em uma importante etapa deste trabalho e por sua amizade ao longo desses anos de pesquisa.

Ao grupo de pesquisa do SIM – Serviço de Imunologia do HUPES, por terem proporcionado as condições técnicas necessárias e auxiliado na realização das análises laboratoriais, meus agradecimentos.

À Universidade Federal da Bahia, a todos os professores, colegas e àqueles que de maneira direta ou indiretamente contribuíram para que esse estudo fosse realizado.

FONTES DE FINANCIAMENTO

I. Esse estudo contou com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFBA (parecer 891.963; CAAE: 37246914.4.0000.5577).

II. Bolsa de Estudo da CAPES.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Léa Castellucci, por permitir a realização desse projeto, ter o dom de orientar e por ser exemplo de pesquisadora e pessoa. Deixo aqui o meu agradecimento, pela confiança, suporte, compreensão das minhas dificuldades – o que permitiu trilhar o caminho gratificante da pesquisa científica. Minha eterna gratidão e admiração.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE DE TABELAS | 13 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 14 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 15 |
| I. RESUMO | 18 |
| II. OBJETIVOS | 19 |
| II.1. Geral | 19 |
| II.2. Secundários | 19 |
| III. INTRODUÇÃO | 20 |
| IV. REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| IV.1. Aspectos epidemiológicos da hanseníase | 22 |
| IV.2. Aspectos clínicos da hanseníase | 26 |
| IV.3. Aspectos imunológicos da hanseníase | 29 |
| IV.4. Aspectos genéticos da hanseníase | 33 |
| V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| V.1. Local do estudo e recrutamento de participantes | 36 |
| V.2. Definição de casos: | 37 |
| V.2.1. Hanseníase sem reação | 37 |
| V.2.2. Reação do tipo 1 ou Reação Reversa (RR) | 37 |
| V.2.3. Reação do tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH) | 38 |
| V.3. Critérios de inclusão e exclusão | 39 |
| V.4. Coleta de sangue e trabalho laboratorial | 40 |
| V.4.1. Extração de DNA genômico | 40 |
| V.4.2. Genotipagem dos polimorfismos nos genes <i>TLR 1, 2 e 4</i> | 41 |
| V.5. Dosagem dos marcadores imunológicos por ELISA | 44 |
| V.6. Análise estatística dos resultados | 46 |
| V.7. Fluxograma ilustrativo do estudo | 47 |
| VI. RESULTADOS GERAIS | 48 |
| VI.1. Características gerais da amostra avaliada | 48 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| VI.2. Resultados do objetivo 1: associação entre o polimorfismo nos genes <i>TLR1</i> , <i>TLR2</i> e <i>TLR4</i> e a hanseníase. | 49 |
| VI.2.1- rs4833095 C/T e rs5743551 C/T no gene de <i>TLR1</i> | 49 |
| VI.2.2- rs7656411 G/T e rs3804099 C/T no gene de <i>TLR2</i> | 51 |
| VI.2.3- rs1927911 A/G e rs1927914 A/G no gene de <i>TLR4</i> | 53 |
| VI.3. Resultados do objetivo 2: dosagem de citocinas e quimiocinas em soro de pacientes com hanseníase e controles sadios. | 55 |
| VI.4. Resultados do objetivo 3: avaliação dos diferentes genótipos em genes <i>TLR</i> com a produção de citocinas e quimiocinas no soro de pacientes com e sem reações hansenícas. | 61 |
| VI.4.1- rs4833095 C/T e rs5743551 C/T no gene de <i>TLR1</i> | 61 |
| VI.4.2- rs7656411 G/T e rs3804099 C/T no gene de <i>TLR2</i> | 64 |
| VI.4.3- rs1927911 A/G e rs1927914 A/G no gene de <i>TLR4</i> | 65 |
| VII. DISCUSSÃO | 68 |
| VIII. PERSPECTIVAS DE ESTUDO | 73 |
| IX. CONCLUSÕES | 74 |
| X. SUMMARY | 75 |
| XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 76 |
| XII. ANEXOS | 90 |
| Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doadores do HEMOBA | 91 |
| Anexo 2. Modelo do questionário e carta convite - DOADORES HEMOBA | 93 |
| Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes | 94 |
| Anexo 4. Modelo da Ficha clínica e questionário – PACIENTES | 96 |
| Anexo 5. Características clínicas da amostra da sorologia | 98 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela I. Correlação entre as classificações de Madri , de Ridley & Jopling e da OMS, adotadas para a hanseníase. | 27 |
| Tabela 1. Pannel de SNPs genotipados. | 42 |
| Tabela 2. Características clínico-epidemiológicas da amostra. | 48 |
| Tabela 3. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para os polimorfismos rs4833095 e rs5743551 no gene <i>TLR1</i> . | 50 |
| Tabela 4. Comparação entre os polimorfismos no gene de <i>TLR1</i> rs4833095 C/T e rs5743551 C/T e a hanseníase: casos vs controles sadios. | 50 |
| Tabela 5. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para os polimorfismos rs3804099 e rs7656411 no gene <i>TLR2</i> . | 52 |
| Tabela 6. Comparação entre os polimorfismos no gene de <i>TLR2</i> rs3804099 C/T e rs7656411 G/T e a hanseníase: casos vs controles sadios. | 52 |
| Tabela 7. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para os polimorfismos rs1927911 e rs1927914 no gene <i>TLR4</i> . | 54 |
| Tabela 8. Comparação entre os polimorfismos no gene de <i>TLR4</i> rs1927911A/G e rs1927914A/G e a hanseníase: casos vs controles sadios. | 54 |
| Tabela 9. Valores estatísticos da comparação entre pacientes sem evidência de surto reacional e controles sadios. | 55 |
| Tabela 10. Valores de <i>p</i> referentes às diferentes comparações entre grupos de casos e controles sem a doença. | 57 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura I. Taxas de detecção de casos novos de hanseníase referentes ao ano de 2013. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). | 23 |
| Figura II. Análise do cluster da taxa de detecção geral de hanseníase no Brasil no triênio 2011-2013. Segundo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). | 24 |
| Figura III. As vias envolvendo genes consistentemente associados com a hanseníase em estudos genéticos. | 35 |
| Figura 1. Genotipagem do SNP rs1927911 do gene <i>TLR4</i> . | 43 |
| Figura 2. Produção de citocinas no soro de pacientes com hanseníase e em controles saudios. | 56 |
| Figura 3. Produção de quimiocinas no soro de pacientes com hanseníase e em controles saudios. | 56 |
| Figura 4. Diferença na produção de citocinas no soro entre diferentes grupos de pacientes: Sem Reação (SR), RR, ENH e controles sem a doença. | 59 |
| Figura 5. Diferenças na produção de quimiocinas no soro entre diferentes grupos de pacientes: Sem Reação (SR), RR, ENH e controles sem a doença. | 60 |
| Figuras 6. Diferenças na produção de citocinas e quimiocina no soro de pacientes com e sem reações hansênicas por genótipos de <i>TLR1</i> rs4833095. | 62 |
| Figuras 7. Diferenças na produção de citocina e quimiocina no soro de pacientes com e sem reações hansênicas por genótipos de <i>TLR1</i> rs5743551. | 63 |
| Figuras 8. Diferenças na produção de citocinas no soro de pacientes com e sem reações hansênicas por genótipos de <i>TLR2</i> rs3804099. | 64 |
| Figuras 9. Diferenças na produção de quimiocinas no soro de pacientes com e sem reações hansênicas por genótipos de <i>TLR2</i> rs5743551. | 65 |
| Figuras 10. Diferenças na produção de citocinas de pacientes com e sem reações hansênicas por genótipos de <i>TLR4</i> rs1927914. | 66 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| BB | <i>Borderline-Borderline</i> |
| BCG | “Bacillus Calmette-Guérin” |
| BI | “Bacteriological Index”: Índice Bacilar |
| BL | <i>Borderline</i> Lepromatosa |
| BSA | Bovine serum albumin |
| BT | <i>Borderline</i> Tuberculóide |
| DL | Desequilíbrio de ligação |
| DNA | “Deoxyribonucleic acid”: ácido desoxirribonucleico |
| CCL2 (MCP-1) | Proteína quimioatraente de monócitos-1 |
| CCL3 (MIP-1) | Proteína inflamatória de macrófagos |
| CXCL | Chemokine ligands |
| DATASUS | Departamento de Informatica do SUS |
| EDTA | “Ethylenediamine tetraacetic acid”: ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EHW | Equilíbrio de Hardy-Weinberg |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assays |
| ENH | Eritema Nodoso Hansênico |
| ESAT-6 | Early secretory antigenic 6-kDa |
| FAM | Frequência Alélica Mínima |
| GM-CSF | Fator Estimulador de colônia de Granulócitos e Macrófagos |
| G2D | Deficiência de grau 2 |
| GWAS | “Genome-wide association study”: Estudos de Associação Ampla do Genoma |
| HBV | “Hepatitis B Virus”: vírus da hepatite B |
| HCV | “Hepatitis C Virus ”: vírus da hepatite C |

| | |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| HEMOBA | Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia |
| HLA | “Human leukocyte antigen”: antígeno leucocitário humano |
| HTLV | “Human T-Lymphotropic Virus”: Vírus linfotrópico T humano |
| HIV | “Human Immunodeficiency Virus”: Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HI | Hanseníase Indeterminada |
| IC | Intervalo de confiança |
| IFN-γ | Interferon gamma |
| IL | Interleucina |
| IL-1β | Interleucina 1 beta |
| LAM | Lipoarabinomanana |
| LL | Lepromatosa |
| MB | Multibacilar |
| MHC | “Major histocompatibility complex”: Complexo principal de histocompatibilidade |
| NRAMP | “Natural resistance”: Proteína associada a resistência natural de macrófagos |
| NF-$\kappa\beta$ | “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”: fator nuclear Kappa |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPAS | Organização Pan-Americana de Saúde |
| OR | “Odds ratio”: razão de chances |
| PARK2 | Proteína parkinson 2, E3 ubiquitina proteína ligase: parkina |
| PB | Paucibacilar |
| PBS | Tampão Salina Fosfato |
| PCR | “Polymerase Chain Reaction”: Reação em Cadeia da Polimerase |
| PQT | Poliquimioterapia |

| | |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| qRT-PCR | PCR em tempo real quantitativo |
| RNA | “ribonucleic acid”: ácido ribonucleico |
| RR | Reação reversa |
| SDS | “Sodium dodecyl sulfate”: Dodecil sulfato de sódio |
| SLC11A1 | “Solute carrier family 11, member 1”: Gene que codifica a proteína conhecida como NRAMP1 |
| SNP | “ <i>Single nucleotide polymorphism</i> ”: polimorfismo de base única |
| SINAN | Sistema de Informação de Agravos de Notificação |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TCD4 | Linfócito T CD4 |
| TCD8 | Linfócito T CD8 |
| TGF-β1 | “Transforming growth factor beta 1”: Fator de Crescimento e transformação beta 1 |
| Th | “T helper”: T auxiliares. |
| TLR | “Toll- like receptors”: receptores Toll-Like |
| TNF | “Tumor necrosis factor”: Fator de necrose tumoral |
| Treg | Células T regulatórias |
| TT | Tuberculóide |
| VD | Vitamina D |
| VDR | Receptor da vitamina D |

I. RESUMO

AValiação DO PAPEL DOS GENES DE RECEPTORES TOLL-LIKE E DO PERFIL DE RESPOSTA IMUNE EM UMA POPULAÇÃO DA BAHIA AFETADA PELA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, caracterizada por uma diversidade de manifestações clínicas determinadas pela resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção pelo *Mycobacterium leprae*, que por sua vez é influenciada pela composição genética do indivíduo. Nesse contexto, a maioria dos genes e regiões genômicas associadas com a suscetibilidade ou resistência à doença estão relacionadas à produção de citocinas e outras moléculas importantes das vias imunológicas. O objetivo principal deste estudo foi avaliar o polimorfismo nos genes *TLR1*, *TLR2* e *TLR4* e o perfil sorológico de resposta imune associado a esses marcadores em uma população da Bahia afetada pela hanseníase. Para alcançar esses objetivos, utilizou-se a abordagem de genes candidatos em um modelo de caso-controle. A genotipagem dos marcadores *TLR1* (rs4833095 e rs5743551), *TLR2* (rs7656411 e rs3804099) e *TLR4* (rs1927914 e 1927911) foi realizada pelo método TaqMan® de qRT-PCR e os dados analisados por regressão logística incondicional (STATA v 9.1™). A dosagem de proteínas relacionadas à ativação de TLR foi feita pela técnica ELISA sanduíche em 52 pacientes com hanseníase divididos em grupos de 17 indivíduos sem reação hansênica; 22 indivíduos com reação tipo 1 (RR) e 13 com reação tipo 2 (ENH). Além desses foram utilizados 30 controles sem a doença. Os dados foram analisados pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis utilizando os programas InStat3 e GraphPadPrism 5. Os resultados mostram uma associação entre o alelo T no marcador rs3804099 no gene de *TLR2* e a susceptibilidade à hanseníase (OR=1,296, IC= 1,03-1,62, p= 0,022); em adição houve diferenças significantes na produção das citocinas IL-6, IL-1 β , IL-12p40 e IL-17, assim como das quimiocinas MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL-9 e IL-8 entre indivíduos com hanseníase e controles sem a doença (p \leq 0,05). Na comparação entre pacientes com e sem reações hansênicas e controles, as principais diferenças observadas foram entre indivíduos com ENH e controles, com aumento significativo de IL-12p40, IL-10, IL-6, MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL-9 e IL-8 (p \leq 0,05). Na avaliação da associação entre os diferentes genótipos dos marcadores de *TLR 1, 2 e 4* avaliados e a produção de citocinas no soro, observamos que a citocina IL-12p40 e a quimiocina MCP-1 são marcadores imunológicos regulados por polimorfismos no gene de *TLR1*. Em adição, a citocina IL-17 aparece como um marcador regulado pelo polimorfismo dos diferentes genes TLR, conforme observado em nossas análises para marcadores de *TLR1, 2 e 4*. Além desse resultado, outros marcadores relevantes tais como CXCL-10 e IL-6 parecem ser regulados por variantes de *TLR2* e, finalmente, a citocina IL-1 β aparece relacionada a *TLR4*. Juntos esses dados mostram que os marcadores de *TLR* testados podem ter um papel regulatório na resposta imune contra o *M. leprae*, direcionando de forma indireta a produção de citocinas e quimiocinas.

Palavras-chave: 1. Hanseníase; 2. Receptores Toll-Like; Polimorfismo de Nucleotídeo Único; 4. Citocinas; 5. Quimiocinas.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GERAL

Conduzir estudos de associação nos genes *TLR1*, *TLR2* e *TLR4* e de resposta imune associado a esses marcadores em uma população da Bahia afetada pela hanseníase.

II.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Determinar a possível associação dos genes de *TLR1*, *TLR2* e *TLR4* com a hanseníase em um estudo de caso-controle conduzido em uma população recrutada na cidade de Salvador-Bahia.
2. Dosar um painel de citocinas e quimiocinas no soro de pacientes com e sem reações hansênicas e controles sadios.
3. Avaliar se há influência dos diferentes genótipos em genes *TLR*, com a produção dessas citocinas e quimiocinas no soro de pacientes com e sem reações hansênicas.

III. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, e ainda considerada nos dias atuais um problema de saúde pública em vários países, com destaque para a Índia e o Brasil (Sampaio et al., 2012; De Almeida-Neto et al., 2014). Após a introdução do tratamento poliquimioterápico (PQT) na década de 1980, houve uma redução considerável no número de doentes, mas apesar dessa redução, a taxa de detecção de novos casos não declinou nos países mais endêmicos, como é o caso do Brasil. Embora a maioria da população seja naturalmente imune (Talhari, 1997), dentro do percentual de indivíduos expostos e que irão desenvolver a doença, a resposta do hospedeiro pode variar da forma indeterminada até a evolução para as formas mais brandas ou graves da doença (Mendonça et al., 2008). Acredita-se que a forma mais provável de transmissão da doença é através do contato prolongado com casos multibacilares não tratados (Araújo, 2003).

A hanseníase apresenta um amplo espectro clínico que se deve ao perfil imunológico e genético dos indivíduos afetados. A classificação mais amplamente utilizada foi proposta por Ridley & Jopling (1966), ilustrada por duas respostas polares: tuberculóide (TT) e lepromatosa (LL), e formas intermediárias ou *borderlines* (*borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB) e *borderline* lepromatosa (BL)) (Ridley & Jopling, 1966; Modlin, 2010; D. Montoya, 2010). Adicionalmente, devido à necessidade de expansão da campanha de eliminação da hanseníase foi proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1988, uma classificação operacional que reconhece como formas paucibacilar (PB) e multibacillar (MB), pacientes que apresentam de uma a cinco ou mais de cinco lesões de pele, respectivamente (WHO, 1995; Walker et al., 2006).

Muitos estudos têm documentado o papel de genes do hospedeiro na susceptibilidade ou resistência à hanseníase (Bochud et al., 2009; Shuring et al., 2009; Marques et al., 2013; Suryadevara et al., 2013; Rêgo et al., 2015). Devido ao importante papel desempenhado pela imunidade do hospedeiro no espectro clínico da doença, muitos dos genes e regiões genômicas previamente associados à hanseníase são aqueles ligados à produção de citocinas e outras moléculas importantes das vias imunológicas (Misch et al., 2010; Sardinha, 2011). A primeira linha de interação entre o *M. leprae* e humanos é

mediado pela ligação de receptores do hospedeiro que reconhecem estruturas moleculares das micobactérias (PAMPs). Os receptores Toll-like (TLR) são essenciais para a orientação da resposta imune adaptativa, através da indução de uma resposta Th1 ou Th2 (Borges et al., 2000; Goulart et al., 2000; Schnare et al., 2001). Polimorfismos em genes *TLR* foram associados à susceptibilidade ou resistência à hanseníase *per se* assim como ao desenvolvimento de reações hansênicas em populações etnicamente diversas incluindo Índia, Brasil, Bangladesh, Etiópia e Nepal (Johnson et al., 2007; Wong et al. 2010; Hart & Tapping, 2012; Marques et al., 2013).

No presente trabalho, por meio de um estudo genético e seguindo a estratégia de genes candidatos, objetivou-se identificar marcadores de susceptibilidade à hanseníase nos genes *TLR1*, *TLR2* e *TLR4* em uma população da Bahia. Adicionalmente, avaliou-se a influência de marcadores *TLR* sobre a resposta imune de pacientes com hanseníase e a controles sadios. Os resultados desse estudo reforçam o papel funcional dos genes *TLR* na hanseníase, corroborando achados de estudos anteriores e reforçando o papel dessa via como preditora do risco de desenvolvimento da hanseníase ou suas formas clínicas.

IV. REVISÃO DE LITERATURA

IV.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae* e considerada uma doença negligenciada. É endêmica em países tropicais, especialmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento e, se constitui até os dias de hoje, em um problema de saúde pública, globalmente relevante (WHO, 2011-2015).

Embora *programas de controle da hanseníase* implementados pela OMS tenham feito progressos significantes na redução da carga da doença, a detecção de casos novos estabilizou-se na faixa dos 215 000 a 245 000 entre 2009 e 2013. Estimativas populacionais de meados de 2012 e início de 2013 baseados nos dados publicados pelo *Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais/ Divisão da População das Nações Unidas* foram utilizados como denominador para o cálculo da taxa de prevalência e taxas de detecção de casos novos da hanseníase e deficiência de grau 2 (G2d) em países individuais e regiões estabelecidas pela OMS. Globalmente, foram detectados 13 289 casos novos com deformidades visíveis ou de deficiência grau 2 em 2013. Em adição, um em cada dez casos novos de hanseníase é uma criança (WHO, 2011-2015).

De acordo com relatórios oficiais recebidos de 103 países e territórios, a prevalência mundial registrada da hanseníase no final do primeiro trimestre de 2014 situou-se em 180 618 casos, enquanto o número de casos novos detectados em 2013 era 215.656. A Figura I mostra o mapa global de distribuição da hanseníase, indicando por meio de uma escala de cores as taxas de detecção, com destaque para países de alta endemicidade como Índia, Brasil, Myanmar, Nepal, Nigéria, Filipinas, Sudão do Sul, Sri Lanka, Sudão, Moçambique, Madagascar, Angola, Bangladesh, República da China, Etiópia, Indonésia, República Democrática do Congo e República Unida da Tanzânia (WHO, 2011-2015). A Índia sozinha representa 64% da prevalência e 78% de detecção de casos novos em todo o mundo (WHO, 2010). Estes países permanecem com o compromisso de eliminar a doença, intensificando suas políticas de controle da hanseníase (WHO, 2011-2015).

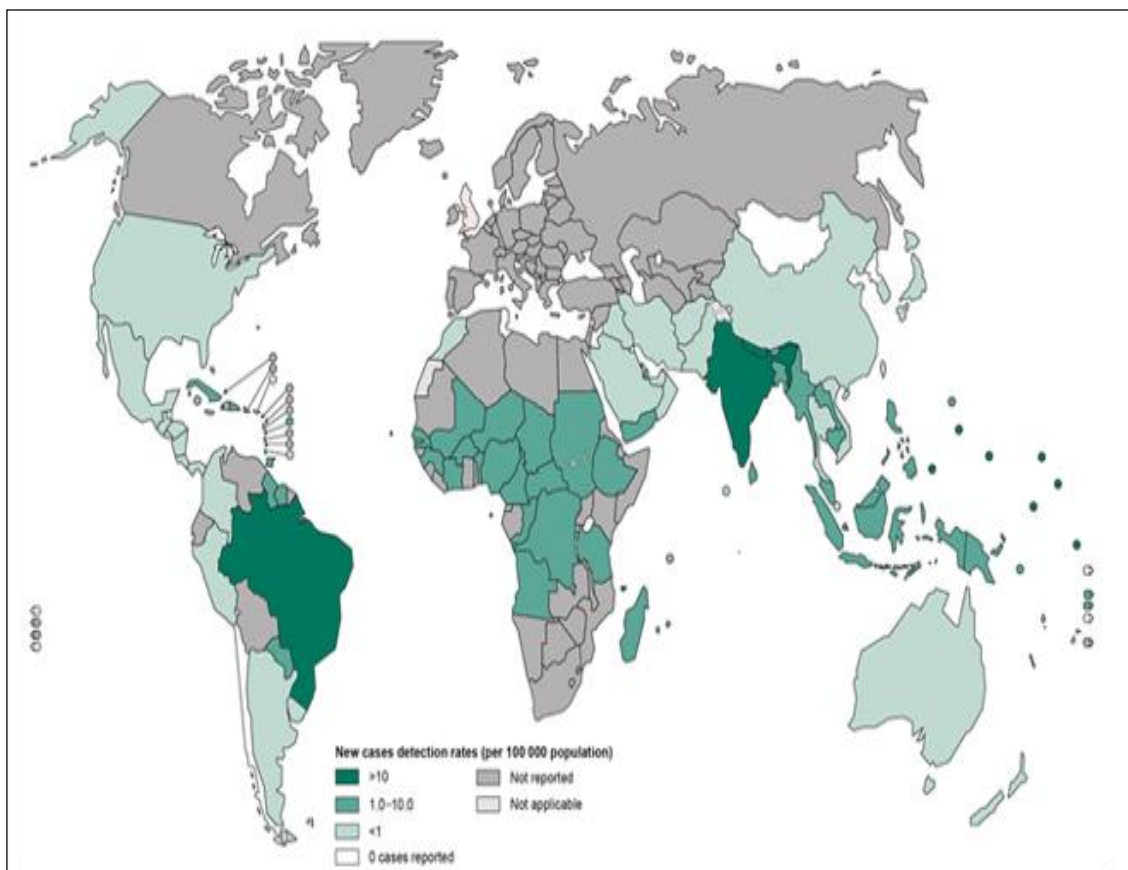


Figura I. Taxas de detecção de casos novos de hanseníase por 100 000 habitantes, 2013; segundo a Organização Mundial da Saúde, janeiro de 2014. FONTE: WHO (2011-2015).

No Brasil, outro grande país endêmico, as taxas de detecção mostraram uma tendência crescente nas duas últimas décadas, refletindo, provavelmente, melhor acesso dos doentes aos cuidados de saúde primários (Penna et al., 2008). Em 2010, o país registrou 1,56 casos para 10.000 habitantes, correspondendo a 29.761 casos em tratamento. Neste mesmo ano, o Brasil detectou 34.894 casos novos de hanseníase, correspondendo a um coeficiente de detecção geral de 18,2/100.000 habitantes. Adicionalmente, verificou-se uma redução do coeficiente de detecção na ordem de 35,1% no período de 2001 a 2010 (WHO, 2011-2015). Outro ponto que merece destaque foi que em 2003, 69,3% dos indivíduos que faziam tratamento para hanseníase, se curaram. Já em 2014, esse número saltou para 82,7%. O número de pacientes em tratamento foi de 31.064, o que significa uma prevalência de 1,27 casos por 10 mil habitantes. Em relação aos indicadores de 2014, dados preliminares apontam que a taxa de detecção geral foi de

15,32 por 100 mil habitantes, correspondendo a 25.738 casos novos da doença no país. Já na população menor de 15 anos houve registro de detecção de 4,88 casos por 100 mil habitantes (BRASIL..., 2015).

Fatores históricos, políticos e sociais contribuem para que a hanseníase seja distribuída de forma heterogênea em todo território nacional (DATASUS, 2011). De acordo com a Figura II, no período 2011-2013, verificou-se que os 10 clusters mais endêmicos, com maiores riscos relativos estavam concentrados em municípios localizados na região Central e na sua vizinhança no Norte e Nordeste, em estados como Mato Grosso, Pará, Maranhão, Tocantins, Goiás, Rondônia e Bahia (WHO, 2011-2015).

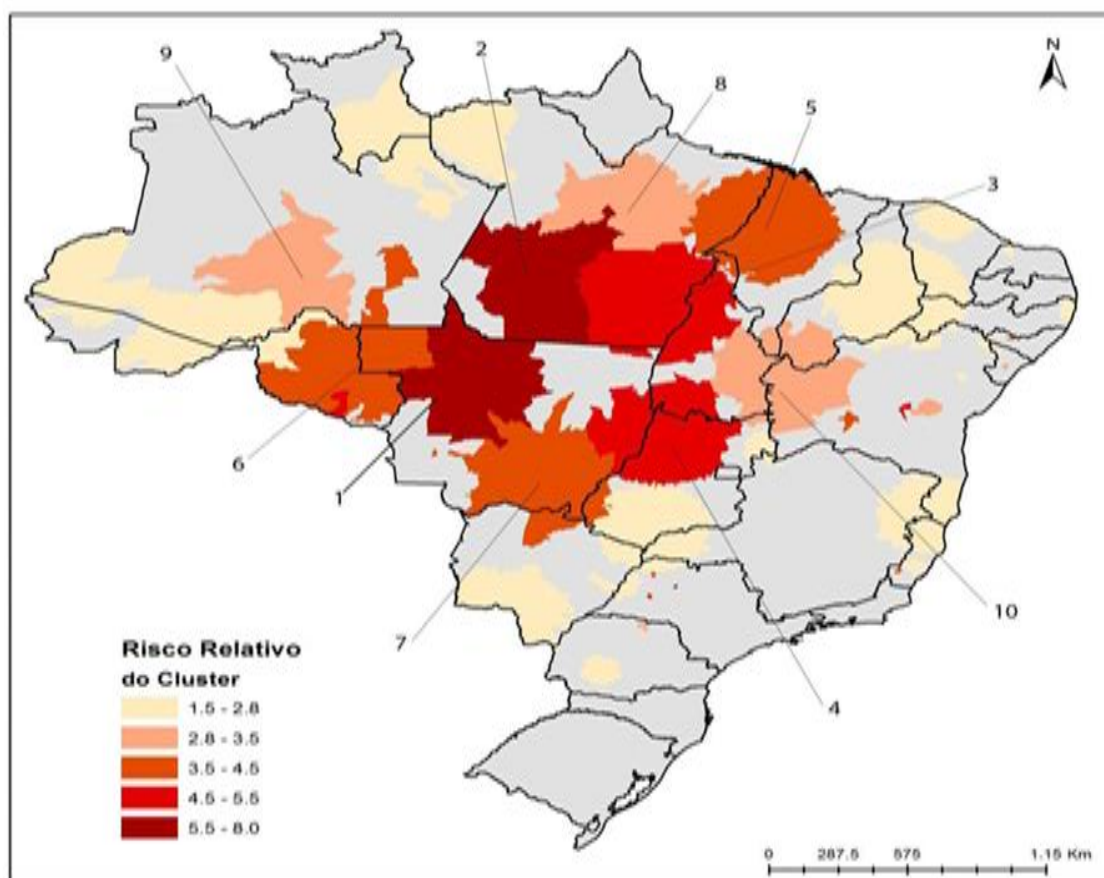


Figura II. Análise do cluster da taxa de detecção geral de hanseníase no Brasil no triênio 2011-2013. FONTE: MS/SVS/CGHDE- Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan).

Na Bahia, no período entre 2004 a 2013, constatou-se uma redução de 45,67% na detecção geral de casos e 44,87% na detecção na população de 0 a 14 anos. A taxa de

prevalência de hanseníase em 2014 foi de 1,33 casos por 10 mil habitantes. Com uma concentração maior de casos no norte, oeste e extremo sul do estado (BRASIL..., 2015).

Detecção precoce de casos de hanseníase e a implementação adequada do tratamento seguindo o protocolo terapêutico padronizado com a poliquimioterapia (PQT) são ainda os principais princípios de controle da hanseníase (WHO, 2011-2015). A OMS está desenvolvendo uma nova proposta internacional para eliminar a transmissão da hanseníase até 2020 (Talhari et al., 2012; BRASIL..., 2015).

IV.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente atóxico (Barreto et al., 2005), intracelular obrigatório, que afeta principalmente a pele, os ramos nervosos periféricos e frequentemente a mucosa do trato respiratório superior (Goulart et al., 2002; Barreto et al., 2005; Rodrigues et al., 2011). As vias aéreas superiores constituem a principal porta de entrada e via de eliminação do bacilo e, eventualmente, a transmissão pode ocorrer por pele erodida (Harboe, 1985; Talhari et al., 1997; Barreto et al., 2005). Apesar de ser uma doença altamente contagiosa, sua morbidade é baixa e uma grande parcela da população é naturalmente resistente (Trautman, 1984; Costa et al., 2008). Tal situação, no entanto, pode ser alterada em função da relação entre o *M. leprae*, o meio ambiente e o hospedeiro (Harboe, 1985). Não obstante, o fator mais importante no mecanismo de transmissão da hanseníase consiste no contato prolongado entre indivíduos que exibem alta carga bacilar (formas multibacilares) não tratados e indivíduos geneticamente susceptíveis (Lastória et al., 2014). A transmissão familiar tem sido considerada um fator crucial para a propagação desta infecção de forma que os contatos familiares dos pacientes merecem uma atenção especial (Aycock, 1948; Beiguelman, 2002).

A infecção ativa pelo *M. leprae* causa uma doença de amplo espectro caracterizada por formas clínicas e histopatológicas com características imunológicas contrastantes (Adams et al., 2012). No Brasil, as classificações mais utilizadas são as de Madri conforme convenção preconizada no Congresso Internacional em 1953, e de Ridley & Jopling em 1966. Na classificação de Madri, consideram-se dois pólos estáveis e opostos (virchowiano e tuberculóide) e dois grupos instáveis (indeterminado e dimorfo) que podem oscilar para um dos pólos na evolução natural da doença (Ridley et al., 1994; Talhari et al., 1997). A classificação proposta por Ridley & Jopling é a mais amplamente aceita e leva em consideração a imunidade dentro de um espectro de resistência do hospedeiro (Ridley et al., 1994; Ridley & Jopling, 1966; Talhari et al., 1997). De acordo com essa classificação, a patogênese complexa da hanseníase é baseada no espectro de cinco grupos que se estende desde o polo tuberculóide (TT), caracterizado por uma ou duas lesões granulomatosas, baciloscopia negativa e resposta imune celular específica ao *M. leprae*; ao polo lepromatoso (LL), caracterizado por múltiplas lesões infiltradas,

nodulares, ausência de resposta imune celular específica e alta carga bacilar. As formas *intermediárias* ou *borderline* instáveis estão entre os pólos - *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB), e *borderline* lepromatosa (BL). Dentro destes grupos, há uma diminuição gradual na resposta imune celular de BT a BL, que é inversamente correlacionada com o aumento da carga bacilar (Ridley & Jopling, 1966; Lockwood, 2006; Walker; 2006). A hanseníase na forma indeterminada representa uma fase inicial da doença, em que o grau de resposta imune celular ainda não é definido. Assim, indivíduos com a forma indeterminada podem curar-se ou desenvolver a hanseníase nas formas *borderline* do espectro (Ridley & Jopling, 1966). Adicionalmente, a OMS criou uma classificação operacional baseada na contagem do número de lesões de pele para facilitar o tratamento da doença (WHO, 1995). Os pacientes são classificados em paucibacilares (PB) se apresentam de uma a cinco lesões e índice baciloscópico negativo ou, multibacilares (MB) se apresentam mais de cinco lesões e índice baciloscópico positivo (WHO, 1982; Walker et al., 2006; Pardillo et al., 2007). Essas classificações estão esquematizadas na Tabela I.

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

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

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

FONTE: Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO, Series, Nº 675, (1982).

Clinicamente, os indivíduos com hanseníase exibem bruscas alterações inflamatórias da pele, dos nervos, ou de ambos (Sehgal,1987), com diminuição da sensibilidade nas lesões, mudando sequencialmente sensibilidade térmica, dolorosa e tátil (Ridley & Jopling, 1966) e podendo experimentar neuropatia silenciosa (Richardus et al., 2004). O dano neural, reconhecido por muitos autores como a complicação mais séria da hanseníase, é iniciado pela infecção e acompanhado por uma série de eventos imunológicos, cuja evolução e sequelas frequentemente se estendem por muitos anos após a cura do processo infeccioso, podendo levar a grave debilidade física, social e

consequências psicológicas (Pimentel et al., 2003; Scollard et al., 2006; WHO, 2012). Estudos populacionais indicam que durante o curso da hanseníase 16-56% dos pacientes desenvolvem comprometimento irreversível da função do nervo (Britton, 2004; Lockwood, 2004).

Uma fração substancial de reações hansênicas (30-40%) é diagnosticada concomitantemente ou após o tratamento da hanseníase (Scollard et al., 1994; Ranque et al., 2007). Independente de quando ocorrem, as reações hansênicas ou episódios reacionais, se caracterizam como estados inflamatórios agudos que aumentam a morbidade relacionada à hanseníase (Anderson et al., 2007), podendo ser de dois tipos: Reação tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH) (Meyerson, 1996; Walker et al., 2008). A RR se caracteriza por uma exacerbação da imunidade celular (Sehgal et al., 1988), ocorrendo mais comumente em pacientes classificados no espectro *borderline* de Ridley & Jopling (1966) e, excepcionalmente na forma LL, geralmente após o início da PQT (Ridley et al., 1994; Sharma et al., 2004; Kahawita et al., 2008). Podem ocorrer neurites, edema, eritema, mas geralmente sem sintomas sistêmicos. Por outro lado, o ENH é uma resposta inflamatória sistêmica associada a altas concentrações de TNF- α e à deposição de imunocomplexos (Scollard et al., 2006), comprometendo vários órgãos (Naafs, 1994; Goulart et al., 2002). Comum dentro de 1 ano a partir da PQT, dura alguns dias ou semanas e ocorre em pacientes das formas *BL e LL* (Pocaterra et al., 2006; Kahawita et al., 2008). Geralmente forma nódulos subcutâneos e se caracteriza por sintomas sistêmicos tais como febre, mialgia, astenia, artrite, nefrite e vasculite. Por esse aspecto, o ENH é tratado com corticosteróides ou drogas inibidoras do TNF, como a talidomida (Sarno et al., 1991; Moreira et al., 1993). O correto diagnóstico clínico e apoio laboratorial na hanseníase são cruciais no controle da cadeia de transmissão, no processo de tratamento e controle epidemiológico da doença (Scollard et al., 2006).

IV.3. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE

Os primeiros sintomas da hanseníase podem aparecer de 2 a 5 anos após a exposição ao *M. leprae* e as suas manifestações clínicas serão associados individualmente à resposta imune a esta infecção (Talhari et al., 1997). No entanto, apenas em uma minoria de indivíduos infectados ocorre a propagação do bacilo para nervos periféricos e pele onde é fagocitado por células de Schwann e macrófagos, evoluindo para um amplo espectro patológico que é determinado por múltiplos elementos da resposta imune celular e humoral (Goulart et al., 2002; Scollard et al., 2006).

Estudos dos mecanismos e modulação da imunidade inata suportam a ideia de que, após a forma indeterminada de hanseníase, devem ocorrer eventos imunorregulatórios, os quais determinam o espectro da doença (Franceschi, 2009). De um lado, a resposta celular apresenta um papel protetor enquanto a resposta humoral parece permitir a proliferação bacteriana, sendo um fator de susceptibilidade bem estabelecido (Britton, 2004; Lockwood, 2004). Nesse contexto a produção de citocinas em linfócitos e monócitos ativados, bem como a produção diferenciada de quimiocinas no foco da lesão, parece contribuir para o direcionamento da resposta imune e estabelecimento dos diferentes aspectos clínicos da doença (Mendonça et al., 2008). Estudos têm demonstrado que a produção de TNF por monócitos e IFN- γ pelos linfócitos favorece as interações celulares no tecido lesado, bem como a ativação e regulação das quimiocinas produzidas pelas células epiteliais, mastócitos, monócitos e neutrófilos, tais como as quimiocinas CC, (CCL2, CCL3 e CCL4) e as quimiocinas CXC (CXCL8, CXCL9 e CXCL10) (Charo & Ransohoff, 2006; Allen et al., 2007).

Um mecanismo importante para a ativação do sistema imune inato é a sinalização via *receptores Toll-like* (TLRs) (Akira & Takeda, 2004; Misch et al., 2010), que iniciam uma resposta inflamatória levando à morte celular e contenção de organismos invasores (Iwasaki & Medzhitov, 2004) e ativando vias que alteram a expressão de várias quimiocinas e citocinas (Misch et al., 2010). Os *receptores Toll-like* (TLRs) são essenciais para o reconhecimento pelos macrófagos e pelas células dendríticas de vários padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Dez TLRs já foram identificados, dos quais os heterodímeros TLR1, 2 e 6, e os homodímeros TLR1, TLR2 e TLR4 parecem

ser importantes para o reconhecimento de micobactérias (Brightbill et al., 1999; Oliveira et al., 2003; Krutzik et al., 2003; Krutzik et al., 2005).

Os TLRs, especialmente o TLR2, são ativados por lipoproteínas do *M. leprae*, estando envolvidos com a produção de IL-12/23 e a diferenciação de macrófagos e células dendríticas (Verreck et al., 2004; Krutzik et al., 2005). Estas células apresentam antígenos e ativam as células T virgens através da secreção de IL-12 (Demangel & Britton, 2000). Esse processo leva à expansão e diferenciação de células Th1 produtoras de interferon (IFN- γ), que induz os elementos da resposta imune responsáveis pela eliminação do bacilo, controlando assim a evolução da doença (Mendonça et al., 2008). Evidências de vários estudos em indivíduos com hanseníase indicam que o receptor TLR2 controla a produção de citocinas, a sinalização celular e outros aspectos que conferem resistência ao *M. leprae* (Kang et al., 2002; Kang et al., 2004; Bochud et al., 2003; Krutzik et al., 2003). A ativação do TLR2 por antígenos de *M. leprae* resulta na morte de células de Schwann, fornecendo uma possível explicação para a lesão do nervo nesta reação (Oliveira et al., 2003).

Em material de biópsia de indivíduos com hanseníase, foi encontrado um aumento da expressão dos receptores TLR1 e TLR2 em monócitos e células dendríticas nas lesões tuberculóides, em comparação com as lesões virchowianas ou lepromatosas (Krutzik et al., 2003). Consequentemente, estudo mostrou uma associação de polimorfismos em *TLR2* com a forma clínica LL (Scollard & Williams, 2008). Adicionalmente, após a estimulação das células de indivíduos carreadores do referido polimorfismo com antígenos do *M. leprae*, foi encontrada uma falha da ativação do fator de transcrição NF- κ B, relevante para a produção de citocinas inflamatórias, determinando diminuição da produção de IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF, e aumento da produção de IL-10 em comparação com células sem a mutação (Kang et al., 2002; Kang et al., 2004). Uma resposta imune inata eficaz em combinação com a baixa virulência do bacilo da hanseníase corrobora para a resistência ao desenvolvimento de doença clínica (Scollard et al., 2006).

Após sua entrada no macrófago, o *M. leprae* induz a produção de TNF, IL-12, IL-10 e TGF- β 1. A IL-10 e TGF- β 1, desativam os próprios macrófagos, aumentam a proliferação bacilar e contrapõem os efeitos do TNF, IFN- γ e IL-12 com predomínio de resposta Th2 na forma LL (Goulart, 1996). Estudos imunohistoquímicos revelam que nos granulomas LL, as células TCD8⁺ estão misturadas com macrófagos e células TCD4⁺ e

podem atuar suprimindo a resposta imune mediada por células (Sieling et al., 1993) com o predomínio de resposta Th2 e de citocinas do tipo 2, como IL-4, IL-5 e IL-10. Nos indivíduos *borderlines* (BT, BB e BL), a progressiva redução da resposta imune celular é acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosas, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos (Ottenhoff, 1994). A imunidade humoral está presente nas formas LL e BL, com altos títulos de anticorpos específicos contra o glicolípido-fenólico 1 (PGL-1), antígeno específico do *M. leprae*, sem, contudo, conferir proteção significativa, pois os indivíduos seguem com disseminação bacilar (Goulart et al., 2002). Na extremidade oposta do espectro da doença, a forma tuberculóide (TT), há predomínio de resposta Th1 e produção de citocinas tais como IL-2, IFN- γ , TNF, IL-1 β entre outras (Kindler et al., 1989; Silva et al., 1989). Macrófagos sob a influência dessas citocinas, juntamente com os linfócitos, formam o granuloma nas lesões (Roach et al., 2002), ricos em células T CD4⁺ por dentro e em células T CD8⁺ na área externa que o envolve, resultando em intensa atividade fagocítica (Mendonça et al., 2008). Estudos mostram que ambas as respostas (Th1 e Th2) podem agir sinergicamente impedindo a proliferação bacilar, mas também podem se tornar lesivas ao organismo, causando lesões cutâneas e neurais, na ausência de fatores regulatórios (Foss et al., 1997; Sampaio et al., 1998; Foss, 1999; Cunha, 2001).

Sobre o espectro imunológico da hanseníase, impõem-se ainda as reações imunológicas que impactam significativamente no curso da doença e na incapacidade associada. Evidências indicam que a RR é resultante de um aumento abrupto da resposta imune celular contra antígenos do *M. leprae* (Sehgal et al., 1988), envolvendo participação ativa de linfócitos T com produção tecidual de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1. A histopatologia demonstra expansão do granuloma com presença de edema e um influxo de células TCD4⁺. O número de receptores para IL-2 (IL-2R) bem como a expressão de HLA-DR em células do infiltrado e em queratinócitos na epiderme estão aumentados, um sinal evidente da produção de IFN- γ (Narayanan et al., 1984; Modlin et al., 1988; Yamamura et al., 1992).

A imunopatogênese do ENH é bastante complexa, sistêmica (Sreenivasan et al., 1998), caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias tais como IFN- γ , IL-1 β , TNF, IL-6, IL-12 em indivíduos que exibem inicialmente uma resposta imune predominantemente humoral (Kahawita, 2008; Lockwood, 2008). Pode haver

leucocitose, estimulação policlonal de anticorpos, queda do produto C3d do sistema complemento e presença de imunocomplexos nos tecidos lepromatosos, caracterizando uma síndrome de imunocomplexos (Naafs, 1994). A análise histológica de biópsias de lesões agudas mostrou predomínio de neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. Em lesões crônicas, há uma redução dos neutrófilos e um aumento do número de linfócitos e plasmócitos (Mabalay et al., 1965). Pode acontecer de os mesmos indivíduos apresentarem os dois tipos de reações hansênicas (Moraes et al., 2001; WHO, 2012).

O papel exercido por células Th17 entre a proteção e patologia é uma questão importante na definição de seu papel no controle de doenças infecciosas. Dados mostram a importância da participação de linfócitos Th17 na formação de granuloma em infecções causadas por micobactérias (Okamoto et al., 2010). Em contactantes de pacientes com hanseníase, um maior número de células Th17 sugere um envolvimento destas células na resposta imune que confere proteção contra a doença (De Almeida-Neto et al., 2014). Attia et al. (2014) mostraram que altos níveis de IL-10 no soro de pacientes com hanseníase foi associado com baixos níveis séricos de IL-17 e sugeriram que deficiência de produção de IL-17 poderia contribuir para a progressão em direção ao pólo MB. Este fato sugere que tanto a IL-17 (maior subproduto da resposta Th17), bem como a população Th17 de modo geral estão envolvidos em processos imunológicos que dirigem o indivíduo para a cura da infecção (De Almeida-Neto et al., 2014). Em adição, De Almeida-Neto et al. (2014), sugeriram a participação ativa de células Th17 e da IL-17 na imunologia da doença de Hansen participando de processos imunológicos relacionados com estados de resistência à doença em contatos domésticos. A IL-17 aumenta a expressão de ICAM-1 em fibroblastos, epitélios, endotélios e estimula a secreção de IL-6, IL-8, GM-CSF e PGE por estas células (Fossiez, 1996).

IV.4. ASPECTOS GENÉTICOS DA HANSENÍASE

A hanseníase é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro e fatores ambientais, como o estado nutricional, vacinação com BCG e taxa de exposição ao *M. leprae* ou outras micobactérias (Moraes et al., 2006; Sauer et al., 2015). Hoje é amplamente aceita a noção de que genes modificam a susceptibilidade à doença em pelo menos três momentos distintos: (i) no controle da infecção *per se*, isto é, a doença independentemente de sua forma de manifestação clínica; (ii) uma vez o indivíduo infectado, na definição das diferentes formas clínicas da doença e (iii) o risco de desenvolver reações hansênicas (Prevedello & Mira, 2007). A baixa variabilidade genética do *Mycobacterium leprae* (Monot et al., 2005; Monot et al., 2009) fortalece a influência de fatores genéticos do hospedeiro sobre o risco de desenvolvimento da doença em indivíduos infectados (Marques et al., 2013).

A maioria dos estudos genéticos abordando questões da susceptibilidade à hanseníase ou vias imunológicas envolvidas na patogênese da infecção foram realizados em populações humanas (Adams et al., 2012). O *PARK2*, um gene envolvido em processos imunológicos como ativação macrofágica e apoptose, foi associado independentemente com susceptibilidade à hanseníase em duas populações etnicamente distintas: brasileiros e vietnamitas (Mira et al., 2004); *ERBB2*, um gene relacionado ao favorecimento da infectividade de células de Schwann pelo *M. leprae* foi associado à doença no Pará (Araújo et al., 2014). No entanto, essa associação não se confirmou em outras populações brasileiras (Rêgo et al., 2015). Genes de citocinas como *TNF*, *IL10* e *IFN* também foram associadas com a hanseníase em diferentes populações (Santos et al., 2002; Cardoso et al., 2011). Particularmente, foi demonstrado que o polimorfismo da região promotora do *TNF* (-308G/A) regula a produção de TNF durante os episódios reacionais e que a frequência de neurites é muito maior nos pacientes heterozigotos (carreadores do alelo A) para este marcador (Sarno et al., 2000). Estudos sugerem que o gene *SLC11A1* (*NRAMP1*) pode estar associado com diferentes tipos de hanseníase em algumas populações, possivelmente através da sua influência sobre a expressão de moléculas de classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), da regulação da expressão de TNF e indução da óxido nítrico sintase (Blackwell et al., 2000). Alguns estudos de associação apontam para um possível papel de HLA-DR2 e -DR3 com

hanseníase tuberculóide (paucibacilar) (Scollard et al., 2006). Uma varredura de ligação genômica de 244 famílias no sul da Índia revelou ligação significativa de uma série de marcadores microssatélites na região do cromossomo 10p13 com suscetibilidade à hanseníase (Siddiqui et al., 2001). Adicionalmente, alelos do gene do receptor de *vitamina D* (*VDR*) foram associados com hanseníase tuberculóide e virchowiana na Índia (Roy et al., 1999).

Polimorfismos em alelos *TLR* têm sido associados à suscetibilidade ou resistência a uma vasta gama de infecções microbianas (Diego et al., 2007) e loci polimórficos específicos em *TLR1*, *TLR2* e *TLR4* foram associados com a resposta do hospedeiro à hanseníase em humanos (Misch et al., 2010). Evidências de polimorfismos no gene *TLR1* (*1805GG* e *743GG*) têm sido associados com modificações na sinalização do NF- κ B e várias respostas imunológicas ao *M. leprae*, promovendo a susceptibilidade a hanseníase e o aparecimento de episódios reacionais, especialmente, reação tipo 1 (Johnson et al., 2007; Schuring et al., 2009). Estudos genéticos e imunológicos documentaram que o alelo 602S (polimorfismo I602S ou T1805G) leva a uma menor expressão de *TLR1* na superfície celular, causando sinalização deficiente. Adicionalmente, Misch et al. (2008) mostraram que esse alelo está associado à redução da produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF em células do sangue periférico estimuladas com *M. leprae* (Misch et al., 2008). Em adição, em um estudo foi observado que a variante genética em *TLR1* (I602S) sugeriria como um gene determinante de susceptibilidade à hanseníase (Wong et al., 2010). Ainda sobre *TLR1*, Marques et al. (2013) documentaram uma importante associação entre aumento do risco para hanseníase em carreadores do alelo S do polimorfismo N248S (rs4833095) consistente com um papel funcional regulador da resposta imune para esse marcador, em diferentes populações brasileiras avaliadas no estudo. Esses dados corroboram com dados anteriores mostrando o papel de susceptibilidade deste marcador em uma população de Bangladesh (Schuring et al., 2009).

Dados de estudos em populações afetadas pela hanseníase indicam que o gene *TLR2* controla a produção de citocinas, a sinalização celular e outros aspectos que conferem resistência ao *M. leprae* (Krutzik et al., 2003; Bochud et al., 2003; Kang et al., 2004). O SNP na posição *C597T* foi associado à reação reversa na hanseníase (Bochud et al., 2008) e outro marcador, na posição *C2029T*, foi associado à reduzida capacidade de *TLR2* em mediar uma resposta ao estímulo com *M. leprae* (Bochud et al., 2003). Bochud

et al. (2009) sugerem o papel de dois SNPs em *TLR4*, 896 G/A (D299G) e 1196 C/T (T399I), que foram associados com proteção contra a hanseníase em pacientes na Etiópia (Bochud et al., 2009). A Figura III traz a evolução da interação do *M. leprae* com o hospedeiro humano.

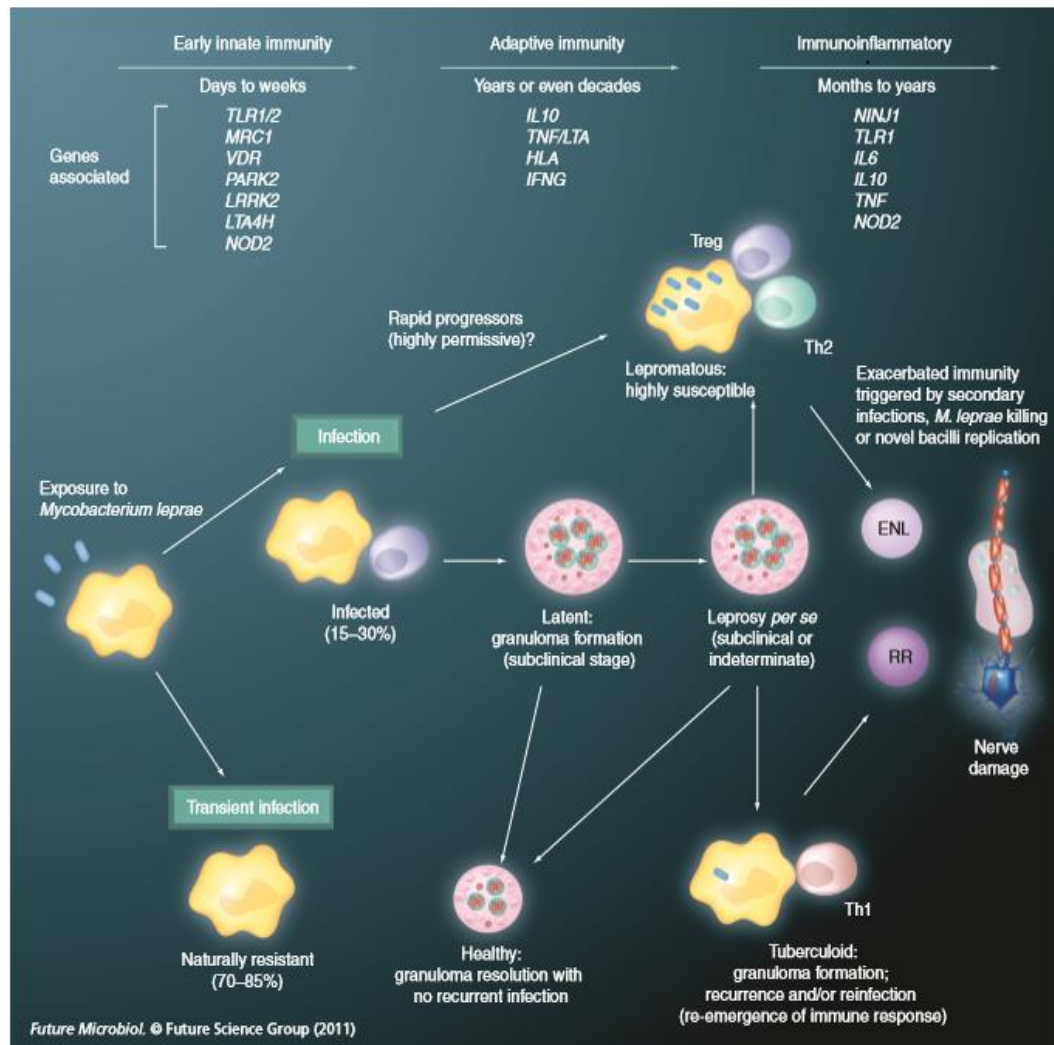


Figura III. As vias mais proeminentes envolvendo genes consistentemente associados com a hanseníase em estudos genéticos. FONTE: Cardoso et al. (2011).

Juntos, estes dados fornecem evidências de associação genética de que a expressão e ativação dos TLRs no local da doença contribuem para a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos assim como o *M. leprae* (Modlin, 2010; Taylor et al., 2012) e reforçam o papel regulatório de variantes polimórficas dos genes de *TLR* após o estímulo com patógenos (Cardoso et al., 2011; Taylor et al., 2012).

V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

V.1. LOCAL DO ESTUDO E RECRUTAMENTO DE PARTICIPANTES

Este estudo foi desenvolvido no Serviço de Imunologia, localizado no Hospital Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os pacientes que formaram o grupo de casos que envolveu 362 amostras foram selecionados nas unidades de referência do Estado para acompanhamento e tratamento aos portadores de hanseníase: Ambulatório de Hanseníase do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (Ambulatório Magalhães Neto) e Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes, hoje incorporado ao Hospital Couto Maia, ambos na cidade de Salvador. As informações relativas a autorização e às formas clínicas dos pacientes, assim suas características demográficas foram registradas em questionários (EM ANEXO).

Os participantes do grupo controle para o estudo em hanseníase foi formado por 368 indivíduos sadios, doadores voluntários de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (EM ANEXO). Todos os selecionados foram submetidos a questionário epidemiológico para avaliar fatores de exposição e história atual e pregressa da doença ou qualquer outra infecção (EM ANEXO). Esse estudo contou com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFBA (parecer 891.963; CAAE: 37246914.4.0000.5577).

V.2. DEFINIÇÃO DE CASOS:

V.2.1. HANSENÍASE SEM REAÇÃO (SR)

São aqueles diagnosticados com a hanseníase nas diferentes formas clínicas, sem evidência do desenvolvimento de surto reacional. Os pacientes foram classificados de acordo com critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde, nas formas clínicas: indeterminada, tuberculóide (TT), *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB), *borderline* lepromatosa (BL) e lepromatosa (LL) (Ridley & Jopling, 1966). Os diagnósticos clínico e laboratorial, bem como a classificação dos tipos clínicos da hanseníase da população, foram feitos por médicos especialistas do Serviço do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes. Foram considerados pacientes com a hanseníase sem surto reacional (SR), aqueles que ao final do tratamento e após retorno para revisão, não apresentavam nenhum tipo de reação hansênica, cujo a definição descrita abaixo.

V.2.2. REAÇÃO DO TIPO 1 OU REAÇÃO REVERSA (RR)

Foram considerados pacientes com a reação tipo 1 ou Reação Reversa (RR) aqueles que foram diagnosticados para esta reação durante o tratamento ou após seu retorno para acompanhamento. Foram definidas como reação tipo 1 na avaliação médica pacientes que apresentavam características específicas como: inflamação aguda nas lesões pré-existentes, exacerbação das manchas com edema, eritema, descamação, aumento em número e em tamanho; assim como febre, astenia e neurite (Saunderson et al., 2000; Kamath et al., 2014).

V.2.3. REAÇÃO DO TIPO 2 OU ERITEMA NODOSO HANSÊNICO (ENH)

Foram considerados pacientes com a reação tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH) aqueles que foram diagnosticados para esta reação durante o tratamento ou após seu retorno para acompanhamento apresentando sintomas característicos como aparecimento brusco de nódulos subcutâneos eritematosos dolorosos, que podem evoluir para vesículas, pústulas, bolhas ou úlceras. As manifestações clínicas vão desde: febre, astenia, mialgias, náuseas, dor articular, artrite, nefrite, vasculite, edema de extremidades, irite, epistaxes, orquite e linfadenite (Sharma et al., 2004; Chakma et al., 2012; Kamath et al., 2014).

V.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo pacientes com hanseníase de ambos os sexos e com idade variando entre 18 e 65 anos. O grupo de controles sadios foi constituído por doadores de sangue que não apresentavam infecção pelo bacilo *M. leprae* nem qualquer outra doença infecciosa e possuíam resultados negativos para sorologia de: HIV, HTLV-1 e 2, HCV e HBV, além de não serem contactantes de pacientes.

V.4. COLETA DE SANGUE E TRABALHO LABORATORIAL

V.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Foram coletados de cada indivíduo, em tubo contendo ACD Solução A (Ácido Cítrico Citrato e Dextrose), 8.5mL de sangue periférico para obtenção de DNA genômico (BD Vacutainer®). O DNA genômico foi isolado pelo método de “salting-out” modificado como descrito a seguir: (a) após centrifugação para a remoção do plasma e posterior divisão do volume de sangue restante do tubo BD Vacutainer® em dois tubos de polipropileno de 15 mL, foram adicionados 12 mL de solução de lise de eritrócitos (Sacarose 1,6 M; Triton X-100 5%; MgCl₂ 1 M; Tris-HCl pH 7,5 1M) e, após centrifugação (8.000 x g durante 10 minutos) e remoção do sobrenadante, o mesmo procedimento foi repetido com os dois sedimentos resultantes. Após a lise com tampão de eritrócitos, foi realizada uma lavagem adicionando-se 5 mL de dH₂O sobre o sedimento de leucócitos (após juntá-los em um só tubo) com centrifugação posterior 8000 x g durante 5 minutos para a remoção do sobrenadante; (b) a partir desta etapa, os leucócitos foram lisados pela adição de 160 µL de tampão proteinase K 5x (NaCl 5 M; EDTA pH 8,0 0,5 M), 40 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Invitrogen™, Life Technologies), 40 µL de SDS 20% e 300 µL de dH₂O, sendo os tubos então incubados durante a noite a 37°C em banho-maria; (c) em seguida, os tubos foram retirados do banho-maria e deixados à temperatura ambiente até o resfriamento, quando foram adicionados 200 µL de NaCl 6 M para a precipitação de proteínas, com posterior centrifugação (13.000 x g durante 20 minutos); e recuperação do sobrenadante para um outro tubo de 1,5 mL; (d) após mais duas novas centrifugações adicionais (13.000 x g durante 10 e 5 minutos, respectivamente) para a remoção de proteínas residuais, o sobrenadante foi dividido em dois tubos de 1,5 mL, adicionando-se a cada um 900 µL de etanol 99,5% (PA) para a precipitação de DNA. Após esta etapa, o DNA precipitado foi lavado mais uma vez com etanol a 70%; (e) depois que este etanol foi removido e, com as paredes do tubo secas, foi adicionado ao tubo contendo DNA, 200 µL de dH₂O. As amostras de DNA foram estocadas a -20°C. A concentração e pureza das amostras de DNA foi determinada pela leitura da densidade óptica em espectrofotômetro [260 nm] e a pureza pela relação DO

[280/260 nm]. Após essa etapa, em placas estoque de 96 poços-fundos (Deep Well Plate) foram aliquotadas as amostras e, então, estocadas a -20°C.

V.4.2. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *TLR 1, 2 E 4*

Os marcadores dos genes candidatos foram escolhidos com base em estudos anteriores da literatura, disponibilidade de ensaios pré-desenhados de PCR qualitativo validados (*TLR1* rs4833095- TGTTTCAATGTTGTTTAAGGTAAGA[C/T]TTGATAA CTTTGGATTTGTTTGAAG; *TLR1* rs5743551-AGTGGGCAGGGCAGTAAGGGAA GCT[C/T]CTCAGCACTCTGAATTCCTGTTTTT; *TLR2* rs3804099 - CAAAAAGTT TGAAGTCAATTCAGAA[C/T]GTAAGTCATCTGATCCTTCATATGA; *TLR2* rs7656411- TTTTAAAGCAAATATATACCTAGAG[G/T]TTCCTCATAATGACTCA AAAATAGT; *TLR4* rs1927911- TTTGCTCAAGGGTCAATGAGCCAAG[A/G]AAA AGAATGCAGTTGTCAAATCTG e *TLR4* rs1927914 - AGTAGAACTATCTAGGA CTTAGCAT[A/G]CATAATATTCCTGTTTTAAATCAGG) e frequência alélica mínima (FAM) ≥ 0.10 para as populações caucasianos (CEU) e Yorubá africana (YRI) retiradas do Projeto HapMap, uma base de dados de domínio público (www.hapmap.org). Essas duas populações de referência foram selecionadas para simular ao máximo a mistura étnica da população da Bahia. A genotipagem dos marcadores (SNPS) foi feita pelo método de TaqMan® (Life Technologis) para polimorfismos nos genes de *TLR 1, 2 e 4* (Tabela 1). Os experimentos de qRT-PCR foram realizados de acordo com orientação do fabricante e utilizando-se o aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®). A separação dos grupos genotípicos foi feita através da discriminação alélica pelos diferentes fluoróforos (Figura 1).

Tabela 1. Painel de informações sobre os genes e SNPs genotipados na população da Bahia

| GENE/ SNP | Cromossomo | Tipo de marcador | Alelos | MFA* (Salvador) |
|--------------------|-------------------|------------------------------------|---------------|----------------------------|
| <i>TLR1</i> | | | | |
| rs4833095 | 4 | Codificante - não sinônimo (N248S) | C/T | T- 0,40 |
| rs5743551 | 4 | Íntron | C/T | T- 0,39 |
| <i>TLR2</i> | | | | |
| rs3804099 | 4 | Codificante - sinônimo | C/T | T- 0,39 |
| rs7656411 | 4 | Íntron | G/T | G- 0,45 |
| <i>TLR4</i> | | | | |
| rs1927914 | 9 | Intergênico - Exon | A/G | A- 0,48 |
| rs1927911 | 9 | Íntron | A/G | A- 0,41 |

Tabela 1. Informações sobre os marcadores testados, tais como: identificação (rs), formas alélicas e menor frequência alélica (*MFA) em duas populações etnicamente distintas do projeto HapMap e na população de Salvador.

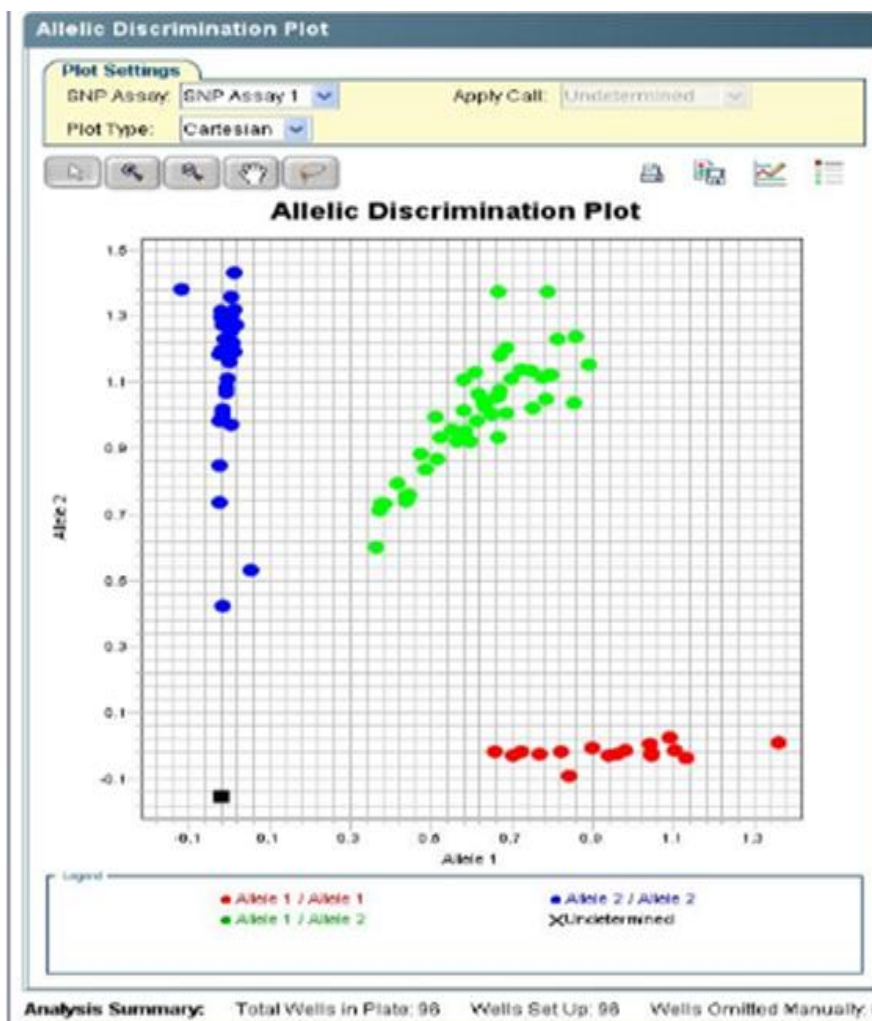


Figura 1. Ilustração gráfica do resultado da genotipagem por qRT-PCR para o SNP rs1927911 do gene *TLR4*. Aumento substancial somente da fluorescência do corante VIC expressa indivíduos homocigotos para o Alelo 1 (A); a fluorescência do corante FAM significa homocigotos para o Alelo 2 (G); e ambos corantes (VIC e FAM) expressa heterocigotos para os alelos 1 e 2 (A/G).
 FONTE: Dados da pesquisa.

V.5. DOSAGEM DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS POR ELISA

Dosagens de citocinas e quimiocinas foram realizadas no soro de indivíduos com hanseníase e indivíduos sem a doença pela técnica imunoenzimática ELISA sanduíche, por meio de Kits comercialmente disponíveis R&D Systems (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA); BD Biosciences OptEIA™ Set e Human Ultrasensitive ELISA (NOVEX®, Termo Fisher, Inc). Para esta análise obteve-se em tubo BD Vacutainer® contendo gel Separador, 8mL de sangue periférico que foi centrifugado por dez minutos a 20.000 g para a obtenção do soro e congelamento a -20°C até o uso. Foram coletados os soros de cinquenta e dois pacientes com hanseníase, sendo os mesmos estratificados a partir de informações do banco de dados da coorte, em três grupos: 17 pacientes sem evidência de reação (chamados daqui em diante de grupo Sem Reação – SR); 22 pacientes com reação tipo 1 ou RR e 13 pacientes com reação tipo 2 ou ENH (EM ANEXO); e 30 indivíduos sem a doença, doadores voluntários de sangue, como controles. Esses pacientes estavam livres do uso de imunossupressores como *PREDNISONA* e *TALIDOMIDA* à época da coleta. Os níveis de IL-1 β , IL-6, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β e IFN- γ foram dosados por meio de Kits da R&D Systems (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA) utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante, como descrito a seguir: As placas foram sensibilizadas com anticorpo específico e incubadas overnight à temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram bloqueadas com reagente diluente (1% BSA em PBS 1x pH 7,0) à temperatura ambiente por 1 hora. Após o bloqueio, os soros (100 μ L/poço) foram adicionados às placas e incubados à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se streptavidina por 20 minutos à temperatura ambiente. Entre cada etapa foram realizadas três lavagens com 300 μ L /poço com tampão (Tween®20 com PBS 1x pH 7,0). A reação foi revelada com uma solução de substrato enzimático (TMB) e interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura da densidade óptica foi feita usando o leitor de placas modelo Emax (Molecular Devices) em espectrômetro com 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL por interpolação das densidades ópticas obtidas em curva-padrão.

Adicionalmente, para avaliar a dosagem de IL-10, IL-12, IL-17, MCP-1, CXCL-9 e CXCL-10 foram utilizados Kits da BD Biosciences (BD OptEIA™ Set human), utilizando o protocolo recomendado, descrito a seguir: As placas foram sensibilizadas

com anticorpo específico e incubadas overnight a 4°C. Após a incubação, as placas foram bloqueadas com reagente diluente (10% de soro fetal bovino com PBS 1x pH 7,0) à temperatura ambiente por 1 hora. Após o bloqueio, os soros (100µL/poço) foram adicionados às placas e incubados à temperatura ambiente por 2 horas. Após essa etapa, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção mais streptavidina diluídos em reagente diluente (1 % BSA em PBS 1x pH7,0) à temperatura ambiente por 20 minutos. Entre cada etapa foram realizadas cinco lavagens com tampão (Tween®20 em PBS1x pH 7,0). A reação foi revelada com uma solução de substrato enzimático (TMB) e interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura da densidade óptica foi feita usando o leitor de placas modelo Emax (Molecular Devices) em espectrômetro com 450 nm. Uma curva-padrão foi utilizada para expressar os resultados em pg/mL.

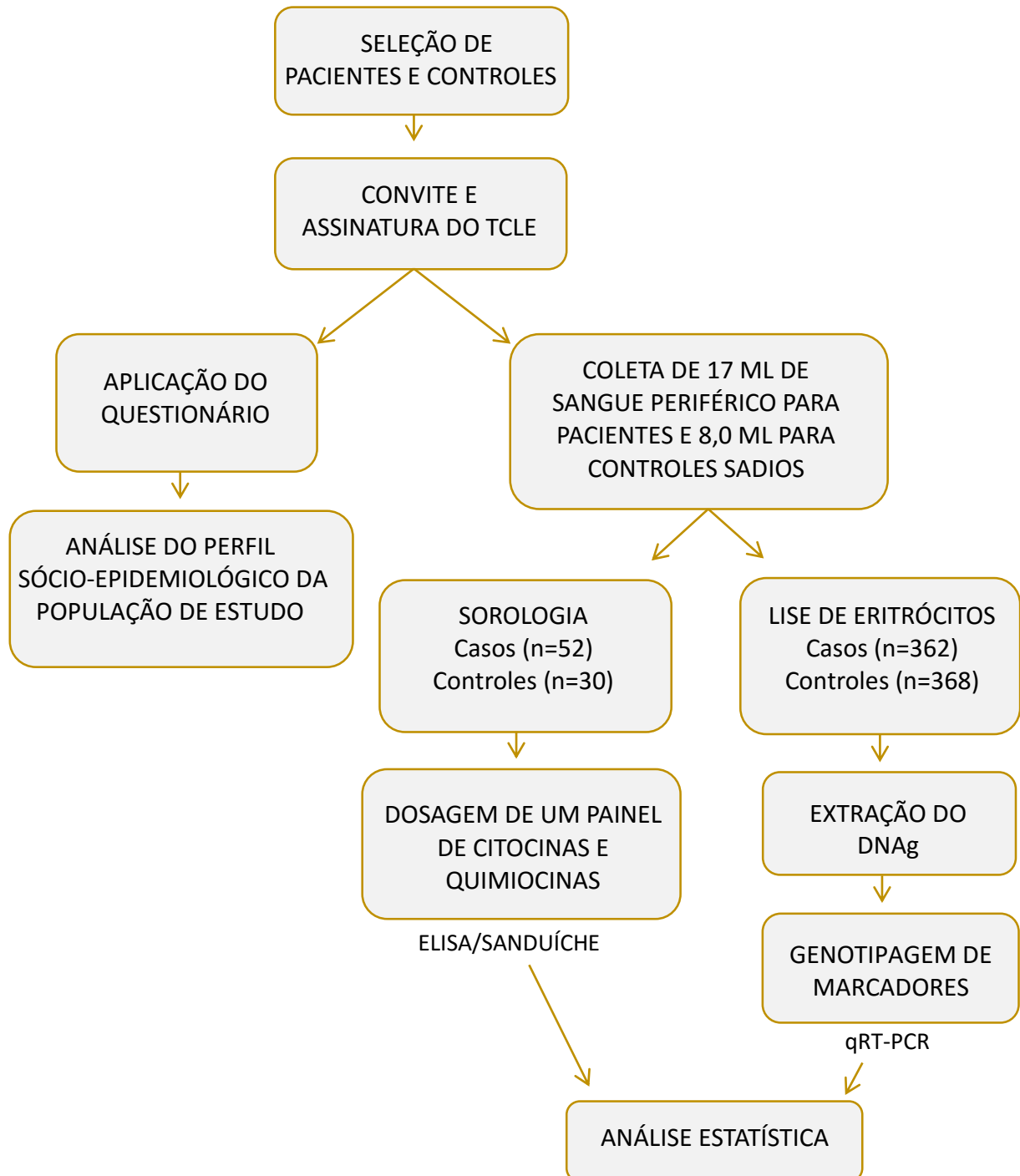
A produção da citocina TNF por sua vez foi avaliada utilizando-se o kit de alta sensibilidade TNF-A Human Ultrasensitive ELISA (NOVEX®, Termo Fisher, Inc). Em resumo, a uma placa de 96 poços pré-sensibilizada foi adicionado 50µL de tampão de incubação, 50µL de soro e 50µL de anticorpo conjugado à biotina; Após incubação por duas horas a 37°C seguida de lavagens com tampão específico do kit, adicionamos 100 µL de streptavidina com nova incubação por trinta minutos à temperatura ambiente; Após lavagens, adicionamos 100 µL do cromógeno e incubamos novamente por trinta minutos à temperatura ambiente, adicionando para finalizar 100 µL da solução de parada e procedendo à leitura à 450nm, como descrito anteriormente.

V.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Métodos de associação foram utilizados para analisar os dados genéticos. A hipótese nula é que o estado da doença é totalmente independente dos marcadores genotípicos, isto é, não há associação devido ao desequilíbrio de ligação observado entre os marcadores e qualquer gene casual não observado que controlaria a doença.

Os marcadores foram testados para equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) por regressão logística e marcadores fora do equilíbrio serão excluídos das análises. Análise de regressão logística incondicional realizada para os marcadores genéticos foi feita através do programa STATA™ 9.1 (www.stata.com). As frequências genotípicas e alélicas dos marcadores foram comparadas entre pacientes com hanseníase e controles, e consideradas significantes, quando os valores de p foram menores que 0.05 ($p < 0,05$).

Os resultados do ELISA foram analisados utilizando-se os programas software InStat3 e GraphPadPrism5. A comparação de dois grupos independentes foi feita através do teste de Mann-Whitney, enquanto para a comparação estatística entre mais grupos independentes utilizou-se o teste One-way ANOVA Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

V.7. FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DO ESTUDO

VI. RESULTADOS GERAIS

VI.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AMOSTRA AVALIADA

Tabela 2. Características clínico-epidemiológicas da amostra.

| A- Características da amostra | | | |
|------------------------------------------------|--------------|----------------------------|---------|
| | N indivíduos | Média - idade (anos) ± DP* | M:F** |
| Casos | 362 | 42,32 ± 12,88 | 199:163 |
| Controles | 368 | 34,80 ± 10,24 | 258:110 |
| B- Características clínicas da coorte de casos | | | |
| Fenótipo clínico | <i>n</i> | | |
| Tuberculóide (TT) | 44 | | |
| Borderline tuberculóide (BT) | 48 | | |
| Borderline (BB) | 38 | | |
| Borderline lepromatoso (BL) | 40 | | |
| Lepromatoso (LL) | 124 | | |
| Hanseníase indeterminada (I) | 63 | | |
| Outras formas (Neurite ou não classificada) | 5 | | |
| #Total | 362 | | |
| C - Pacientes com reação hansênica | | | |
| RR | 80 | | |
| ENH | 84 | | |
| Total# | 164 | | |

*DP, desvio padrão; **M, masculino e F, feminino; RR, Reação Reversa; ENH, Eritema Nodoso Hansênico; pacientes com RR e ENH estão também classificados no espectro clínico da hanseníase.

VI.2. RESULTADOS DO OBJETIVO 1: ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NOS GENES *TLR1*, *TLR2* e *TLR4* E A HANSENÍASE

VI.2.1- rs4833095 C/T e rs5743551 C/T no gene de *TLR1*

A análise do SNP rs4833095 C/T no gene *TLR1*, mostrou frequências alélicas de 0,60 e 0,40 para os alelos C e T respectivamente, na população avaliada. Em relação ao marcador rs5743551, as frequências foram de 0,61 para o alelo C e 0,39 para o alelo T. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois marcadores ($p > 0,05$). As frequências observadas dos alelos e genótipos nos grupos de casos e controles para os dois marcadores são mostrados Tabela 3.

Análises alélicas e genotípicas de associação por regressão logística para estes polimorfismos de *TLR1* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 4. Não foram observadas associações significantes na análise genotípica entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Na análise alélica, também não foram observadas associações entre os alelos de cada marcador e a hanseníase ($p > 0,05$). Realizamos também testes adicionais comparando pacientes sem surto reacional *vs* controles sadios, assim como pacientes reacionais (ENH + RR) *vs* controles sadios. Em nenhuma destas comparações foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 3. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para os polimorfismos rs4833095 e rs5743551 no gene *TLR1*.

| <i>TLR1</i> rs4833095 (N) Frequências Alélicas e Genotípicas | | | |
|---------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| | CASOS | CONTROLES | TOTAL |
| C | 382(58,8%) | 407(61,9%) | 789(60,3%) |
| T | 268(41,2%) | 251(38,1%) | 519(39,7%) |
| CC | 117(36,0%) | 122(37,1%) | 239(36,5%) |
| CT | 148(45,5%) | 163(49,5%) | 311(47,6%) |
| TT | 60(18,5%) | 44(13,4%) | 104(15,9%) |
| | N=325 | N=329 | |

| <i>TLR1</i> rs5743551 (N) Frequências Alélicas e Genotípicas | | | |
|---------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| | CASOS | CONTROLES | TOTAL |
| C | 387(59,2%) | 410(61,9%) | 797(60,6%) |
| T | 267(40,8%) | 252(38,1%) | 519(39,4%) |
| CC | 121(37,0%) | 127(38,4%) | 248(37,7%) |
| CT | 145(44,3%) | 156(47,1%) | 301(45,7%) |
| TT | 61(18,7%) | 48(14,5%) | 109(16,6%) |
| | N=327 | N=331 | |

Tabela 4. Comparação entre os polimorfismos no gene de *TLR1* rs4833095 C/T e rs5743551 C/T e a hanseníase: casos vs controles saudáveis.

| <i>TLR1</i> rs4833095 C/T | Odds | IC | P |
|----------------------------------|--------------|-----------|----------|
| Global 2df | | | 0,194 |
| <i>C/T X T/T</i> | 0,665 | 0,42-1,04 | 0,075 |
| <i>C/C X T/T</i> | 0,703 | 0,44-1,11 | 0,137 |
| Global 1df | | | 0,255 |
| <i>Alelo 1 - C</i> | 0,879 | 0,70-1,09 | 0,256 |
| <i>Alelo 2 - T</i> | 1,136 | 0,91-1,41 | 0,256 |

| <i>TLR1</i> rs5743551 C/T | Odds | IC | P |
|----------------------------------|--------------|-----------|----------|
| Global 2df | | | 0,354 |
| <i>C/T X T/T</i> | 0,731 | 0,47-1,13 | 0,164 |
| <i>C/C X T/T</i> | 0,749 | 0,47-1,17 | 0,212 |
| Global 1df | | | 0,315 |
| <i>Alelo 1 - C</i> | 0,894 | 0,72-1,11 | 0,316 |
| <i>Alelo 2 - T</i> | 1,117 | 0,89-1,38 | 0,316 |

Abreviações: Global 2df = Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df = Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

VI.2.2- rs7656411 G/T e rs3804099 C/T no gene de *TLR2*

A análise do SNP rs7656411 G/T no gene *TLR2*, mostrou frequências alélicas de 0,45 e 0,55 para os alelos G e T respectivamente, na população avaliada. Em relação ao marcador rs3804099, as frequências foram de 0,53 para o alelo C e 0,47 para o alelo T. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois marcadores ($p > 0,05$). As frequências observadas dos alelos e genótipos nos grupos de casos e controles para os dois marcadores são mostrados Tabela 5.

Análises alélicas e genotípicas de associação por regressão logística para estes polimorfismos de *TLR2* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 6. Não foram observadas associações significantes na análise alélica e genotípica entre o marcador rs7656411 e a hanseníase ($p > 0,05$) em nenhuma das comparações realizadas entre casos e controles. Entretanto, observamos uma associação significativa entre o alelo T do marcador rs3804099 e susceptibilidade à hanseníase, conforme mostrado na Tabela 6. Em outras comparações realizadas (paucibacilares sem reação vs controles sadios ou multibacilares sem reação vs controles sadios; pacientes reacionais vs controles sadios) não observamos associação.

Tabela 5. Distribuição das frequências alélicas e genóticas observadas para os polimorfismos rs3804099 e rs7656411 no gene *TLR2*.

| <i>TLR2</i> rs3804099 (N) Frequências Alélicas e Genóticas | | | |
|-------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| | CASOS | CONTROLES | TOTAL |
| C | 325(50,3%) | 372(56,5%) | 697(53,5%) |
| T | 321(49,7%) | 286(43,5%) | 607(46,5%) |
| CC | 76(23,5%) | 105(31,9%) | 181(27,8%) |
| CT | 173(53,6%) | 162(49,2%) | 335(51,4%) |
| TT | 74(22,9%) | 62(18,8%) | 136(20,9%) |
| | N=323 | N=329 | |

| <i>TLR2</i> rs7656411 (N) Frequências Alélicas e Genóticas | | | |
|-------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| | CASOS | CONTROLES | TOTAL |
| G | 269(44,1%) | 267(44,4%) | 536(44,2%) |
| T | 341(55,9%) | 335(55,6%) | 676(55,8%) |
| GG | 57(18,7%) | 56(18,6%) | 183(30,2%) |
| GT | 155(50,8%) | 155(51,5%) | 310(51,2%) |
| TT | 93(30,5%) | 90(29,9%) | 113(18,6%) |
| | N=305 | N=301 | |

Tabela 6. Comparação entre os polimorfismos no gene de *TLR2* rs3804099 C/T e rs7656411 G/T e a Hanseníase: casos vs controles sadios.

| <i>TLR2</i> rs3804099 C/T | Odds | IC | P |
|----------------------------------|--------------|-----------|--------------|
| Global 2df | | | 0,049 |
| <i>C/T X T/T</i> | 0,894 | 0,59-1,33 | 0,585 |
| <i>C/C X T/T</i> | 0,606 | 0,38-0,94 | 0,029 |
| Global 1df | | | 0,021 |
| <i>Alelo 1 - C</i> | 0,771 | 0,61-0,96 | 0,022 |
| <i>Alelo 2 - T</i> | 1,296 | 1,03-1,62 | 0,022 |

| <i>TLR2</i> rs7656411 G/T | Odds | IC | P |
|----------------------------------|--------------|-----------|----------|
| Global 2df | | | 0,984 |
| <i>G/T X T/T</i> | 0,967 | 0,67-1,39 | 0,86 |
| <i>G/G X T/T</i> | 0,985 | 0,61-1,57 | 0,95 |
| Global 1df | | | 0,927 |
| <i>Alelo 1 - G</i> | 0,989 | 0,78-1,24 | 0,928 |
| <i>Alelo 2 - T</i> | 1,01 | 0,80-1,27 | 0,928 |

Abreviações: Global 2df = Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df = Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

VI.2.3- rs1927911 A/G e rs1927914 A/G no gene de *TLR4*

A análise dos SNPs rs1927911 A/G no gene *TLR4*, mostrou frequências alélicas de 0,41 e 0,59 para os alelos A e G respectivamente, na população avaliada. Em relação ao marcador rs1927914, as frequências foram de 0,49 para o alelo A e 0,51 para o alelo G. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois marcadores ($p > 0,05$). As frequências observadas dos alelos e genótipos nos grupos de casos e controles para os dois marcadores são mostrados Tabela 7.

Análises alélicas e genotípicas de associação por regressão logística para estes polimorfismos de *TLR4* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 8. Não foram observadas associações significantes na análise alélica e genotípica entre o marcador rs1927911 e a hanseníase ($p > 0,05$) em nenhuma das comparações realizadas entre casos e controles. Entretanto, observamos uma associação limítrofe entre o alelo A do marcador rs1927914 e a hanseníase quando analisamos apenas pacientes sem reação (paucibacilares e multibacilares) em relação a controles sadios. Estratificando essa amostra em paucibacilares sem reação vs controles sadios ou multibacilares sem reação vs controles sadios deixamos de observar essa lábil significância, possivelmente devido à perda de poder estatístico. Esse resultado é mostrado na Tabela 9.

Tabela 7. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para os polimorfismos rs1927911 e rs1927914 no gene *TLR4*.

| <i>TLR4</i> rs1927911 (N) Frequências Alélicas e Genotípicas | | | |
|---------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| | CASOS | CONTROLES | TOTAL |
| A | 269(40,4%) | 209(41,6%) | 478(40,9%) |
| G | 397(59,6%) | 293(58,4%) | 690(59,1%) |
| AA | 52(15,6%) | 96(38,2%) | 212(36,3%) |
| AG | 165(49,5%) | 101(40,2%) | 266(45,5%) |
| GG | 116(34,8%) | 54(21,5%) | 106(18,2%) |
| | N=333 | N=251 | |

| <i>TLR4</i> rs1927914 (N) Frequências Alélicas e Genotípicas | | | |
|---------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| | CASOS | CONTROLES | TOTAL |
| A | 337(50,9%) | 223(46,5%) | 560(49,0%) |
| G | 325(49,1%) | 257(53,5%) | 582(51,0%) |
| AA | 89(26,9%) | 59(24,6%) | 148(25,9%) |
| AG | 159(48,0%) | 105(43,8%) | 264(46,2%) |
| GG | 83(25,1%) | 76(31,7%) | 159(27,8%) |
| | N=331 | N=240 | |

Tabela 8. Comparação entre os polimorfismos no gene de *TLR4* rs1927911A/G e rs1927914A/G e a hanseníase: casos vs controles sadios.

| <i>TLR4</i> rs1927911 A/G | Odds | IC | P |
|----------------------------------|--------------|-----------|----------|
| Global 2df | | | 0,051 |
| <i>A/G X G/G</i> | 1,351 | 0,93-1,95 | 0,107 |
| <i>A/A X G/G</i> | 0,796 | 0,49-1,27 | 0,341 |
| Global 1df | | | 0,677 |
| <i>Alelo 1 - A</i> | 0,952 | 0,75-1,19 | 0,678 |
| <i>Alelo 2 - G</i> | 1,049 | 0,83-1,31 | 0,678 |

| <i>TLR4</i> rs1927914 A/G | Odds | IC | P |
|----------------------------------|-------------|-----------|----------|
| Global 2df | | | 0,224 |
| <i>A/G X G/G</i> | 1,386 | 0,93-2,06 | 0,107 |
| <i>A/A X G/G</i> | 1,381 | 0,87-2,17 | 0,162 |
| Global 1df | | | 0,152 |
| <i>Alelo 1 - A</i> | 1,18 | 0,94-1,48 | 0,153 |
| <i>Alelo 2 - G</i> | 0,847 | 0,67-1,06 | 0,153 |

Abreviações: Global 2df = Valor de *p* a 2 graus de liberdade; Global 1df= Valor de *p* a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

Tabela 9. Valores estatísticos da comparação entre pacientes sem evidência de surto reacional e controles sadios.

| <i>TLR4</i> rs1927914 A/G | Odds | IC | P |
|---------------------------|-------|-----------|--------------|
| Global 2df | | | 0,095 |
| A/G X G/G | 1,662 | 0,96-2,85 | 0,065 |
| A/A X G/G | 1,812 | 0,99-3,30 | 0,052 |
| Global 1df | | | 0,051 |
| Alelo 1 - A | 1,337 | 0,99-1,79 | 0,053 |
| Alelo 2 - G | 0,747 | 0,55-1,00 | 0,053 |

Abreviações: Global 2df = Valor de p a 2 graus de liberdade; Global 1df = Valor de p a 1 grau de liberdade; OR = odds ratio (razão de possibilidades); CI = 95% confidence interval (intervalo de confiança).

VI.3. RESULTADOS DO OBJETIVO 2: DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS EM SORO DE PACIENTES COM HANSENÍASE E CONTROLES SADIOS.

Foram dosadas pela técnica de ELISA sanduíche um painel de citocinas (IL-6, IL1- β , IL12p40, IL17, TNF, INF- γ e IL-10) e quimiocinas (CXCL-9, CXCL-10, MCP-1, IL-8, MIP1- α e MIP1- β) em soro de pacientes sem surto reacional, pacientes com RR, ENH e controles sadios. Os valores de p referentes a cada uma das comparações realizadas são mostrados na Tabela 10. Os resultados mostram que à exceção das citocinas IFN- γ , TNF e IL-10, houve diferenças significantes na comparação entre pacientes com hanseníase e controles sem a doença, com os pacientes expressando maiores concentrações destas citocinas em relação aos controles (Figura 2). Por outro lado, na análise da produção de quimiocinas, observamos que os pacientes com hanseníase produzem mais IL-8, CXCL-9, MIP-1 α e MIP-1 β e, por outro lado, menos MCP-1 em relação aos controles. Não foi observada diferença nas concentrações de CXCL-10 nessa comparação geral (Figura 3).

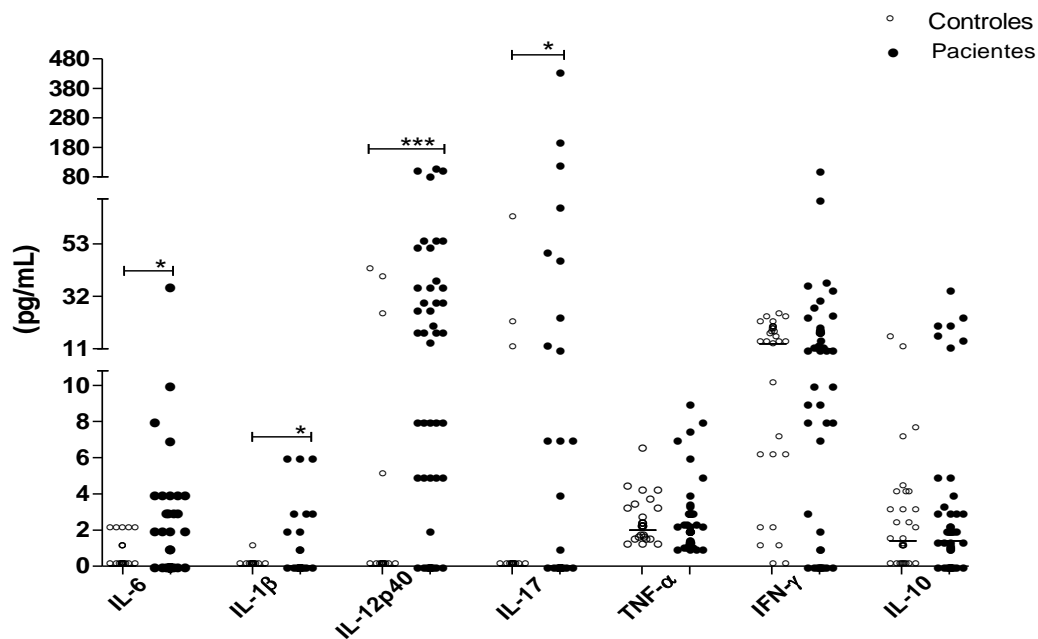


Figura 2. Produção de citocinas em pacientes com hanseníase com e sem evidência de reação hansênica (N= 52) e controles sem a doença (N= 30). A dosagem foi realizada por ELISA no soro e os resultados expressos em pg/mL. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; Teste de Mann-Whitney.

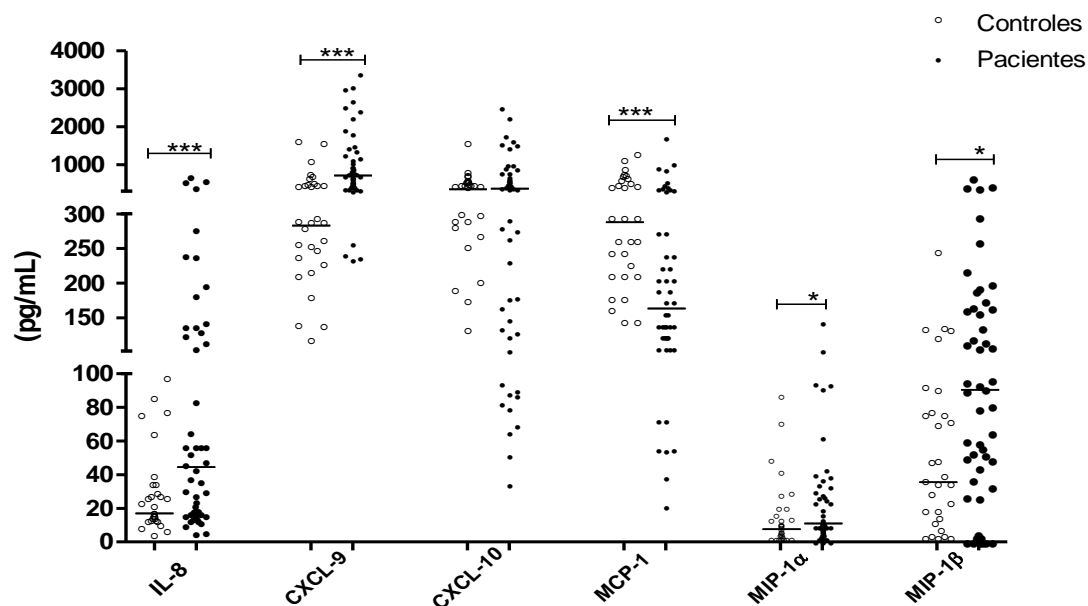


Figura 3. Produção de quimiocinas em pacientes com hanseníase com e sem evidência de reação hansênica (N=52) e controles sem a doença (N=30). A dosagem foi realizada por ELISA no soro e os resultados expressos em pg/mL. Os valores que são estatisticamente diferentes são indicados como: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; Teste de Mann-Whitney.

Tabela 10. Comparação das concentrações sérica de citocinas e quimiocinas entre os grupos de pacientes com hanseníase com e sem reação hansênica e os controles sem a doença.

| Citocina / Quimiocina | Todos os Casos x Controles | ENH * x Controles | RR * x Controles | Sem reação x Controles | Com reação x Sem reação | ENH x RR | RR x SR* | ENH x SR |
|-----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|------------------|-----------|------------------|
| (Soro) | | | | | | | | |
| Citocina | | | | | | | | |
| IL-6 | p = 0.047 | p = 0.008 | p = 0.071 | p = 0.840 | p = 0.107 | p = 0.268 | p = 0.308 | p = 0.046 |
| IL-12p40 | p < 0.0001 | p = 0.0003 | p < 0.0001 | p = 0.0007 | p = 0.361 | p = 0.903 | p = 0.387 | p = 0.496 |
| IL1-β | p = 0.036 | p = 0.119 | p = 0.013 | p = 0.264 | p = 0.333 | p = 0.445 | p = 0.252 | p = 0.757 |
| IL-17 | p = 0.042 | p = 0.140 | p = 0.022 | p = 0.024 | p = 0.657 | p = 0.653 | p = 0.837 | p = 0.525 |
| TNF | p = 0.482 | p = 0.077 | p = 0.368 | p = 0.321 | p = 0.016 | p = 0.365 | p = 0.114 | p = 0.033 |
| IL-10 | p = 0.887 | p = 0.029 | p = 0.691 | p = 0.261 | p = 0.062 | p = 0.012 | p = 0.404 | p = 0.005 |
| IFN-γ | p = 0.476 | p = 0.614 | p = 0.297 | p = 0.932 | p = 0.359 | p = 0.592 | p = 0.374 | p = 0.517 |
| Quimiocina | | | | | | | | |
| IL-8 | p = 0.000 | p = 0.000 | p = 0.005 | p = 0.247 | p = 0.088 | p = 0.051 | p = 0.299 | p = 0.032 |
| CXCL-9 | p < 0.0001 | p < 0.0001 | p = 0.000 | p = 0.001 | p = 0.119 | p = 0.188 | p = 0.386 | p = 0.038 |
| CXCL-10 | p = 0.960 | p = 0.209 | p = 0.711 | p = 0.076 | p = 0.049 | p = 0.267 | p = 0.125 | p = 0.047 |
| MIP1-α | p = 0.028 | p = 0.015 | p = 0.184 | p = 0.171 | p = 0.932 | p = 0.123 | p = 0.698 | p = 0.433 |
| MIP1-β | p = 0.011 | p = 0.002 | p = 0.011 | p = 0.961 | p = 0.038 | p = 0.657 | p = 0.100 | p = 0.042 |
| MCP-1 | p = 0.000 | p = 0.361 | p = 0.002 | p = 0.000 | p = 0.957 | p = 0.199 | p = 0.457 | p = 0.332 |

A tabela mostra os resultados representativos do grupo de pacientes com Reação Reversa (RR*) (N=22), Eritema Nodoso Hansênico (ENH*) (N=13), pacientes Sem Reação (SR*) (N=17) e os controles sem a doença (N= 30). A concentração das moléculas do soro foi realizada por técnica de ELISA sanduíche. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001; Teste de Mann-Whitney.

Na análise estratificada entre pacientes com e sem surtos reacionais e controles sadios, observamos que as maiores diferenças na produção das citocinas e quimiocinas em relação a outros grupos ocorreram entre pacientes com ENH. Esses pacientes produziram significativamente maiores quantidades de IL-12p40, IL-10 e IL-6 (Figuras 4A, D e F); MIP-1α, MIP-1β, CXCL-9 e IL-8 (Figuras 5A, B, D e F) em relação a controles sadios. E maiores concentrações de IL-10, IL-6 e TNF (Figuras 4D, F e G) e MIP-1β, CXCL-9, CXCL-10 e IL-8 (Figuras 5B, D, E, F) também foram observadas em

relação a pacientes com hanseníase, sem evidência de surto reacional e controles sadios. No caso de IL-10 essa diferença também foi observada entre pacientes com ENH em comparação com RR (Figura 4D).

Foram observadas diferenças significativas na produção de IL-12p40, MIP-1 β , CXCL-9 e IL-8 entre pacientes com RR e controles sadios (Figuras 4A, 5B, 5D e 5F) e, ao contrário do observado para ENH, diferenças também para IL-1 β e MCP-1 (Figuras 4C e 5C). Não houve diferenças nas concentrações entre pacientes com RR e pacientes sem reações hansênicas. Adicionalmente, na comparação entre pacientes sem reação e controles, destaca-se a produção estatisticamente significativa entre maior produção de IL12p40 (Figura 4A), IL-17 (Figura 4E), CXCL-9 (Figura 5D) e menor produção de MCP-1 (Figura 5C). Na comparação entre pacientes com (ENH + RR) e sem reações hansênicas, observamos diferenças significantes na produção de TNF (Figura 4G), MIP-1 β e CXCL-10 (Figuras 5B e E).

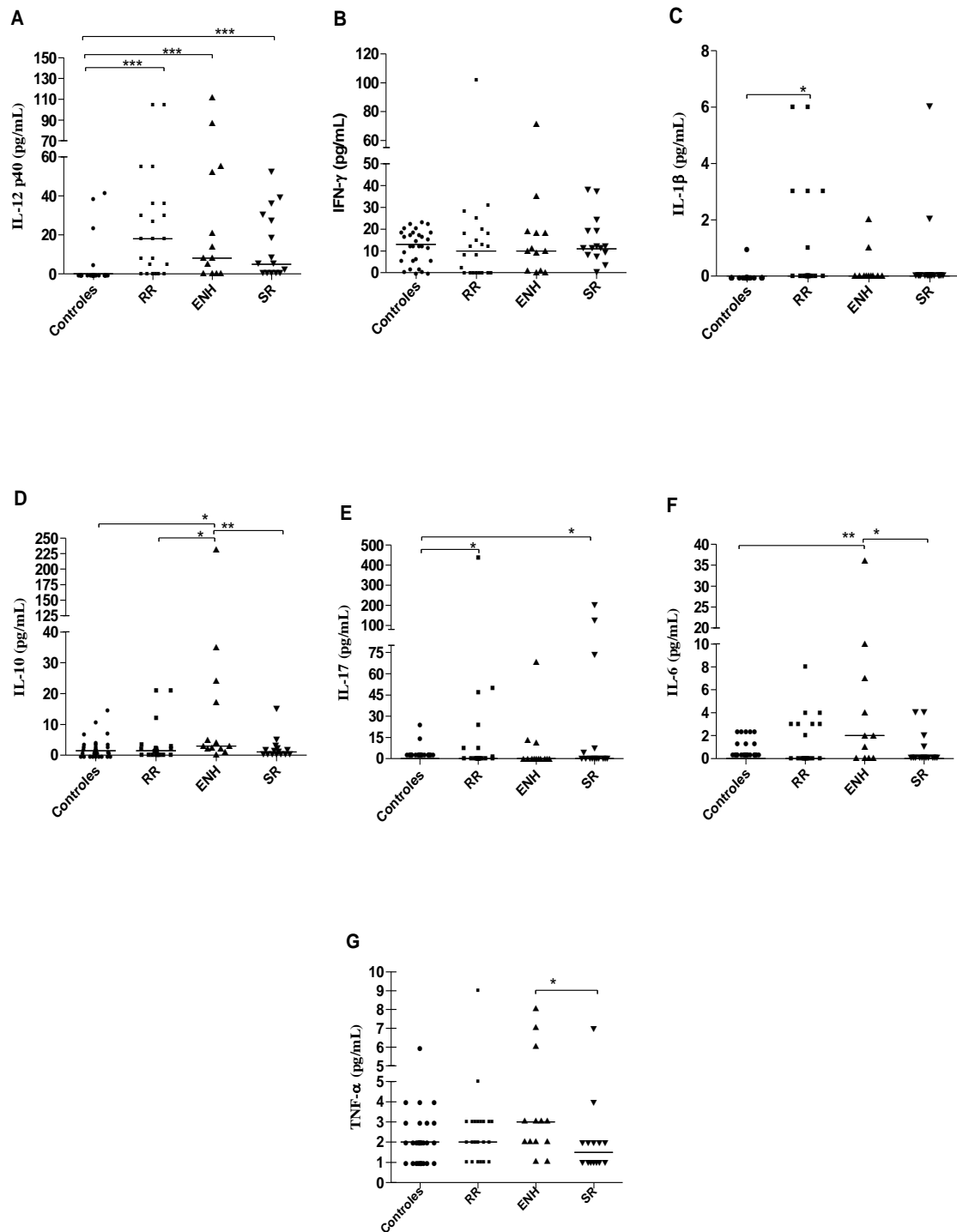


Figura 4. Comparação dos níveis de citocinas IL-12p40 (A), IFN- γ (B), IL-1 β (C), IL-10 (D), IL-17 (E), IL-6 (F) e TNF- α (G) no soro de pacientes com hanseníase e controles sem a doença. O Teste de Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos RR (N=22), ENH (N=13), SR (N= 17) e controles sadios (N=30). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

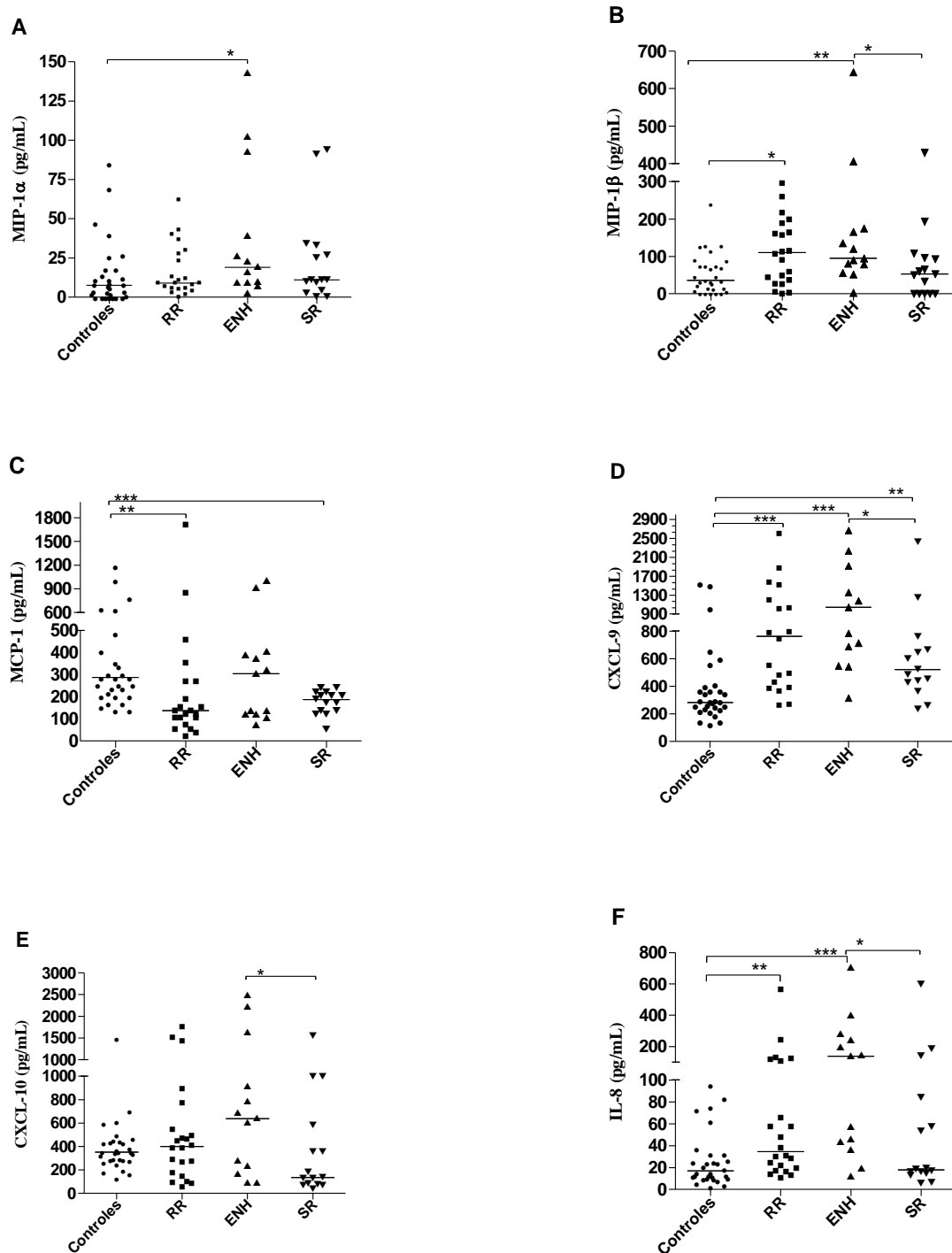


Figura 5. Comparação dos níveis de quimiocinas MIP -1 α (A), MIP-1 β (B), MCP-1 (C), CXCL-9 (D), CXCL-10 (E) e IL-8 (F) no soro de pacientes com hanseníase e controles sem a doença. O Teste de Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos RR (N =22), ENH (N=13), SR (N= 17) e controles sadios (N=30). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

VI.4. RESULTADOS DO OBJETIVO 3: AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES GENÓTIPOS EM GENES *TLR* COM A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO SORO DE PACIENTES COM E SEM REAÇÕES HANSÊNICAS.

VI.4.1- rs4833095 C/T e rs5743551 C/T no gene de *TLR1*

Na análise dos marcadores do gene *TLR1* observamos diferenças significantes na produção de algumas citocinas e quimiocinas como descrito a seguir: No caso do SNP rs4833095 (genótipos presentes CC, CT e TT), observamos uma diferença na produção de IL-12p40 e IL-17, na qual se observa que indivíduos carreadores do alelo T produziram maiores concentrações dessas citocinas, conforme observado nas Figuras 6A e 6B, respectivamente. Esses resultados ficam ainda mais evidentes quando comparamos indivíduos com o genótipo CC em relação aos genótipos dos carreadores do alelo T (CT e TT), conforme mostrado nas Figuras 6D e 6E. Adicionalmente, observamos diferenças também na produção da quimiocina MCP-1. Entretanto, nesse caso, pacientes carreadores do alelo T produziram menores concentrações dessa quimiocina, Figuras 6C e 6F.

Em relação ao marcador rs5743551 (genótipos presentes CC, CT e TT), observamos também diferenças significantes na produção de IL-12p40 e MCP-1 com carreadores do alelo T produzindo mais IL-12p40 (Figuras 7A e 7C) e, por outro lado, menos MCP-1 (Figuras 7B e 7D), dados em concordância com o SNP rs4833095.

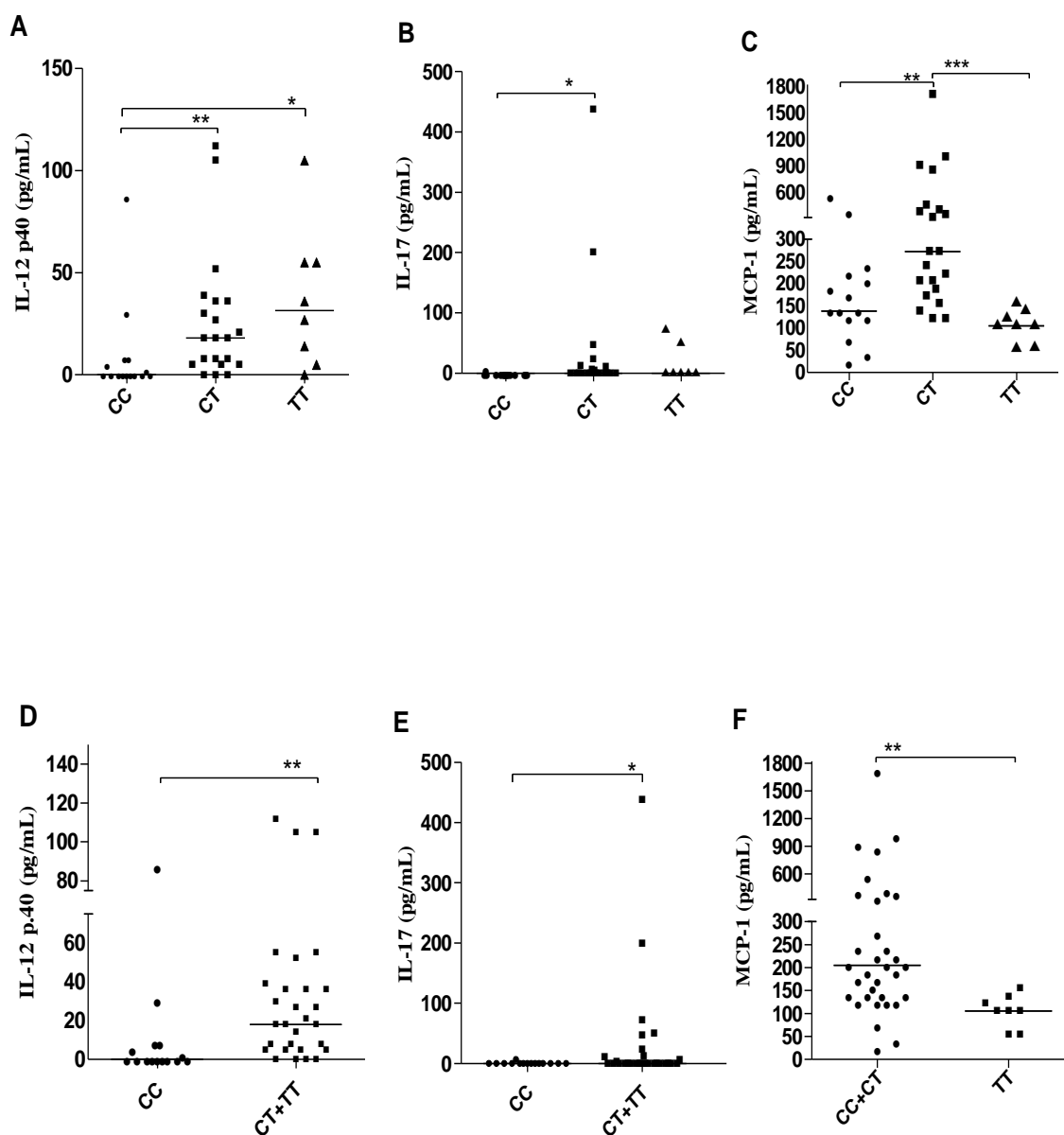


Figura 6. Níveis séricos de IL-12p40 (A, D), IL-17 (B, E) e MCP-1 (C, F) por genótipos de *TLR1* rs4833095. O Teste de Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes com e sem reação hansênica (N=52). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

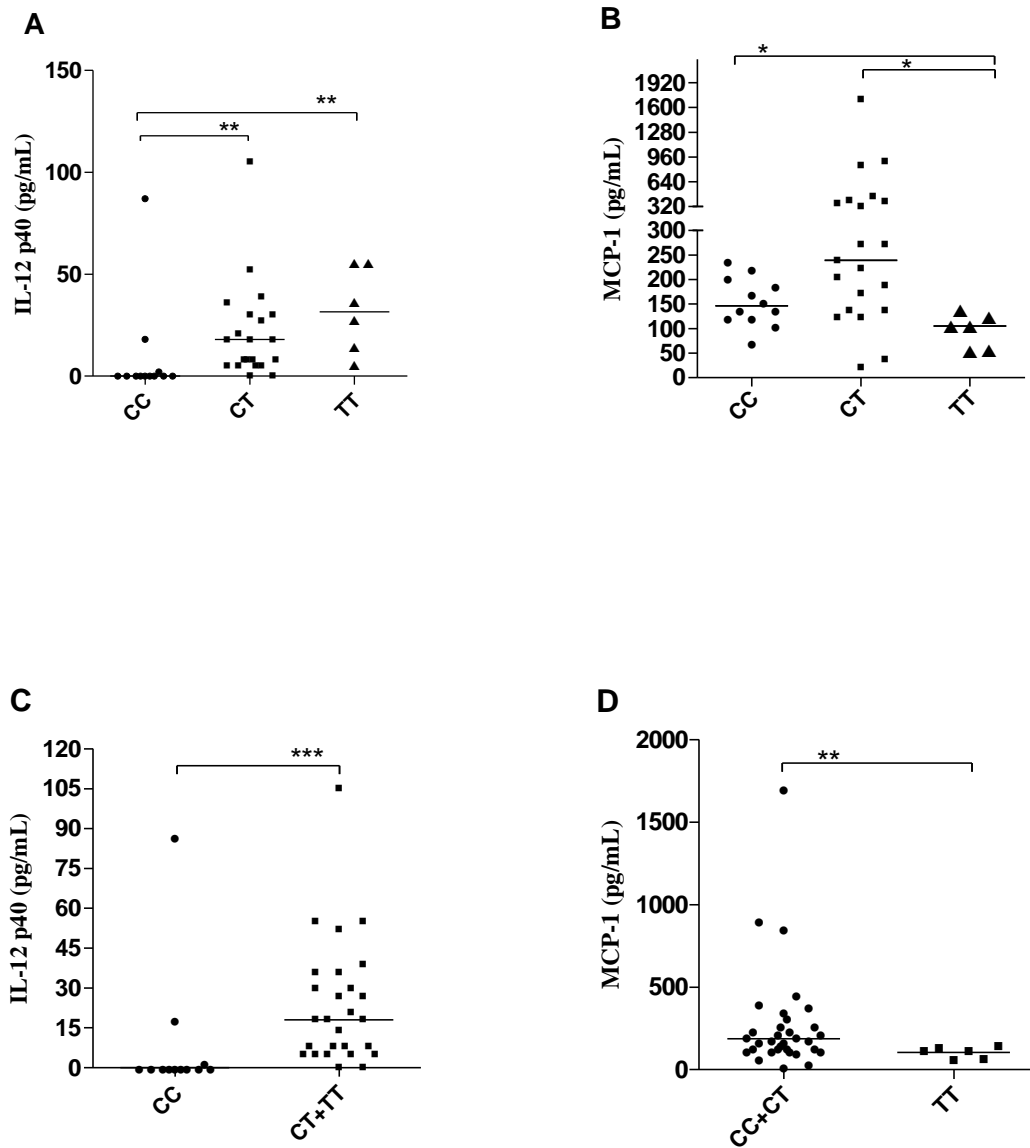


Figura 7. Níveis séricos de IL-12p40 (A, B) e MCP-1 (C, D) por genótipos de *TLR1* rs5743551. O Teste de Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes com e sem reação hansênica (N=52). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

VI.4.2- rs7656411 G/T e rs3804099 C/T no gene de *TLR2*

Na análise dos marcadores do gene *TLR2* observamos diferenças significantes na produção de algumas citocinas e quimiocinas como descrito a seguir. No caso do marcador rs3804099 (genótipos presentes CC, CT e TT), observamos que carreadores do alelo T produzem maiores concentrações de IL-17 (Figura 8A), sendo essa diferença significativa quando juntamos os genótipos CT e TT e comparamos com o genótipo complementar CC, Figura 8C. Também observamos uma produção significativamente maior de IL-6 em carreadores do alelo T (Figura 8B), especialmente na comparação entre indivíduos com os genótipos CC e CT quando comparados com o genótipo TT, Figura 8D.

Em relação ao marcador rs7656411 (genótipos presentes GG, GT e TT), observamos uma relevante diferença na produção da quimiocina CXCL-10 entre indivíduos portadores dos diferentes genótipos, com os carreadores do alelo G produzindo maiores concentrações dessa quimiocina, conforme mostrado nas Figuras 9A e 9B.

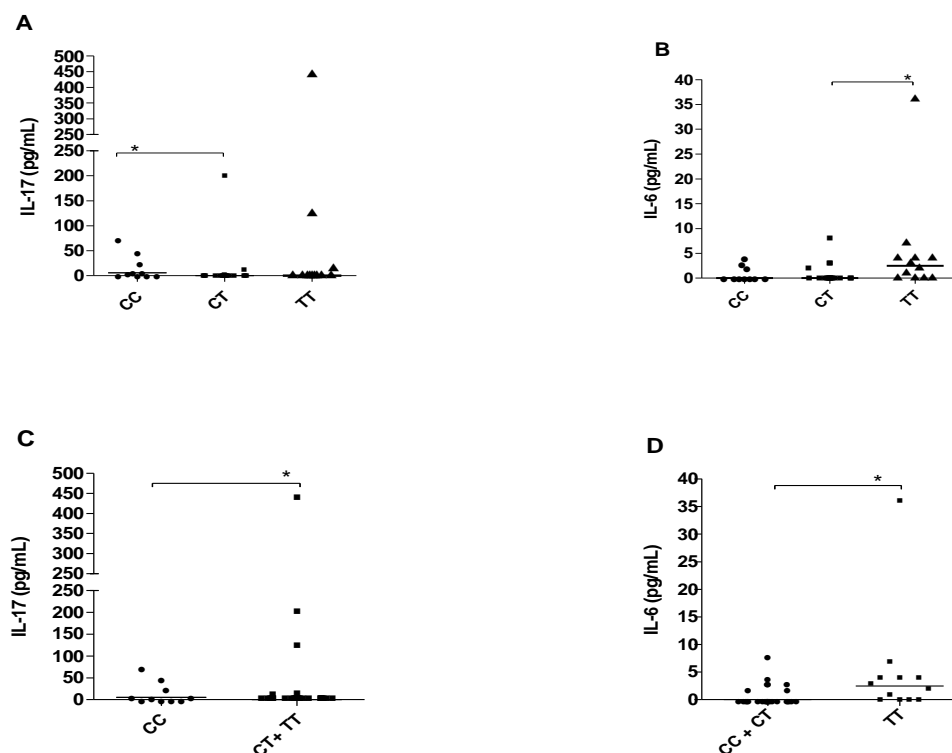


Figura 8. Níveis séricos de IL-17 (A, C) e IL-6 (B, D) por genótipos de *TLR2* rs3804099. O Teste de Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes com e sem reação hansênica (N=52). * p < 0.05.

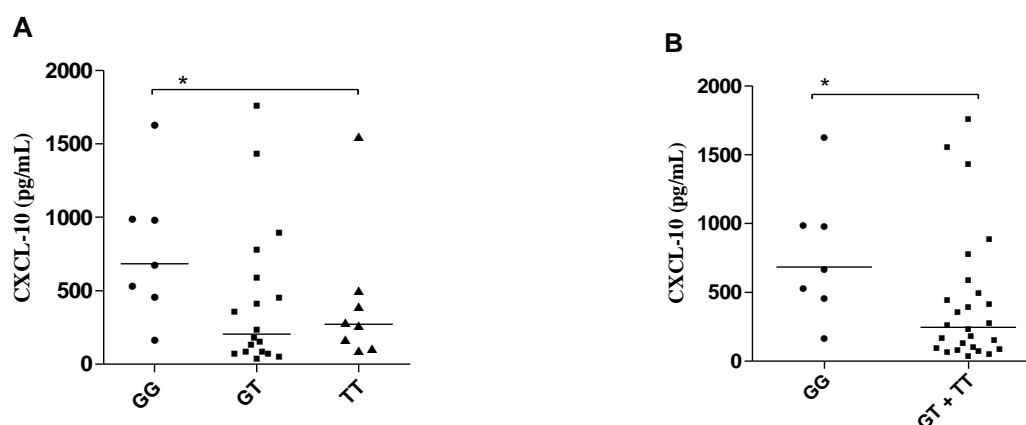


Figura 9. Níveis séricos de CXCL10 (A, B) por genótipos de *TLR2* rs7656411. O Teste de Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes com e sem reação hansênica (N=52). * $p < 0.05$.

VI.4.3- rs1927911 A/G e rs1927914 A/G no gene de *TLR4*

Na análise dos marcadores do gene *TLR4* não observamos diferenças significantes na produção de citocinas ou quimiocinas para o marcador rs1927911 (genótipos presentes AA, AG e GG), $p > 0,05$. No caso do marcador rs1927914 (genótipos presentes AA, AG e GG), observamos diferenças na produção das citocinas IL-17 e IL-1 β , com carreadores do alelo A produzindo mais essas citocinas em relação aos carreadores do alelo G (Figuras 10A e 10B), respectivamente. Essa diferença ficou mais evidente quando comparamos os homocigóticos AA em relação aos genótipos complementares juntos, AG e GG, conforme mostrado nas Figuras 10C e 10D.

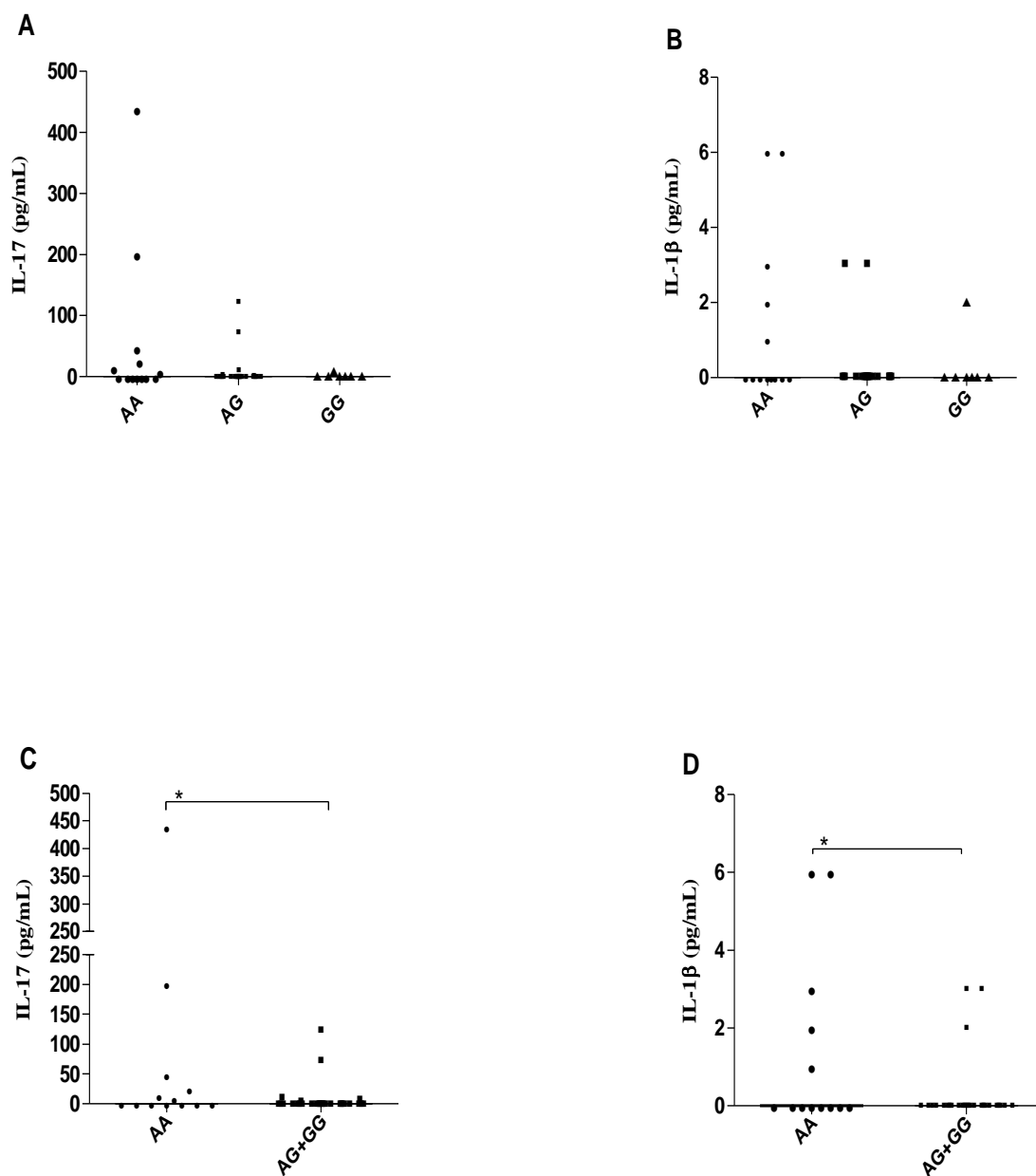


Figura 10. Níveis séricos de IL-17 (A, C) e IL-1β (B, D) por genótipos de *TLR4* rs1927914. O Teste de Mann-Whitney foi usado para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos de pacientes com e sem reação hansênica (N=52). * $p < 0.05$.

Resumindo, nossos resultados sugerem que:

- A citocina IL-17 aparece como um marcador regulado pelo polimorfismo de diferentes genes *TLR*, conforme observado em nossas análises para marcadores de *TLR1*, 2 e 4.

- Em adição, a citocina IL12p40 e a quimiocina MCP-1 são marcadores imunológicos regulados por polimorfismos no gene *TLR1*, considerando que as diferenças nessas citocinas foram confirmadas para os dois marcadores testados.

- Adicionalmente, outros marcadores relevantes como CXCL-10 e IL-6 parecem ser regulados por variantes de *TLR2* e, a IL-1 β relacionada a *TLR4*.

VII. DISCUSSÃO

Doenças causadas por patógenos intracelulares, são fortes indicadores de que a composição genética hospedeiro-patógeno exerce grande impacto sobre a susceptibilidade à doença e fenótipos clínicos. A hanseníase é exemplo da complexidade deste cenário. O amplo espectro das manifestações clínicas e patológicas da hanseníase e a heterogeneidade epidemiológica, geográfica e étnica, bem como os diferentes graus de susceptibilidade à infecção dependem fortemente da variabilidade genética do hospedeiro combinada com variáveis relacionadas ao ambiente e, em menor instância, ao patógeno (Mira et al., 2003; Alter et al., 2008; Sardinha et al., 2011). Enquanto alguns locos afetam a susceptibilidade intrínseca à hanseníase (hanseníase *per se*), outros modificam fatores de risco para as formas pauci e multibacilares da hanseníase ou para o desenvolvimento de reações hansênicas (Mira et al., 2003). Embora a introdução da PQT tenha impactado fortemente na distribuição global da doença (Lockwood, 2000; Katoch et al., 2008), vários países têm falhado nas tentativas de quebrar o ciclo de transmissão da hanseníase (WHO, 2012; WHO, 2011-2015), que ainda persiste como problema de saúde pública.

Estudos têm apontado os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na resposta imune observada durante a hanseníase. Além disso, as vias moleculares envolvidas durante os episódios reacionais foram descritas por vários autores (Pinheiro et al., 2011). As citocinas desempenham papéis importantes na proteção e imunopatologia da hanseníase e são consideradas componentes importantes de reações hansênicas (Madan et al., 2011). Interações entre bactérias, fungos e componentes virais e receptores de reconhecimento de padrões, tais como Toll-like receptores (TLRs), ativam a via do NF- κ B, provocam inflamação e iniciam a resposta imune adaptativa (Medzhitov et al., 1997; Taylor et al., 2012). O *M. leprae* e outras espécies de micobactérias tais como *M. tuberculosis* são ricos em agonistas para vários membros da família TLR, incluindo TLR1, 2 e 4 (Hart & Tapping, 2012). A contribuição das variações nos genes dos *TLR* para a susceptibilidade à hanseníase tem sido investigada em diferentes populações, e variantes nestes genes foram associados com a hanseníase em diversos estudos anteriores (Misch et al., 2008; Wong et al., 2010; Marques et al., 2013).

No nosso trabalho, observamos uma associação entre o alelo T do polimorfismo no gene *TLR2* (rs3804099) e susceptibilidade à hanseníase (OR= 1,29; p=0.022) na

comparação entre casos e controles. Este polimorfismo foi previamente associado à reação do tipo I em uma população etíope (Bochud et al., 2008). Adicionalmente, no estudo de uma coorte dinamarquesa esse marcador foi também associado com resposta a terapia anti-TNF em pacientes com doença inflamatória intestinal (Bank et al., 2014). Dados como esse são relevantes, pois corroboram estudos de escaneamento de genoma prévios que apontam para um compartilhamento de genes entre hanseníase e doença inflamatória intestinal (Bank et al., 2014).

Em relação ao gene *TLR1*, Marques et al. (2013) documentaram uma importante associação entre o alelo S (polimorfismo N248S, rs48033095) com a hanseníase em diferentes populações brasileiras, isoladamente e em meta-análise. Em nossa população, no entanto, essa associação não foi confirmada. Resultados conflitantes em estudos genéticos podem ocorrer por diferentes razões. Por exemplo, diferenças étnicas entre a população estudada em relação às demais populações avaliadas; as formas clínicas, incluindo a presença e o número de pacientes com reação do tipo 1 ou 2 variam entre as coortes estudadas; ou, alternativamente, na nossa população outros alelos de *TLR1* contribuiriam de maneira mais específica na susceptibilidade à doença, de modo que este resultado negativo não exclui de que outros marcadores no gene *TLR1* poderiam se mostrar associados com a hanseníase nessa amostra.

Após a análise no gene de *TLR4*, não observamos uma associação significativa entre os marcadores testados e a hanseníase, exceto um valor limítrofe entre o marcador rs1927914 ($p=0,051$) e pacientes sem reação (paucibacilares e multibacilares). Esse dado pode se tratar de um resultado sem maior relevância (viés) ou, o tamanho amostral não permitiu que se observasse melhor o efeito do marcador. Porém, não podemos deixar de refletir no fato de que o alelo G nesse caso poderia ser um fator de proteção contra o desenvolvimento de reações hanseníase. Apesar de não ter sido associado com hanseníase no nosso estudo, o marcador rs1927911 foi associado com susceptibilidade à tuberculose na população sudanesa (Zaki et al., 2012).

No estudo imunológico realizado no presente estudo observamos uma maior produção de citocinas e quimiocinas no soro de pacientes com hanseníase em relação aos controles sadios. Essa maior produção seria esperada por conta do processo infeccioso. Houve algumas diferenças marcantes nessa comparação geral, e como exemplo destacamos uma grande diferença na produção de IL-12p40 entre casos e controles.

Dados em culturas de PBMC estimuladas com antígeno de *M. leprae* mostram maior produção de IL-12p40 em células de pacientes em relação a controles (Libraty et al., 1997). Entretanto em citocinas-chave como IFN- γ , TNF e IL-10 essa diferença não foi observada. Apesar de isentos de imunossupressores, mas considerando a PQT, pode ser que essas citocinas já estejam moduladas por conta da redução do estímulo antigênico e seus níveis, portanto, comparáveis aos dos controles. A dapsona e clofazimina possuem efeitos anti-inflamatórios que podem explicar essa redução (Madan et al., 2011). Em adição, dados mostram queda de IFN- γ , TNF e IL-10 em pacientes após o início do tratamento (Madan et al., 2011; Freitas et al., 2015). Na análise estratificada, entre pacientes com e sem surtos reacionais e controles sadios, observamos que as maiores diferenças na produção das citocinas e quimiocinas ocorreram entre pacientes reacionais, especialmente no ENH. Os surtos reacionais se caracterizam por episódios inflamatórios agudos, com sintomas envolvendo nódulos eritematosos, febre, astenia e artralgia. Nossos dados estão em concordância com outros da literatura que documentam maior produção de citocinas e quimiocinas nestes pacientes. Moraes *et al.* (2000) mostraram que IL-12 é mais expressa no sangue e tecidos de pacientes reacionais, o que sugere a participação dessa citocina no desenvolvimento de reações; Stefani et al. (2009) observaram elevada produção de IL-6 no plasma de pacientes reacionais em relação a pacientes não reacionais, e, em outro estudo, a produção de IL-6 foi maior em pacientes com ENH em relação a pacientes multibacilares não reacionais (Belgaumkar et al., 2007). Nós também observamos uma diferença nas concentrações de TNF entre pacientes reacionais e não reacionais. Vários estudos mostram uma maior produção dessa citocina em pacientes com reações, especialmente no ENH (Sarno et al., 1991; Khanolkar-Young et al., 1995). Esses resultados são relevantes na patogênese da hanseníase, pois algumas citocinas pró-inflamatórias contribuem com a defesa por meio da atividade macrofágica, mas a inflamação exarcebada compromete o estado geral dos pacientes. Em adição, em um estudo, comparando casos de RR e ENH, os níveis de IL-10 foram mais elevados no ENH (Madan et al., 2011), esses dados são consistentes com nossos resultados. Maiores concentrações das quimiocinas CXCL-9 e CXCL-10 tem sido observada no plasma de pacientes em relação a controles (Mendonça et al., 2007; Mendonça et al., 2010); e CXCL-10 tem sido apontada como um marcador de reação do tipo 1 (Scollard et al., 2011). No nosso estudo a única diferença nas comparações feitas com CXCL-10 ocorreu entre pacientes reacionais com RR e ENH em comparação com não reacionais. CXCL-9 por sua vez, teve uma produção muito maior nos pacientes em relação aos controles, mas,

por outro lado, não foi observada diferença significativa na produção entre pacientes com e sem reação como ocorreu para CXCL-10.

No caso da quimiocina MCP-1, houve maior produção nos controles em relação aos casos. O MCP-1 é uma quimiocina importante na atração e adesão dos macrófagos nos sítios inflamatórios. Hasan et al. (2006) mostraram redução da expressão de MCP-1 induzida por TNF nas culturas de células de pacientes com a forma lepromatosa, o que poderia contribuir para a disseminação do bacilo. Outras quimiocinas como IL-8, MIP-1 β e MIP-1 α são importantes no recrutamento de neutrófilos e linfócitos para os sítios de infecção micobacterianas (Hasan, 2004).

Na análise das citocinas e quimiocinas estratificando por genótipos observamos diferenças que indicam um papel funcional por parte de alguns dos marcadores testados. No caso de *TLR1*, houve diferenças significantes para IL-17 e MCP-1 para os marcadores rs4833095 e rs5743551 e de IL-12p40 para o rs4833095. Esse último SNP foi associado à hanseníase um estudo envolvendo diferentes populações brasileiras (Marques, 2013), corroborando com achados em uma população de Bangladesh (Shuring et al., 2009). Embora em nossa população esse marcador não tenha sido associado à doença no estudo populacional, esses resultados indicam que o mesmo pode ter um papel regulador na produção dessas moléculas na infecção pelo *M. leprae*. A forma como esses SNPs se agrupam em haplótipos, assim como a influência de fatores epigenéticos são determinantes na forma como os mesmos podem exercer seus efeitos na resposta imunológica. O SNP rs5743551 é intrônico (região não codificante), e, portanto, o desequilíbrio de ligação com outros marcadores poderia responder pela associação observada.

Para SNPs no gene *TLR2*, rs3804099, observamos concentrações diferenciadas de IL-6 e IL-17 entre carreadores do alelo T, que produzem maiores quantidades dessas citocinas em relação a homozigóticos CC. Esse alelo foi associado com risco aumentado de hanseníase em nossa população (OR=1,29, p=0.022) e é um marcador de região codificante do gene, o que fortalece a ideia de que o mesmo pode ter um papel funcional. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida em altas concentrações na hanseníase e associada ao desenvolvimento de ENH (Belgaumkar et al., 2007; Stefani, 2009). Em relação a IL-17 os resultados são contraditórios, com alguns estudos indicando produção deficiente no soro e baixa expressão *in situ*, e outros estudos tem mostrado um aumento

de sua expressão na lesão (Da Motta-Passos I et al., 2012; Trombone et al., 2012). Os nossos resultados mostraram maiores concentrações de IL-17 em pacientes com hanseníase em relação a controles. A quimiocina CXCL-10 aparece diferencialmente produzida em relação a genótipos do SNP rs7656411. Sendo esse um SNP intrônico, esse pode ser o resultado do desequilíbrio de ligação com outros marcadores.

No caso do gene *TLR4*, observamos uma produção maior de IL-17 e IL1- β entre carreadores do alelo A do SNP rs1927914. Isso indica que haplótipos nos genes TLR podem realmente ter um papel importante na produção de IL-17. Adicionalmente, a citocina IL1- β tem um papel imunossupressor (Moubasher et al., 1998), sendo produzido em altas concentrações nas formas multibacilares (Madan et al., 2011). Observamos uma associação limítrofe entre esse alelo A e a hanseníase (pacientes sem reações *vs* controles). Portanto, se esse polimorfismo pode regular positivamente a produção dessas citocinas, esse dado dá sentido à associação genética, ainda que tênue observada. Estudos adicionais serão necessários para avaliar o papel funcional dessa variante.

A hanseníase é uma doença negligenciada e apesar dos progressos no conhecimento de sua patogênese nas últimas décadas, muito precisa ser avançado até que cheguemos ao desenvolvimento de uma vacina ou à quebra definitiva do ciclo de transmissão da doença. Dados gerados em estudos genômicos podem ser úteis no desenvolvimento de drogas e vacinas contra a hanseníase (Rodrigues & Lockwood, 2011). Além disso, o diagnóstico precoce pode ser a chave para erradicar a doença e evitar lesões graves, que causam deformidades e traumas psicológicos.

VIII. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Esse trabalho integra um projeto de pesquisa que tem como objetivo identificar biomarcadores genéticos e imunológicos na hanseníase. Objetivamos, dar continuidade com a avaliação da expressão dos genes de Toll-like receptors nas amostras de RNA que temos estocadas. Adicionalmente, iremos avaliar outros genes relacionados com a resposta imune. Esses marcadores serão determinados, mas podemos trabalhar com outros genes de Toll-like receptores, além de outras citocinas e quimiocinas.

IX. CONCLUSÕES

- O gene *TLR2* (rs3804099) está associado a susceptibilidade à doença na população avaliada.
- A produção de citocinas como IL-17, IL-6, IL12p40, IL-1 β e de quimiocinas como MCP-1 e CXCL-10 parecem ser reguladas por polimorfismos nos receptores TLR.
- Embora não associado à hanseníase na nossa população, o marcador rs4833095 (N248S) parece ter um papel funcional na resposta imune de indivíduos com hanseníase.

X. SUMMARY

EVALUATION OF THE ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTORS GENES AND THE PROFILE OF IMMUNE RESPONSE IN A POPULATION FROM BAHIA AFFECTED BY LEPROSY

Leprosy is a chronic infectious contagious disease characterized by a diversity of clinical manifestations determined by the host immune response to infection caused by *Mycobacterium leprae*, which in turn is influenced by the host genetic background. In this context, most of the genes and genomic regions associated with susceptibility or resistance to disease are related to the production of cytokines and other molecules important in immune pathways. The aim of this study was to evaluate the polymorphism in genes *TLR1*, *TLR2* and *TLR4* and the serological profile of immune response associated with these markers in a population from Bahia affected by leprosy. To achieve these aims, we used the approach of candidate genes in a case-control model. The genotyping of *TLR1* (rs4833095 and rs5743551), *TLR2* (rs7656411 and rs3804099) and *TLR4* (rs1927914 and rs1927911) markers was performed by the method of TaqMan qRT-PCR and analyzed by unconditional logistic regression (STATA v 9.1TM). The dosage of proteins related to TLR activation was done by sandwich ELISA in 52 patients with leprosy divided into groups of 17 individuals without reaction, 22 subjects with type 1 reaction (RR) and 13 with type 2 response (ENH). In addition to these, 30 controls without the disease were enrolled. Data were analyzed by non-parametric Mann-Whitney using InStat3 program. The results show an association between the T allele of rs3804099 marker in the *TLR2* gene and leprosy susceptibility (OR = 1.296, CI = 1.03 to 1.62, p = 0.022); In addition, there were significant differences in the production of IL-6, IL-1 β , IL-12p40 and IL-17 cytokines as well as the MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL-9 and IL-8 chemokines between individuals with leprosy and controls without the disease (p \leq 0.05). When comparing patients with and without leprosy reactions and controls, the main differences were observed among individuals with ENH and controls, with significant increase in IL-12p40, IL-10, IL-6, MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL-9 and IL-8 (p \leq 0.05). In the evaluation of the association between different genotypes of the *TLR1*, 2 and 4 markers and cytokine production assessed in the serum, we observed that the IL-12p40 cytokine and the chemokine MCP-1 are immunological markers regulated by polymorphisms in *TLR1* gene. In addition, the cytokine IL-17 appears as a marker regulated by the polymorphism of different *TLR* genes, as observed in our analyzed markers for *TLR1*, 2 and 4. In addition to this result, other relevant markers such as CXCL-10 and IL-6 appear to be regulated by *TLR2* variants and finally, the cytokine IL-1 β appears related to *TLR4*. Together these data show that the tested *TLR* markers may have a regulatory role in the immune response against *M. leprae*, indirectly driving the production of cytokines and chemokines.

Keywords: 1. Leprosy; 2. Toll-Like Receptors; 3. Polymorphism, Single Nucleotide; 4. Cytokines; 5. Chemokines.

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS LB, PENA MT, SHARMA R, HAGGE DA, SCHURR E, TRUMAN RW. Insights from animal models on the immunogenetics of leprosy - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107(Suppl. I): 197-208. 2012.

AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signalling. **Nat Rev Immunol** 4:499-511. 2004.

ALLEN SJ, CROWN SE, HANDEL TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annu Rev Immunol** 25:787-820. 2007.

ALTER A, ALCAIS A, ABEL L, SCHURR E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. **Hum Genet** 123:227-35. 2008.

ALTER A, GRANT A, ABEL L, ALCAIS A, SCHURR E. Leprosy as a genetic disease. **Mamm Genome** 22: 19-31. 2011.

ANDERSON H, STRYJEWSKA B, BOYANTON BL, SCHWATZ MR. Hansen disease in the United States in the 21st century. **Arch Pathol Lab Med** 131:982-6. 2007.

APPLIED BIOSYSTEMS 7500/7500. **Fast Real-Time PCR System Getting Started Guide for Genotyping Experiments**. 2010.

ARAÚJO MG. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36: 373-382. 2003.

ARAÚJO SRF, JAMIESON SE, DUPNIK KM, MONTEIRO GR, NOBRE ML, DIAS MS, NETO PBT, QUEIROZ MCP, GOMES CEM, BLACKWELL JM, JERONIMO SMJ. Examining ERBB2 as a candidate gene for susceptibility to leprosy (Hansen's disease) in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109(2): 182-188. 2014.

ATTIA EAS, ABDALLAH M, EL-KHATEEB E, SAAD AA, LOTfi RA, ABDALLAH M, EL-SHENNAWY D. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4+ CD25highFoxP3+ T-reg cells, as well as down regulatory Cytokines. **Arch Dermatol Res** 306:793–801. DOI 10.1007/s00403-014-1486-2. 2014.

AYCOCK WL. A proposed study of conjugal leprosy with reference to contagion and hereditary susceptibility. **Int J Lepr** 16: 1-8. 1948.

BANK S, ANDERSEN PS, BURISCH J, PEDERSEN N, ROUG S, GALSGAARD J, TURINO SY, BRODERSEN JB, RASHID S, RASMUSSEN BK, AVLUND S, OLESEN TB, HOFFMANN HJ, THOMSEN MK, THOMSEN VØ, FRYDENBERG M, NEXØ BA, SODE J, VOGUE U, ANDERSEN V. Associations between functional polymorphisms in the NFκB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in

Danish patients with inflammatory bowel disease. **Pharmacogenomics J.** 14(6):526-34. Doi: 10.1038/tpj.2014.19. 2014.

BARRETO JA, BELONE AFF, FLEURY RN, SOARES CT, LAURIS JRP. Manifestações de padrão tuberculóide reacional na hanseníase dimorfa: estudo histoquímico e imuno-histoquímico comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 80:68-74, 2005.

BELGAUMKAR VA, GOKHALE NR, MAHAJAN PM, BHARADWAJ R, PANDIT DP, DESHPANDE S 2007. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. **Lepr Rev** 78: 223-230. 2007.

BEIGUELMAN B. Genetics and leprosy. **Ciência & Saúde Coletiva.**7(1):117-128, 2002.

BLACKWELL, J. M., S. SEARLE, T. GOSWAMI, AND E. N. MILLER. Understanding the multiple functions of Nramp1. **Microbes Infect** 2:317–321, 2000.

BOCHUD PY, HAWN TR, ADEREM A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. **J Immunol** 170:3451-4, 2003.

BOCHUD PY, HAWN TR, SIDDIQUI MR, SAUNDERSON P, BRITTON S, ABRAHAM I, ARGAW AT, JANER M, ZHAO LP, KAPLAN G, ADEREM A. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **J Infect Dis** 197: 253-261, 2008.

BOCHUD PY, SINSIMER D, ADEREM A, SIDDIQUI MR, SAUNDERSON P, BRITTON S, ABRAHAM I, TADESSE ARGAW A, JANER M, HAWN TR, KAPLAN G. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 28: 1055-1065. 2009.

BORGES, L., AND D. COSMAN. 2000. LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11:209–217.

BRASIL. Ministério da Saúde. Hanseníase in Vigilância em Saúde. Brasília. **Cadernos de Atenção Básica**, no 21, p. 70-104. 2007.

_____. Departamento de Vigilância em Saúde. et al. Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: plano de ação 2011-2015 / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis.** Relatórios. Brasília: p104. 2012.

_____. Situação da Hanseníase. Portal da Saúde. Disponível em: www.saude.gov.br [2015].

BRATSCHI MW, STEINMANN PETER, WICKENDEN A & GILLIS TP. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. **Lepr Rev.** 86,142-155, 2015.

BRIGHTBILL HD, LIBRATY DH, KRUTZIK SR, YANG RB, BELISLE JT, BLEHARSKI JR. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science** 285:732-6, 1999.

BRITTON WJ, LOCKWOOD DN. Leprosy. **Lancet** 363:1209-1219. 2004.

CARDOSO CC, PEREIRA AC, DE SALES MARQUES C, MORAES MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity and disease outcome. **Future Microbiol** 6: 533-549. 2011.

CHAKMA JK, MALAVIYA GN, GIRDHAR A, HUSSEIN S. Florid reactive periostitis ossificans of long bones and digits associated with reaction in a patient with leprosy. **Lepr Rev.** 83:98-103. 2012.

CHARO IF, RANSOHOFF RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med** 354:610-21. 2006.

CHIMELLI L, FREITAS M, NASCIMENTO O. Values of nerve biopsy in the diagnosis and follow-up of leprosy: the role of vascular lesions and usefulness of nerve studies in the detection of persistent bacilli. **J Neurol** 244:318-23. 1997.

COSTA RD, MENDONÇA VA, LYON S, PENIDO RA, COSTA AMDD, COSTA MD, NISHI MP, TEIXEIRA MM, TEIXEIRA AL, ANTUNES CMF. Evaluation of the expression of interleukin 1 beta (IL-1 β) and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) in leprosy patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 41(Suplemento II):99-103. 2008.

CUNHA SS, RODRIGUES LC, MOREIRA S, CARVALHO LC, BARRETO ML, DOURADO I. Upward trend in the rate of detection of new cases of leprosy in the State of Bahia, Brazil. **Int J Lepr** 69:308-17. 2001.

DATASUS. Situação da Hanseníase. Disponível em: www.saude.gov.br/ [2011].

DA MOTTA-PASSOS I, MALHEIRO A, GOMES NAVECA F, DE SOUZA PASSOS LF, RIBEIRO DE BARROS CARDOSO C, DA GRAÇA SOUZA CUNHA M, PÔRTO DOS SANTOS M, VILLAROUÇO SILVA GA, SILVA FRAPORTI L, DE PAULA L. Decreased RNA expression of interleukin 17A in skin of leprosy. **Eur J Dermatol.** 22(4):488-94. Doi: 10,1684/EJD.2012.1741. 2012.

D. DIEGO JL, GEROLD G, ZYCHLINSKY A. Sensing, presenting and regulating PAMPs. **Ernst Schering Found Symp Proc** 3:83-95, 2007.

DEMANGEL C, BRITTON WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. **Immunol Cell Biol.** 78:318-24, 2000.

DE ALMEIDA-NETO FB, ASSIS COSTA VM, OLIVEIRA-FILHO AF, DE SOUZA FRANCO E, TAVARES JULIÃO DE LIMA EV, BARROS DE LORENA VM, OLIVEIRA DE SOUZA VM, DE SOUSA MAIA MB. TH17 cells, interleukin-17 and interferon- γ in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** 1354-61, doi: 10.1111 / jdv.12869. 2014.

FOSS NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina** (Ribeirão Preto). 30:335-9, 1997.

_____. Imunopatologia. In: TALHARI S, NEVES RG (eds) Hansenologia. 3ª edição. **Gráfica Tropical**, Manaus, cap.9, p.97-102, 1997.

_____. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro. 74: 113-119, 1999.

FOSSIEZ F. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J Exp Med** 183(6): 2593-2603, 1996.

FRANCESCHI, D. S. A.; SACRAMENTO, W. S. D. et al. Hanseníase no Mundo Moderno: O Que Sabemos Sobre a Influência Genética do Hospedeiro no seu Controle? **Arquivos de Medicina**, v.23, p.159-165, 2009.

FREITAS AA, OLIVEIRA RM, HUNGRIA EM, CARDOSO LPV, SOUSA ALOM, COSTA MB, REED SG, DUTHIE MS, STEFANI MMA. Alterations to antigen-specific immune responses before and after multidrug therapy of leprosy. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.021. 2015.

GOULART IMB, FIGUEIREDO F, COIMBRA T, FOSS NT. Detection of transforming growth factor- β 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **American Journal of Pathology** 148:911-917, 1996.

GOULART IMB, MINEO JR, FOSS NT. Production of transforming growth factor- β 1 by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. **Clin Exp Immunol.** 122:330-4, 2000.

GOULART IMB, PENNA GO, CUNHA G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Rev Soc Bras Med Trop** 35:365-75, 2002.

GOULART LR, FERREIRA FR, GOULART IM. 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** 48:91–98. [PubMed: 16965356], 2006.

HARBOE M. The immunology of leprosy. *In*: HASTINGS RC (ed) *Leprosy*. **Churchill-Livingstone**, Edinburgh, cap. 4, p.53-87, 1985.

_____. Overview of host-parasite relation. *In*: Hastings RC, Oromolla DVA (eds). *Leprosy*. 2nd edn. **Churchill Livingstone**, Edinburgh, 1994.

HART BE and TAPPING RI. Review Article. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. **Journal of Tropical Medicine**, ID 415057, 12 pages doi: 10.1155/2012/415057, 2012.

HASAN Z, MAHMOOD A, ZAFAR S, KHAN AA, HUSSAIN R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF- α responses. **International Journal of Leprosy**, vol 7, n^o1, p. 35-44. 2004.

HASAN Z, JAMIL B, ZAIDI I, ZAFAR S, KHAN AA, HUSSAIN R. Elevated Serum CCL2 Concomitant with a Reduced Mycobacterium-Induced Response Leads to Disease Dissemination in Leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology**, vol 63, p. 241–247. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2006.01733. x. 2006.

IWASAKI A & MEDZHITOV R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology** 987 - 995 (2004).

JOHNSON CM, LYLE EA, OMUETI KO, STEPENSKY VA, YEGIN O, ALPSOY E, HAMANN L, SCHUMANN RR, TAPPING RI. Cutting edge: a common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **J Immunol**. 178:7520-7524, 2007.

KAHAWITA IP, LOCKWOOD DN. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 102: 329-337, 2008.

KAHAWITA IP, WALKER SL, LOCKWOOD DN. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **An Bras Dermatol** 83:75-82, 2008.

KAMATH S, VACCARO SA, REA TH, OCHOA MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. **J Am Acad Dermatol**. 71(4):795-803. 2014.

KANG TJ, CHAE GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **FEMS Immunol Med Microbiol** 31:53-8, 2001.

KANG TJ, LEE SB, CHAE GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. **Cytokine** 20:56-62, 2002.

KANG TJ, YEUM CE, KIM BC, YOU EY, CHAE GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. **Immunology** 112:674-80, 2004.

KATOCH K, KATOCH VM, NATARAJAN M, GUPTA UD. et al. Long term follow-up results of 1 year MDT in MB leprosy patients treated with standard MDT+once a month Minocycline and Ofloxacin. **Indian J Lepr** 80:331-44, 2008.

KHANOLKAR-YOUNG S, RAYMENT N, BRICKELL PM, KATZ DR, VINAYAKUMAR S, COLSTON MJ. et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. **Clin Exp Immunol.** 99: 196-202. 1995.

KINDLER V, SAPPINO AP, GRAU GE, PIGUET PF, VASSALLI P. The inducing role of tumour necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell** 56: 731-740, 1989.

KRUTZIK SR, OCHOA MT, SIELING PA, UEMATSU S, NG YW, LEGASPI A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat Med** 9:525-32, 2003.

KRUTZIK SR, TAN B, LI H, OCHOA MT, LIU PT, SHARFSTEIN SE, *et al.* TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat Med** 11:653-60, 2005.

LASTÓRIA JC, MMA MA. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – Part 1*. **Continuing medical education.** Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>. 2014.

LIBRATY DH, AIRAN LE, UYEMURA K, JULLIEN D, SPELLBERG B, REA TH, MODLIN RL. Interferon-g Differentially Regulates Interleukin-12 and Interleukin-10 Production in Leprosy. **J. Clin. Invest**, vol 99, n° 2, p.336-341.1997.

LOCKWOOD DN. Leprosy in the new millennium. **J Med Microbiol** 49:301- 3, 2000.

_____. Leprosy. In: BURNS DA, BREATHNACH SM, COX NH, GRIFFITHS CEM, editor. **Rook's textbook of dermatology**, 7th ed.; p. 29.1 -29.21. 2004.

_____. Leprosy. **Clin Evid**; (15):1079-87. Jun/2006.

LOCKWOOD DNJ, LUCAS SB, DESIKAN KV, EBENEZER G, SUNEETHA S, NICHOLLS P. The histological diagnosis of leprosy type 1 reactions: identification of key variables and an analysis of the process of histological diagnosis. **J Clin Pathol**; 61:595-600 doi:10.1136/jcp.2007.053389. 2008.

LOCKWOOD DN, SUNEETHA L, SAGILI KD, CHADUVULA MV, MOHAMMED I, VAN BRAKEL W, SMITH WC, NICHOLLS P, SUNEETHA S. Cytokine and protein

markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. **PLoS Negl Trop Dis** 5; e1327, 2011.

MABALAY MC, HELWIG EB, TOLENTINO JG, BINFORD CH. The histopathology and histochemistry of erythema nodosum leprosum. **Int J Lepr** 33: 28-49, 1965.

MADAN NK, AGARWAL K & CHANDER R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. **Lepr Rev** 82, 371 – 382, 2011.

MANANDHAR R, LE MASTER JW, ROCHE PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. **Int J Lepro Other Mycobact Dis** 67:270-8, 1999.

MARQUES, C. D. S.; BRITO-DE-SOUZA, V. N. et al. Toll-like Receptor 1 N248S Single-Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Risk and Regulates Immune Activation During Mycobacterial Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v.208, n.1, jul 1, p.120-129, 2013.

MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA, JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature** 388:394–7, 1997.

MENDONÇA VA, MALAQUIAS LC, BRITO-MELO GE, CASTELO-BRANCO A, ANTUNES CM, RIBEIRO AL. et al. Differentiation of patients with leprosy from non-infected individuals by the chemokine eotaxin/CCL11. **Am J Trop Med Hyg** 77: 547-550. 2007.

MENDONÇA VA, COSTA RD, MELO GEBA, Antunes CM, Teixeira AL. Immunology of leprosy. **An Bras Dermatol** 83:343-50, 2008.

MENDONÇA VA, COSTA RD, LYON S, PENIDO RA, BORGES VO, BRETAS TL. et al. Plasma levels of chemokines during leprosy specific treatment. **Acta Trop** 113: 151-154. 2010.

MEYERSON MS. Erythema nodosum leprosum. **Int J Dermatol** 35:389-92, 1996.

MIRA MT, ALCAIS A, DI PIETRANTONIO T. et al. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. **Genes Immun** 4:67-73, 2003.

MIRA MT, ALCAÍS A, NGUYEN VT, MORAES MO, DI FLUMERI C, VU HT, MAI CP, NGUYEN TH, NGUYEN NB, PHAM XK, SARNO EN, ALTER A, MONTPETIT A, MORAES ME, MORAES JR, DORÉ C, GALLANT CJ, LEPAGE P, VERNER A, VAN DE VOSSE E, HUDSON TJ, ABEL L, SCHURR E. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature** 427(6975):636-40, 2004.

MISCH EA, HAWN TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. **Clin Sci (Lond)** 114:347-360, 2008.

MISCH EA, MACDONALD M, RANJIT C, SAPKOTA BR, WELLS RD, SIDDIQUI MR. et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. **PloS Negl Trop Dis** 2: e 231, 2008.

MISCH EA, BERRINGTON WR, VARY JC JR, HAWN TR. Leprosy and the human genome. **Microbiol Mol Biol Rev** 74: 589-620, 2010.

MODLIN RL, GEBHARD JF, TAYLOR CR, REA TH. In situ characterization of T-lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. **Clin Exp Immunol** 53: 17-24, 1983.

MODLIN RL, MELANCON-KAPLAN J, YOUNG SMM, PIRMEZ C, KINO H, CONVIT J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc Natl Acad Sci USA** 85: 1213-1217, 1988.

MODLIN RL. The innate immune response in leprosy. **Curr Opin Immunol** 22(1): 48–54. [Doi: 10.1016/j.coi.2009.12.001](https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.12.001), 2010.

MONOT M, HONORE N, GARNIER T. et al. On the origin of leprosy. **Science** 308:1040–2. 7, 2005.

_____. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nat Genet** 41:1282–9, 2009.

MONTOYA D, CRUZ D, TELES RM, LEE DJ, OCHOA MT, KRUTZIK SR, CHUN R, SCHENK M, ZHANG X, FERGUSON BG. et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host Microbe** 6:343–353. [Doi: 10.1016/j.chom.2009.09.002](https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.002). 2009.

MONTOYA D, MODLIN RL, “Learning from leprosy. Insight into the human innate immune response”. **Advancies in Immunology**, vol. 105, no.C, pp. 1-24, 2010.

MORAES MO, SARNO EN, TELES RM, ALMEIDA AS, SARAIVA BC, NERY JA, SAMPAIO EP. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. **J Invest Dermatol** 115: 935-941. 2000.

MORAES MO, SAMPAIO EP, NERY JA, SARAIVA BC, ALVARENGA FB, SARNO EN. Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. **Br J Dermatol** 144: 175-81, 2001.

MORAES MO, CARDOSO CC, VANDERBORGHT PR, PACHECO AG. Genetics of host response in leprosy. **Lepr Rev** 77:189-202, 2006.

MORAES MO, PACHECO AG. Genetics of complex diseases: knowing gene polymorphisms do matter. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 29(11): 2144-2146. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311XPE011113>. 2013.

MOREIRA AL, SAMPAIO EP, ZMUIDZINAS A, FRINDT P, SMITH KA, KAPLAN G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J Exp Med** 177:1675-80, 1993.

MOUBASHER AD, KAMEL NA, ZEDAN H, RAHEEM DD. Cytokines in leprosy, II. Effect of treatment on serum cytokines in leprosy. **Int J Dermatol.**37(10):741-6.1998.

NAAFS B. Leprosy reactions. New knowledge. **Trop Geogr Med** 46:80-4, 1994.

_____. Treatment of Leprosy: science or politics? **Trop Med Int Health** 11:268-78, 2006.

NARAYANAN RB, LAAL S, SHARMA K, BHUTANI LK, NATH I. Differences in predominant T cell phenotypes and distribution pattern in reactional lesions of tuberculoid and lepromatous leprosy. **Clin Exp Immunol** 55:623-8, 1984.

OLIVEIRA RB, OCHOA MT, SIELING PA, REA TH, RAMBUKKANA A, SARNO EM. et al. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infect Immun** 71:1427-33, 2003.

OKAMOTO YOSHIDA Y1, UMEMURA M, YAHAGI A, O'BRIEN RL, IKUTA K, KISHIHARA K, HARA H, NAKAE S, IWAKURA Y, MATSUZAKI G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. **J Immunol.** 15;184(8):4414-22. 2010.

OTTENHOFF THM. Immunology of leprosy. **Tropical and Geographical Medicine** 46:72-80, 1994.

PARDILLO FE, FAJARDO TT, ABALOS RM, SCOLLARD D, GELBER RH. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. **Clin Infect Dis** 44:1096-9, 2007.

PENNA MLF, OLIVEIRA MLWR, CARMO EH, PENNA GO, TEMPORÃO JG. Influência do aumento do acesso à atenção básica no comportamento da taxa de detecção de hanseníase de 1980 a 2006. **Rev Soc Bras Med Trop** 41 (Supl. 2): S1-S5, 2008.

PIMENTEL MIF, NERY JAC, BORGES E, GONÇALVES RR, SARNO EN. O exame neurológico inicial na hanseníase multibacilar: correlação entre a presença de nervos afetados com incapacidades presentes no diagnóstico e com a ocorrência de neurites francas. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 78:561-568, 2003.

PINHEIRO RO, DE SOUZA SALLES J, SARNO EM, SAMPAIO EP. Mycobacterium leprae-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiol**, 6(2):217-30. Doi: 10.2217/fmb.10.173. 2011.

POCATERRA L, JAIN S, REDDY R, et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg* 74:868-79, 2006.

PREVEDELLO FC, MIRA MT. Hanseníase: uma doença genética? *An Bras Dermatol* 82:451-9, 2007.

RANQUE B, NGUYEN VANÂ T, VU HONGÂ T, NGUYEN THUÂ H, NGUYEN NGOCÂ B, PHAM XUANÂ K, SCHURR E, ABEL L, ALCAÃ SA. Age is an important risk factor for onset and sequelae of reversal reactions in Vietnamese patients with leprosy. *Clin Infect Dis* 44: 33-40, 2007.

RÊGO JL, OLIVEIRA JM, DE SANTANA NL, MACHADO PRL, LÉA CASTELLUCCI. The role of ERBB2 gene polymorphisms in leprosy susceptibility. *Braz J Infect Dis*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.12.008>. 2015.

RICHARDUS JH, NICHOLLS PG, CROFT RP, WITHINGTON SG, SMITH WCS. Incidence of acute nerve function impairment and reactions in leprosy: a prospective cohort analysis after 5 years of follow-up. *Int J Epidemiol* 33:337-43, 2004.

RIDLEY DS, JOB CK. The pathology of leprosy. In: HASTINGS RC, ed. *Leprosy*. Edinburgh: Churchill Livingstone 100–33, 1985.

_____. The pathology of leprosy. In: HASTINGS RC, OPROMOLLA DVA (eds). *Leprosy*. 2nd edn. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994.

RIDLEY DS, JOPLING WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34:255-73, 1996.

ROACH DR, BEAN AGD, DEMANGEL C, FRANCE MP, BRISCOE H, BRITTON WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of Mycobacterial infection. *J Immunol* 168:4620-7, 2002.

RODRIGUES LC, LOCKWOOD DN. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis* 11(6):464-70, 2011.

ROY S, MCGUIRE W, MASCIE-TAYLOR CG, SAHA B, HAZRA SK, HILL AV. et al. Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy. *J Infect Dis* 176:530-2, 1997.

ROY S, FRODSHAM A, SAHA B, HAZRA SK, MASCIE-TAYLOR CG, HILL AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* 179:187–191. [PubMed: 9841838], 1999.

SAMPAIO EP, SARNO EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz J of Med Biol Res* 31: 69-76, 1998.

SAMPAIO LH, SOUSA ALM, BARCELOS MC, GANÂNCIA S, STEFANI MMA, DUTHIE MS. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy. **Eur J Clin Infect Dis Microbiol** 31(7):1443-1451. Doi: 10.1007/s10096-011-1462-0. 2012.

SANTOS DO, SANTOS SL, ESQUENAZI D, NERY JA, DEFROYT M, LORRE K, ET AL. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. **Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi** 70:15-24, 2001.

SANTOS AR, SUFFYS PN, VANDERBORGHT PR, MORAES MO, VIEIRA LM, CABELLO PH, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis** 2002; 186:1687-91.

SANTOS APT, ALMEIDA GG, MARTINEZ CJ, REZENDE C. Imunopatologia da hanseníase: aspectos clínicos e laboratoriais. **NewLab** 73: 142-156, 2005.

SARDINHA, J. F. J. et al. Genetic risk factors for human susceptibility to infections of relevance in dermatology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 708715, jul/ago/2011.

SARNO EN, GRAU GE, VIEIRA LM, NERY JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. **Clin Exp Immunol** 84:103, 1991.

SARNO EN, SANTOS AR, JARDIM MR, SUFFYS PN, ALMEIDA AS, NERY JAC. et al. Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF α . **Lepr Rev** 71: S154-60, 2000.

SAUER ME, SALOMÃO H, RAMOS GB, D'ESPINDULA HR, RODRIGUES RS, MACEDO WC, SINDEAUX RH, MIRA MT. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. **Clin Dermatol**. 33(1):99-107. 2015.

SAUNDERSON P, GEBRE S, DESTA K, BYASS P, LOCKWOOD DN. The pattern of leprosy-related neuropathy in the AMFES patients in Ethiopia: definitions, incidence, risk factors and outcome. **Lepr Rev**. 71(3):285-308. 2000.

SCHNARE M, BARTON GM, HOLT AC, TAKEDA K, AKIRA S, MEDZHITOV R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nat Immunol** 2:947-50, 2001.

SCHURING RP, HAMANN L, FABER WR, PAHAN D, RICHARDUS JH, SCHUMANN RR, OSKAM L. Polymorphism N248S in the human Toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **J Infect Dis** 199(12):1816-9, 2009.

SCOLLARD DM, SMITH T, BHOOPAT L, THEETRANONT C, RANGDAENG S, MORENS DM. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 62: 559-567, 1994.

SCOLLARD DM, ADAMS LB, GILLIS TP, KRAHENBUHL JL, TRUMAN RW, WILLIAMS DL. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev** 19:338-81, 2006.

SCOLLARD DM, WILLIAMS DL. Nerve injury in leprosy [Internet]: <http://www.uptodate.com>. 2008.

SCOLLARD DM, CHADUVULA MV, MARTINEZ A, FOWLKES N, NATH I, STRYJEWSKA BM, KEARNEY MT, WILLIAMS DL. Increased CXC Ligand 10 Levels and Gene Expression in Type 1 Leprosy Reactions. **Clin Vaccine Immunol**. 18(6): 947–953. doi: 10.1128/CVI.00042-11. 2011.

SEHGAL V. Reactions in leprosy: clinical aspects. **Int J Dermatol** 26:278-86, 1987.

SEHGAL VN, SRIVASTAVA G, SUNDHARAM JÁ. Immunology of reactions in leprosy. **Int J Dermatol** 27:157-62, 1988.

SHARMA N, KORANNE RV, MENDIRATTA V, SHARMA RC. A study of leprosy reactions in a tertiary hospital in Delhi. **J Dermatol** 31:898-903, 2004.

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

SELING PA, ABRAMS JS, YAMAMURA M, SALGAME P, BLOOM BR, REA TH, MODLIN RL. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. **J Immunol** 150: 5501-10, 1993.

SILVA CL, FOSS NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. **Journal of Infectious Diseases** 159: 787-790, 1989.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2009. Casos de AIDS e taxa de incidência (por 100 mil habitantes) notificados ao SINAM em indivíduos maiores de 13 anos, segundo município de residência e anos de diagnóstico, no período de 2005 a 2009, e total acumulado de 1986 a 2009 na cidade de Manaus, Amazonas. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36: 373-82, 2003.

_____. Análise do cluster da taxa de detecção geral de hanseníase no Brasil no triênio 2011-2013. **MS/SVS/CGHDE- Sinan**.

SREENIVASAN P, MISRA R, WILFRED D, NATH I. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. **Immunology** 95:529-36, 1998.

STEFANI MM, GUERRA JG, SOUSA AL, COSTA MB, OLIVEIRA ML, MARTELLI CT, SCOLLARD DM. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infect Dis** 9: 75. 2009.

SURYADEVARA NC, NEELA VS, DEVALRAJU KP, JAIN S, SIVASAI KS, VALLURI VL. et al. Influence of Intron II microsatellite polymorphism in human toll-like receptor 2 gene in leprosy. **Hum Immunol** 74(8):1034–40. Doi:10.1016/j.humimm.2013.04.009. 2013.

TALHARI S, NEVES RG. *Dermatologia Tropical: hanseníase*. Manaus: **Editora Tropical**; 1997.

TALHARI S, GROSSI MAF, DE OLIVEIRA MLWDR, GONTIJO B, TALHARI C, PENNA GO. Hansen's disease: a vanishing disease? **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 107(Suppl. I): 13-16, 2012.

TAYLOR BD, DARVILLE T, FERRELL RE, KAMMERER CM, NESS RB, HAGGERTY CL. Variants in toll-like receptor 1 and 4 genes are associated with *Chlamydia trachomatis* among women with pelvic inflammatory disease. **J Infect Dis** 205:603–9, 2012.

TRAUTMAN JR. Epidemiologic aspects of Hansen's disease. **Bull NY Acad Med** 60: 722-31, 1984.

TROMBONE AP, BELONE A, GUIDELLA C, FACHIN L, RAMUNO N, SORIANI M, URA S, SOARES C, GARLET G, ROSA P. T helper cytokines expression in leprosy forms and reactional states: serum and in situ analysis. **The Journal of Immunology** 188, 59.9. 2012.

TRUMAN RW, SINGH P, SHARMA R, BUSSO P, ROUGEMONT J, PANIZ-MONDOLFI A. et al. Probable zoonotic leprosy in the Southern United States. **N Engl J Med** 364:1626-33, 2011.

VERRECK FA, DE BOER T, LANGENBERG DM, HOEVE MA, KRAMER M, VAISBERG E. et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10 producing type 2 macrophages subvert immunity to mycobacteria. **Proc Natl Acad Sci USA** 101:4560-5, 2004.

WALKER SL, WHITTAM L, VEGA-LOPEZ F, AND LOCKWOOD DN. "Milia complicating successfully treated cutaneous leishmaniasis in three children". **The British Journal of Dermatology**, v. 155, no. 4, pp. 860–861, 2006.

WALKER SL, LOCKWOOD DN. The clinical and immunological features of leprosy. **Br Med Bull** 77:103-21, 2006.

_____. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. **Lepr Rev** 79:372-86, 2008.

WHO. World health organization Leprosy elimination. Chemotherapy of leprosy for control programmes. **World Health Organ Tech Rep Ser**, 675:1-33, 1982.

_____. Epidemiology of leprosy in relation to control. **Report of a WHO Study Group** 716: 1-60. 1985.

_____. Guide to eliminate leprosy as a public health problem. Geneva: **World Health Organization**; 1995.

_____. Weekly epidemiological record. **Genebra** 13:118-124. 2006.

_____. Global leprosy situation, 2010. **Weekly Epidemiological Record** 35: 338-341; 85:337-48. 2010.

_____. Expert Committee on Leprosy. 968:1-61, 2012.

_____. Cluster analysis of the overall detection rate of leprosy in Brazil for the triennium 2011-2013. Global leprosy update, 2013; reducing disease burden. **Weekly Epidemiological Record**, v. 89, 36,389-400. <http://www.who.int/entity/lep/en/>. 2011-2015.

WONG SH, GOCHHAIT S, MALHOTRA D, *et al.* Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. **PLoS Pathog** 6: e 1000979, 2010.

ZAKI HY, LEUNG KH, YIU WC, GASMELSEED N, ELWALI NEM, YIP SP. Common polymorphisms in TLR4 gene associated with susceptibility to pulmonary tuberculosis in the Sudanese. **Int J Tuberc Lung Dis**. 16(7):934-40. Doi:10.5588/ijtld.11.0517. 2012.

ZHANG FR, HUANG W, CHEN SM, *et al.* Genomewide association study of leprosy. **N Engl J Med** 361: 2609-18, 2009.

YAMAMURA M, WANG XH, OHMEN JD, UYEMURA K, REA TH, BLOOM BR, *et al.* Cytokine patterns of immunological mediated tissue damage. **J Immunol** 149: 1470-75, 1992.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doadores do HEMOBA

Anexo I

**AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS – UFBA**

Rua Augusto Viana, s/nº – Canela – CEP 40140.000 – Salvador-BA

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DA BAHIA

Ladeira do HGE, AV. Vasco da Gama, Brotas– Salvador - BA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR DO ESTUDO “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS NA HANSENÍASE”

Investigador Principal: Paulo Roberto Lima Machado, Médico, Ambulatório de Hanseníase, Serviço de Dermatologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – UFBA, Rua João da Botas s/n, Canela, CEP 40.110-160, Salvador-BA

Nome do Paciente: _____

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo conduzido na Universidade Federal da Bahia que tem como objetivo avaliar a associação entre resposta imune e genética com as formas clínicas da hanseníase. Esta participação implica na sua concordância em fornecer uma amostra de seu sangue para fins de comparação com pessoas que desenvolveram a doença.

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início.

Finalidade do estudo:

Este estudo tem a finalidade de avaliar a influência da resposta imune e genética nas formas clínicas da hanseníase e seus estados reacionais.

Procedimentos:

Caso concorde em participar do estudo, você doará 05 mililitros de sangue venoso, que será coletado durante o seu processo de doação de sangue. Deste material, após a sorologia para algumas doenças virais como HIV, HTLV-1, hepatite B e hepatite C serem realizadas, obteremos seu DNA para fins tão somente de pesquisa.

Confidencialidade:

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.



Análise dos Riscos e Benefícios:

A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve e sangramento após retirada da agulha. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados. A biópsia de pele é a retirada de pequeno fragmento da lesão de pele, sendo rotina para o diagnóstico de sua doença. Será feita somente após anestesia local por médico do ambulatório de hanseníase, para evitar desconforto ou dor e poderá deixar uma pequena cicatriz.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:

Este estudo visa avaliar a existência de interação da resposta imunológica e genética com a Hanseníase. O conhecimento preciso dessa interação poderá resultar no desenvolvimento de novas estratégias no controle da doença e principalmente dos episódios reacionais.

Custos:

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Esclarecimentos:

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Paulo Roberto Lima Machado, coordenador do projeto, médico do Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, João das Botas, s/n – Canela, telefone (71) 33396154, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, na pessoa do Dr. Roberto Badaró, no endereço Rua Augusto Viana S/N – Canela, telefone (071) 3283-8140.

Consentimento:

Se você leu o consentimento livre e esclarecido ou este lhe foi explicado e você concorda em participar voluntariamente deste estudo, favor assinar o nome ou colocar sua impressão digital abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário.

Assinatura ou impressão digital do Participante ou Responsável

Assinatura do Pesquisador

Local: _____ Data ____/____/____ Hora: _____

REFERÊNCIAS

1. Stingl, P. 1990. [Leprosy. Pathogenesis--classification--diagnosis--treatment]. *Hautarzt* 41:126-130.



17.05.13

Anexo 2. Modelo do questionário e carta convite - DOADORES HEMOBA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS
AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE
SERVIÇO DE IMUNOLOGIA



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS EM HANSENÍASE FICHA CLÍNICA

I. DOADORES VOLUNTÁRIOS

1. Idade: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

2. Você conhece alguém que tem (ou já teve) a Hanseníase? [Ex.: parente, vizinho]

É contactante? _____

3. Você mora ou já morou em cidade do interior? Qual?

4. Como é sua saúde? () Ótima () Boa () Regular () Ruim

a) Hipertensão?

b) Diabetes?

c) TB?

| | | |
|--|-------------------------------------------------------------|--|
| | ENCAMINHAMENTO PARA GENÉTICA | |
| | SERVIÇO DE IMUNOLOGIA DO COMPLEXO HUPES SIM / HUPES UFBA | |

PREZADO DOADOR DE SANGUE,

AGRADECEMOS A A A A SUA IMPORTANTE COLABORAÇÃO COM O ESTUDO “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS NA HANSENÍASE”.

GOSTARIÁMOS DE ESCLARECER QUE OS RESULTADOS DA ANÁLISE DO SEU DNA NESTE ESTUDO NÃO POSSUEM AINDA NENHUMA APLICAÇÃO CLÍNICA PRÁTICA. OS DADOS OBTIDOS TERÃO VALOR PURAMENTE CIENTÍFICO. POR ESTE MOTIVO, NÃO SERÁ FORNECIDO NENHUM TIPO DE RESULTADO ALÉM DAS SOROLOGIAS VIRAIS, QUE JÁ SÃO REALIZADAS NORMALMENTE PELO HEMOBA.

NO ENTANTO, CASO O SR. OU SRA. POSSUA ALGUM CASO DE HANSENÍASE NA FAMÍLIA, SOLICITAMOS INFORMAR NO MOMENTO DA COLETA, PARA PODERMOS DISPONIBILIZAR UM EXAME DERMATOLÓGICO GRATUITO NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS.

ATENCIOSAMENTE,

PAULO MACHADO – COORDENADOR DO ESTUDO – SERVIÇO DE IMUNOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS

Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes

**AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE****HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS – UFBA**

Rua Augusto Viana, s/n – Canela – CEP 40140.000 – Salvador-BA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR DO ESTUDO “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE”

Investigador Principal: Paulo Roberto Lima Machado, Médico, Ambulatório de Hanseníase, Serviço de Dermatologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – UFBA, Rua João da Botas s/n, Canela, CEP 40.110-160, Salvador-BA.

Nome do Paciente: _____

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar a associação entre resposta imune e genética com as formas clínicas da hanseníase e estados reacionais. Esta participação implica na sua concordância em submeter-se a uma coleta de amostra de sangue e retirada de um fragmento da lesão de pele (biópsia). Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico.

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada.

Finalidade do estudo:

Este estudo têm a finalidade de avaliar a influência da resposta imune nas formas clínicas da hanseníase e estados reacionais.

Procedimentos:

Caso concorde em participar do estudo, você doará 40 mililitros de sangue venoso, que será coletado por profissional capacitado para tal, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. Além disso será feita uma biópsia da lesão de pele após anestesia local, procedimento usado normalmente para o diagnóstico da doença.

Confidencialidade:

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Análise dos Riscos e Benefícios:

A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina e, em casos raros pode provocar dor leve e sangramento após retirada da agulha. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados. A biópsia

de pele é a retirada de pequeno fragmento da lesão de pele, sendo rotina para o diagnóstico de sua doença. Será feita somente após anestesia local por médico do ambulatório de hanseníase, para evitar desconforto ou dor e poderá deixar uma cicatriz.

Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:

Este estudo visa avaliar a existência de interação da resposta imunológica com a Hanseníase. O conhecimento preciso dessa interação poderá resultar no desenvolvimento de novas estratégias no controle da doença e principalmente dos episódios reacionais.

Custos:

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Esclarecimentos:

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dr. Paulo Roberto Lima Machado, coordenador do projeto, médico do Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, João das Botas, s/n – Canela, telefone (71) 33396154, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, na pessoa do Dr. Roberto Badaró, no endereço Rua Augusto Viana S/N – Canela, telefone (071) 3283-8140.

Consentimento:

Se você leu o consentimento livre e esclarecido ou este lhe foi explicado e você concorda em participar voluntariamente deste estudo, favor assinar o nome ou colocar sua impressão digital abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário.

Assinatura ou impressão digital do Participante ou Responsável

Assinatura do Pesquisador

Local: _____ Data ____/____/____ Hora: _____

Anexo 4. Modelo da Ficha clínica e questionário – PACIENTES



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR EDGARD SANTOS
AMBULATÓRIO DE HANSENÍASE
SERVIÇO DE IMUNOLOGIA



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS EM HANSENÍASE

FICHA CLÍNICA

A – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

- 1- INICIAIS – RG HUPES: _____
- 2- DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____
- 3- IDADE: _____ ANOS
- 4- GÊNERO: a. Masculino () b. Feminino ()
- 5- FOTOTIPO (fitzpatrick): a. I () b.II () c.III () d. IV () e.V () f. VI ()
- 6- PROFISSÃO: _____ 7- TELEFONE: _____
- 8- COMUNICANTE COM M.H.: () Sim () Não Quantos? _____

B – DADOS CLÍNICOS

- 1-MÊS E ANO DE DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE: _____
- 2-CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE: a. I () b. TT () c. BT () d. BB () e. BL () f. LL ()
- 3-SURTO REACIONAL: a) Tipo I () b) Tipo II () c) não classificado () d) não ()
- 4-BACILOSCOPIA: a) Negativa () b) Positiva () IB= _____
- 5- AP: _____
- 6-APRESENTA OUTRAS DOENÇAS CRÔNICAS? Sim () Não ()
Quais? _____
- 7-ENCONTRA-SE EM USO DE MEDICAMENTOS? Sim () Não ()
Quais? _____
- 8-COLETA DE SANGUE:
- a) Data ____/____/____ PQT: () Sim () Não SR1 () SR2 () sem SR () Pred () Talid () ImSup ()
- b) Data ____/____/____ PQT: () Sim () Não SR1 () SR2 () sem SR () Pred () Talid () ImSup ()
- c) Data ____/____/____ PQT: () Sim () Não SR1 () SR2 () sem SR () Pred () Talid () ImSup ()
- 9- PQT: () MB () PB DATA INÍCIO: ____/____/____ DATA ALTA: ____/____/____

RESPONSÁVEL PELA AVALIAÇÃO: _____

DATA: ____/____/____

II. ESCOLARIDADE:

0: sem escolaridade 1: I grau incompleto
 2: I grau completo 3: II grau incompleto
 4: II grau completo 5: III grau incompleto
 6: III grau completo

II. EPIDEMIOLOGIA

Município de Nascimento: _____ UF |____|

Residiu em outros municípios por período igual ou superior a 6 meses? 0: não 1: sim

Quais? Município |_____| UF |____|

Município |_____| UF |____|

Município |_____| UF |____|

Tempo de moradia no endereço atual:

1. Menos de 6 meses 3. 1 a 2 anos

2. 6 meses a 1 ano 4. 2 a 5 anos 5. Mais de 5anos

Total Renda familiar:

0. Sem renda 1. Até 1 salário mínimo (SM)

2. 1 a 2 SM 3. 2 a 3 SM 4. 3 a 4 SM 5. Mais de 4 SM

III. ANTECEDENTES PESSOAIS:

Tuberculose 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação. Idade |__|

Diabetes 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação

HAS 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação

Alergia 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação

Outros|_____|

Internamentos 0: não 1: sim 99: não sabe / sem informação

Causa (s) |_____|

IV. ANTECEDENTES FAMILIARES:

Hanseníase na família 0: não 1: sim 99: não sabe |____| Número de casos

Hanseníase na residência|____| 0: não 1: sim 99: não sabe |____| Número de casos

Parentesco com o (s) caso (s) de HANSEN 1: seu pai 2: sua mãe 3: seu filho (a)

4: seu esposo (a) 5: outros, especificar: |_____|

V. CLASSIFICAÇÃO FINAL PARA ESTE ESTUDO

CASO CONTROLE REAVALIAR APÓS 6M

Anexo 5. Características clínicas da amostra da sorologia

Tabela. Características da amostra da sorologia

| A- Características da amostra | | |
|---------------------------------------------------------------------|--------------|----------|
| | N indivíduos | |
| Casos | 52 | |
| Controles | 30 | |
| B- Características clínicas da coorte de casos | | |
| Pacientes com Reação Reversa (RR) - Fenótipo clínico | | <i>n</i> |
| Tuberculóide (TT) | (PB*) | 4 |
| Borderline tuberculóide (BT) | (PB) | 6 |
| Borderline tuberculóide (BT) | (MB*) | 1 |
| Borderline borderline (BB) | (MB) | 5 |
| Borderline lepromatoso (BL) | (MB) | 5 |
| Lepromatoso (LL) | (MB) | 1 |
| #Total | | 22 |
| C - Pacientes com Eritema Nodoso Hansênico (ENH) - Fenótipo clínico | | |
| Borderline lepromatoso (BL) | (MB) | 3 |
| Lepromatoso (LL) | (MB) | 10 |
| Total# | | 13 |
| D - Pacientes Sem Reação (SR) -Fenótipo clínico | | |
| Tuberculóide (TT) | (PB) | 4 |
| Borderline borderline (BB) | (MB) | 1 |
| Lepromatoso (LL) | (MB) | 6 |
| Hanseníase indeterminada (I) | (PB) | 6 |
| #Total | | 17 |

*PB, Paucibacilar; *MB, Multibacilar