



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



JAMILE LEÃO RÊGO

**GENES DE RESPOSTA IMUNE NO DESENVOLVIMENTO DE
EPISÓDIOS REACIONAIS NA HANSENÍASE**

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2018

I. RESUMO

TÍTULO: GENES DE RESPOSTA IMUNE NO DESENVOLVIMENTO DE EPISÓDIOS REACIONAIS NA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, sendo influenciada por fatores genéticos e ambientais. Essa infecção possui um vasto espectro clínico e imunológico podendo causar aos pacientes grandes morbidades, o que tem um alto impacto na saúde pública. **OBJETIVOS:** avaliar se marcadores nos genes *IL-6*, *NOD2*, *CCL2* e *LTA4H* estão associados ao desenvolvimento de reações hansênicas; Avaliar os padrões de expressão de genes relacionados à resposta imune e sua associação com o desenvolvimento de episódios reacionais; Identificar possíveis biomarcadores sorológicos para reações hansênicas comparando a produção de citocinas e quimiocinas no soro de pacientes com e sem reações. **MÉTODOS:** Para a genotipagem de SNPs foram utilizados ensaios Taqman® pré-desenhados para os genes *CCL2* (rs2857656, rs1024611, rs4795893), *IL6*(rs2069845), *NOD2*(rs751271) e *LTA4H*(rs1752549) em 432 pacientes sendo 163 pacientes sem reação (SR), 134 com reação reversa (RR), e 127 com eritema nodoso leproso (ENL) e 8 com RR e ENL; a genotipagem dos marcadores foi realizada pelo ViiA™ 7 *Real-Time PCR System*. Para o estudo da expressão gênica foi realizado o PCR em tempo real no sistema BioMark® (Fluidigm, EUA), utilizando um painel de 94 genes para análise simultânea de cDNA de 151 amostras de pacientes divididas em três grupos: 57 sem reação (SR), 50 RR e 44 ENL. O sistema permitiu identificar genes diferencialmente expressos obtidos a partir de leucócitos totais. A dosagem de proteínas séricas foi feita pela técnica ELISA sanduíche em 69 pacientes com hanseníase sendo 24 indivíduos SR; 23 RR e 22 ENL. Os dados foram analisados pelos testes de Mann-Whitney, utilizando o programa GraphPadPrism, e o Ambiente R. **RESULTADOS:** Dados da genotipagem mostraram associações entre os marcadores genéticos do gene *CCL2* (rs2857656, rs1024611) quando comparados grupos RR versus SR ($p < 0,05$); Dez genes de resposta imune foram significativamente associados quando comparados pacientes SR versus pacientes reacionais (ENL e RR) - *CCL2*, *PARK*, *ALOX5*, *TLR7*, *LRRK2*, *IFNB*, *TLR10*, *IL18*, *TLR3*, *CLEC5A*, $p < 0,05$. Este mesmo perfil de expressão se replicou nas comparações entre os grupos RR versus paucibacilares e RR versus SR, acrescido de outros genes como o *OAS1*($p < 0,05$) que se mostrou específico nas comparações envolvendo o grupo RR. Apenas o gene *PARK* foi associado significativamente na comparação entre pacientes com ENL versus SR ($p < 0,05$); Na análise sorológica, a concentração de IL-8 foi maior nos pacientes com reação hansênica e também quando divididos em ENL e RR quando comparados ao grupo sem reação. **CONCLUSÃO:** Nossos estudos investigando marcadores no DNA e no RNA evidenciam que o gene *CCL2* pode estar implicado com o desenvolvimento de RR; este tipo de reação também possui um perfil caracterizado pela maior expressão de genes inflamatórios. No estudo imunológico, demonstramos IL-8 como um marcador no soro para reações hansênicas.

Palavras-chave: 1. Hanseníase; 2. Reações hansênicas; 3. Polimorfismos; 4. Expressão Gênica; 5. Sorologia.

XI. SUMMARY

TITLE: IMMUNE RESPONSE GENES IN THE DEVELOPMENT OF LEPROSY REACTIONS

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, being influenced by genetic and environmental factors. This infection has a wide clinical and immunological spectrum and might cause to patients great morbidities, which has a high impact on public health. **OBJECTIVES:** To evaluate whether markers in *IL-6*, *NOD2*, *CCL2* and *LTA4H* genes are associated with the development of leprosy reactions; To evaluate the expression patterns of genes related to the immune response and their association with the development of reactional episodes; To identify possible serological biomarkers for leprosy reactions by comparing the production of cytokines and chemokines in the serum of patients with and without reactions. **METHODS:** Taqman® assays pre-designed for *CCL2* (rs2857656, rs1024611, rs4795893), *IL6* (rs2069845), *NOD2* (rs751271), and *LTA4H* (rs1752549) genes were genotyped in 432 patients, being 163 patients without a reactions (SR), 134 with type 1 reactions (RR), 127 with type 2 reactions (ENL) and 8 with both (RR and ENL) reactions using the ViiA™ 7 Real-Time PCR System and analysis performed by logistic regression as implemented by R. For the gene expression study, q PCR was performed using the BioMark® system (Fluidigm, USA), with a panel of 94 genes for simultaneous cDNA analysis of 151 patient samples divided into three groups: 57 SR, 50 RR and 44 ENL. The system allowed the identification of differentially expressed genes obtained from total leukocytes. Serum protein dosage was performed by the ELISA sandwich technique in 69 patients with leprosy: 24 SR; 23 RR and 22 ENL. Data were analyzed by the Mann-Whitney tests, using the GraphPadPrism, and R-Link programs. **RESULTS:** Data from genotyping showed associations between genetic markers at the *CCL2* gene (rs2857656, rs1024611) by comparing RR versus SR groups ($p < 0.05$); Ten immune response genes were differentially expressed in the comparison between unreactive versus reactive patients (ENL and RR) - *CCL2*, *PARK*, *ALOX5*, *TLR7*, *LRRK2*, *IFNB*, *TLR10*, *IL18*, *TLR3*, *CLEC5A*, $p < 0.05$. The same expression profile was replicated in the comparisons between the RR versus paucibacillary and RR versus SR groups, adding genes such as *OAS1* ($p < 0.05$), specific for comparisons involving the RR group. Only the *PARK* gene was significantly associated in the comparison between ENL versus SR patients ($p < 0.05$); In the serological analysis, the concentration of IL-8 was higher among reactive patients, either pooled together or when stratified in ENL and RR compared to the SR group. **CONCLUSION:** The *CCL2* gene might be implicated in the development of leprosy reactions, mainly directed to the reverse reaction profile. We also showed a signature of innate immune response genes and RR as well IL-8 as a serum marker for leprosy reaction *per se*.

Keywords: 1. Leprosy; 2. Leprosy Reactions; 3. Polymorphisms; 4. Gene Expression; 5. Serology.

Tabela 3 - Características clínico-epidemiológicas da amostra estudada

	Pacientes com hanseníase*				
	Sem reação - Controles (N=163)	Reação hansênica - Casos (N=269)	Reação Tipo 1 ** (N=134)	Reação Tipo 2 ** (N=127)	Reação Tipo 1 e 2 *** (N=8)
Idade (média ± SD)	43,82 (±14,59)	44,20 (±13,50)	47,45 (±13,40)	41,05 (±12,97)	39,62 (±9,63)
Sexo: total (freq.)					
Feminino	88 (54)	98 (36,4)	63 (47)	32 (25)	
Masculino	75 (46)	171 (63,6)	71 (53)	95 (75)	
Fenótipo clínico					
TT	52 (31,9)	4 (1,5)	4 (3)	-	-
BT	31 (19)	53 (19,7)	53 (39,6)	-	-
BB	15 (9,2)	46 (17,1)	39 (29,1)	5 (3,7)	2 (1,5)
BL	6 (3,7)	44 (16,4)	20 (14,9)	23 (17,2)	1 (0,7)
LL	20 (12,3)	119 (44,2)	15 (11,2)	99 (73,9)	5 (3,7)
I	30 (18,4)	-	-	-	-
Outros (Neural)	9 (5,5)	3 (1,1)	3 (2,2)	-	-
Total	163 (37,7)	269 (62,3)			
Índice Baciloscópico Inicial (N=366)					
Escala logarítmica entre 0 e 6+ (n.)	0,5 (140)	1,96(224)	0,75(115)	3,3 (105)	1,2(6)

*Os resultados são mostrados como contagens totais (frequência), exceto para a idade. ** Foram excluídos pacientes com ambas as reações tipo 1 e tipo 2. SD = desvio padrão.

I, Indeterminado; BT, tuberculóide *borderline*; BB, *borderline borderline*; BL, *borderline* lepromatosa; LL, hanseníase lepromatosa; RR, Reação Reversa; ENL, Eritema Nodoso Leproso.

*** participaram apenas na análise geral de Reação hansênica – Casos.

Tabela 4 - Análise de regressão logística dos polimorfismos no gene *CCL2*

		Sem Reação x Reação				Sem Reação x RR				Sem Reação x ENL			
<i>CCL2</i>		N. Frequência				N. Frequência				N. Frequência			
<i>rs2857656</i>	SR n=156	REAC n=255	OR ^a [95% CI]	P	SR n=156	RR n=127	OR ^a [95% CI]	P	SR n=156	ENL n=120	OR ^a [95% CI]	P	
GG	46 (29,5)	101 (39,6)	-Referência-		46 (29,5)	58 (45,7)	-Referência-		46 (29,5)	41 (34,2)	-Referência-		
CG	84 (53,9)	116 (45,5)	0,66 (0,42-1,03)	0,16	84 (53,9)	50 (39,4)	0,47 (0,27-0,79)	0,016	84 (53,9)	61 (50,8)	0,85 (0,48-1,50)	0,6	
CC	26 (16,7)	38 (14,9)	0,67 (0,36-1,24)		26 (16,7)	19 (15)	0,56 (0,28-1,15)		26 (16,7)	18 (15)	0,67 (0,31-1,46)		
Alelo C	110(70,5)	154 (60,4)	0,66 (0,43-1,01)	0,056	110(70,5)	69 (54,3)	0,49 (0,30-0,81)	0,005	110(70,5)	79 (65,8)	0,81 (0,47-1,38)	0,43	
<i>rs4795893</i>	SR n=146	REAC n=255	OR ^a [95% CI]	P	SR n=146	RR n=120	OR ^a [95% CI]	P	SR n=146	ENL n=127	OR ^a [95% CI]	P	
AA	38 (26)	69 (27,1)	-Referência-		38 (26)	32(26,7)	-Referência-		38 (26)	36(28,3)	-Referência-		
AG	82 (56,2)	141 (55,3)	0,92 (0,57-1,50)	0,94	82 (56,2)	66(55,0)	0,81 (0,46-1,43)	0,77	82 (56,2)	68(53,5)	1,01 (0,55-1,84)	0,96	
GG	26 (17,8)	45 (17,6)	0,92 (0,49-1,74)		26 (17,8)	22(18,3)	0,90 (0,43-1,87)		26 (17,8)	23(18,1)	1,11 (0,51-2,41)		
Alelo G	108 (74)	186 (72,9)	0,92 (0,58-1,47)	0,74	108 (74)	91 (71,7)	0,83 (0,49-1,44)	0,51	108 (74)	88 (73,3)	1,03 (0,58-1,84)	0,91	
<i>rs1024611</i>	SR n=163	REAC n=269	OR ^a [95% CI]	P	SR n=163	RR n=134	OR ^a [95% CI]	P	SR n=163	ENL n=127	OR ^a [95% CI]	P	
AA	71 (43,6)	140 (52)	-Referência-		71 (43,6)	77 (57,5)	-Referência-		71 (43,6)	58 (45,7)	-Referência-		
AG	78 (47,9)	115 (42,8)	0,77 (0,51-1,16)	0,15	78 (47,9)	53 (39,5)	0,65 (0,40-1,04)	0,038	78 (47,9)	59 (46,5)	0,93 (0,56-1,54)	0,74	
GG	14 (8,6)	14 (5,2)	0,48 (0,21-1,08)		14 (8,6)	4 (3)	0,30 (0,09-0,96)		14 (8,6)	10 (7,9)	0,70 (0,28-1,76)		
Alelo G	92 (56,4)	129 (48)	0,72 (0,48-1,08)	0,11	92 (56,4)	57 (42,5)	0,60 (0,37-0,95)	0,03	92 (56,4)	69 (54,3)	0,89 (0,54-1,45)	0,64	

*CI: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio. ^aAjustado por sexo e idade; Controle: Sem Reação; P: P valor.

Tabela 5 - Análise de haplótipos entre os SNPs rs2857656 e rs1024611 do Gene *CCL2* sobre risco de RR.

Haplótipos	rs2857656		rs1024611		Frequências		OR ^a (95 IC)	P-valor
	rs2857656	rs1024611	Controles	Casos				
Hap.Ref	G	A	0,55	0,65	1,00	-		
Hap.1	C	A	0,12	0,12	0,82 (0,47-1,43)	0,49		
Hap.2	G	G	0,01	0,008	0,46 (0,08-2,67)	0,39		
Hap.3	C	G	0,31	0,22	0,60 (0,40 – 0,89)	0,013		

- Hap, haplótipo; Hap Ref, alelo de referência, OR, odds ratio; ^aAjustado por sexo e idade; IC, intervalo de confiança.

Tabela 6 - Análise de regressão logística do Polimorfismo rs2069845 no gene *IL6*

		Sem Reação x Reação				Sem Reação x RR				Sem Reação x ENL			
<i>IL6</i>		N. Frequência				N. Frequência				N. Frequência			
<i>rs2069845</i>	SR n=156	REAC n=257	OR ^a [95% CI]	P	SR n=156	RR n=128	OR ^a [95% CI]	P	SR n=156	ENL n=121	OR ^a [95% CI]	P	
AA	76 (48,7)	106 (41,2)	-Referência-		76 (48,7)	57 (44,5)	-Referência-		76 (48,7)	44 (36,4)	-Referência-		
AG	66 (42,3)	117 (45,5)	1,22(0,79-1,87)	0,21	66 (42,3)	53 (41,4)	1,03 (0,62-1,70)	0,46	66 (42,3)	61 (50,4)	1,54(0,90-2,63)	0,07	
GG	14 (9)	34 (13,2)	1,82(0,90-3,67)		14 (9)	18 (14,1)	1,63 (0,74-3,60)		14 (9)	16 (13,2)	2,50(1,06-5,90)		
Alelo G	80 (51,3)	151 (58,8)	1,32(0,88-1,98)	0,18	80 (51,3)	71 (55,5)	1,13 (0,70-1,82)	0,61	80 (51,3)	77 (63,6)	1,69(1,01-2,81)	0,04	

*CI: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio; ^aAjustado por sexo e idade; P: P valor.

Tabela 7- Análise de regressão logística dos polimorfismos nos genes *NOD2* e *LTA4H*

	Sem Reação x Reação				Sem Reação x RR				Sem Reação x ENL			
	N. Frequência		OR ^a [95% CI]	P	N. Frequência		OR ^a [95% CI]	P	N. Frequência		OR ^a [95% CI]	P
<i>NOD2</i>	SR n=158	REAC n=256			SR n=158	RR n=127			SR n=158	ENL n=121		
rs751271												
GG	68 (43)	92 (35,9)	-Referência-		68 (43)	44 (34,6)	-Referência-		68 (43)	43 (35,5)	-Referência-	
CG	76 (48,1)	134 (52,3)	1,27 (0,82-1,94)	0,49	76 (48,1)	73 (57,5)	1,58 (0,95-2,62)	0,20	76 (48,1)	58 (47,9)	1,05 (0,61-1,80)	0,3
CC	14 (8,9)	30 (11,7)	1,37 (0,67-2,83)		14 (8,9)	10 (7,9)	1,16 (0,47-2,91)		14 (8,9)	20 (16,5)	1,86 (0,82-4,20)	
Alelo C	90 (57)	164 (64,1)	1,28 (0,85-1,94)	0,24	90 (57)	83 (65,3)	1,51 (0,92-2,48)	0,09	90 (57)	78 (64,5)	0,73(0,45-1,19)	0,53
<i>LTA4H</i>	SR n=156	REAC n=257			SR n=156	RR n=127			SR n=156	ENL n=121		
rs4795893												
AA	130 (84,4)	210 (82,3)	-Referência-		130 (84,4)	109(85,8)	-Referência-		130 (84,4)	95 (78,5)	-Referência-	
AG	23 (14,9)	42 (16,5)	1,11 (0,63-1,95)	0,71	23 (14,9)	18(14,2)	0,94 (0,48-1,85)	0,61	23 (14,9)	23(19)	1,30 (0,67-2,56)	0,14
GG	1 (0,6)	3 (1,2)	2,33 (0,23-23,15)		1 (1)	0(0)	0,00 (0,00-NA)		1 (0)	3(2,5)	8,04 (0,75-85,88)	
Alelo G	24 (15,6)	45 (17,6)	1,16 (0,67-2,01)	0,61	24 (15,6)	18(14,2)	0,90 (0,46-1,77)	0,77	24 (15,6)	26 (21,5)	1,50 (0,78-2,87)	0,22

*CI: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio. ^aAjustado por sexo e idade; P: P valor.

Tabela 8 - Gene Risk Score nos polimorfismos *CCL2* rs2857656 e *IL6* rs2069845 vs RR

Alelos de risco (n)	Frequências		OR (95% IC) ^a	P-valor
	Controles	Casos RR		
0 (Ref.)	14 (21,5)	8 (22,2)	1,00	-
1	51 (78,5)	28 (77,8)	0,89 (0,32-2,43)	0,82
2	55 (79,7)	54 (87,1)	1,82 (0,69-4,78)	0,22
3	26 (65)	29 (78,4)	2,04 (0,72-5,79)	0,18
4	6 (30)	8 (50)	2,51 (0,62-10,23)	0,19

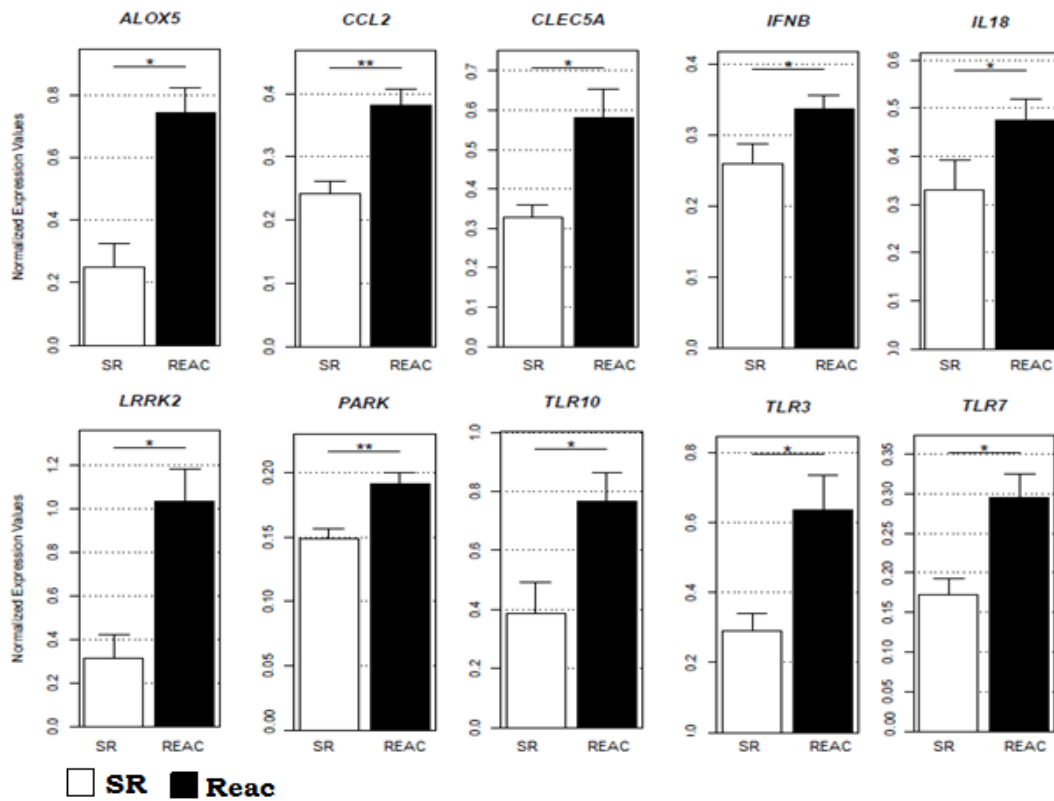
- Ref, apenas alelo de referência; IC: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio. ^aAjustado por sexo e idade.

Tabela 9 - Valores de expressão gênica normalizados de amostras de leucócitos de sangue total em pacientes reacionais (n = 94) e não reacionais (n = 57).

Grupos	Gene	logFC *	p.value	Grupos	Gene	logFC *	p.value
Reac x SR	<i>CCL2</i>	4,04	0,0016	RR x PB	<i>CCL2</i>	4,07	0,0008
	<i>PARK</i>	3,27	0,0036		<i>PARK</i>	3,67	0,0012
	<i>ALOX5</i>	2,99	0,0108		<i>TLR7</i>	4,23	0,0022
	<i>TLR7</i>	2,98	0,011		<i>ALOX5</i>	3,66	0,0053
	<i>LRRK2</i>	3,09	0,0161		<i>LRRK2</i>	3,28	0,0056
	<i>IFNB</i>	2,36	0,0228		<i>TLR3</i>	3,04	0,0122
	<i>TLR10</i>	3,07	0,0236		<i>IL18</i>	2,52	0,0198
	<i>IL18</i>	2,34	0,0326		<i>IRF7</i>	2,51	0,0244
	<i>TLR3</i>	2,74	0,0338		<i>IL22RA1</i>	2,36	0,0262
	<i>CLEC5A</i>	2,81	0,0446		<i>IFNB</i>	2,24	0,028
RR x SR	<i>CCL2</i>	4,31	0,0002	<i>IRF9</i>	2,59	0,0362	
	<i>TLR7</i>	3,81	0,0012	<i>OAS1</i>	2,51	0,0376	
	<i>PARK</i>	3,16	0,002	<i>SOCS3</i>	2,27	0,0384	
	<i>ALOX5</i>	3,32	0,0044	<i>TLR10</i>	2,65	0,0386	
	<i>LRRK2</i>	3,28	0,0056	<i>IL23A</i>	2,12	0,0456	
	<i>IFNB</i>	2,64	0,0104	ENL x RR	<i>TLR7</i>	-2,72	0,0214
	<i>TLR10</i>	3,08	0,0122	MB x ENL	<i>TNFSF15</i>	3,1	0,0148
	<i>TLR3</i>	3,04	0,0122	SR x ENL	<i>PARK</i>	2,13	0,0436
	<i>IL18</i>	2,65	0,014				
	<i>OAS1</i>	2,51	0,0376				
<i>IL15</i>	2,42	0,0446					

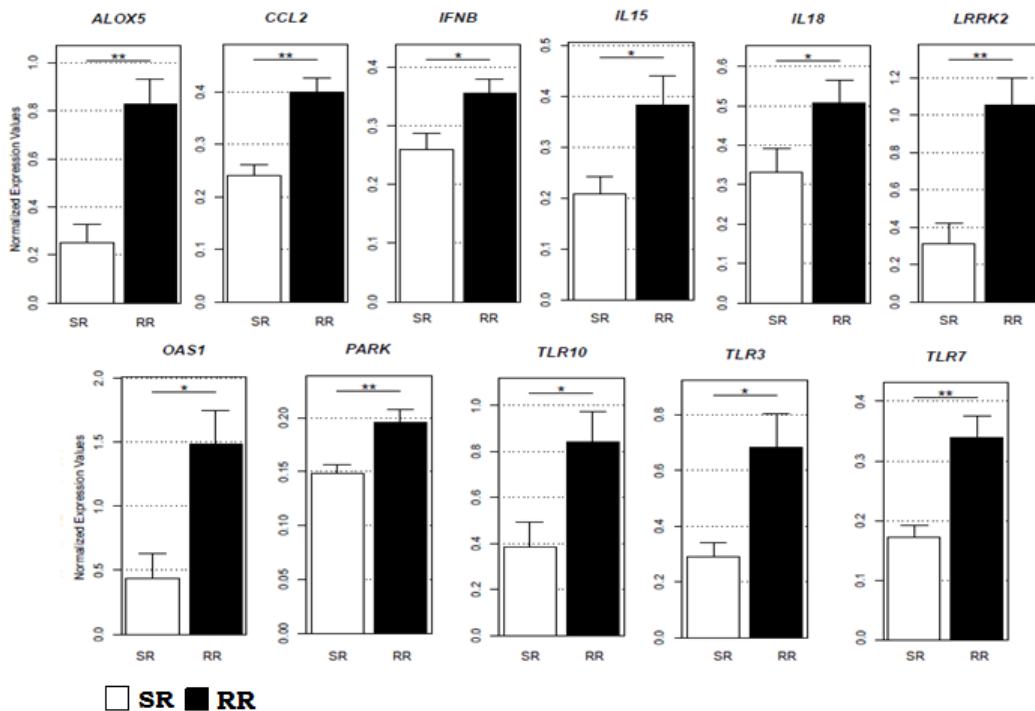
*logFC = log fold change : Corresponde a uma medida direta de quantas vezes um gene é mais ou menos expresso entre grupos ou condições distintas. - Reac: Pacientes reacionais; SR: pacientes sem reação; RR: pacientes com reação reversa; PB: pacientes paucibacilares e sem reação hansênica; ENL: Eritema Nodoso Leproso; MB: pacientes multibacilares e sem reação hansênica.

Figura 13 - Expressão gênica normalizada dos genes associada ao grupo SR x REAC.



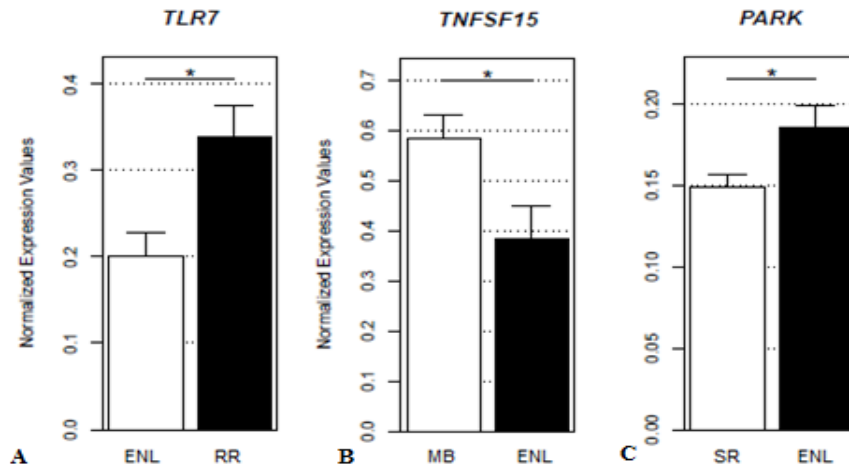
- Valores de expressão normalizados dos genes selecionados para uma análise em células de leucócitos totais de sangue periférico por q-PCR a partir da lista de genes relacionados com a Resposta Imune. Análise realizada com os grupos de pacientes sem reação – SR e pacientes reacionais - REAC.

Figura 14 - Expressão gênica normalizada dos genes associada ao grupo SR x RR.



-Valores de expressão normalizados dos genes selecionados para uma análise em células de leucócitos totais de sangue periférico por q-PCR a partir da lista de genes relacionados com a Resposta Imune. Análise realizada com os grupos de pacientes sem reação – SR e pacientes com reação tipo I (RR).

Figura 16 - Expressão gênica normalizada dos genes associada aos grupos ENL x RR, MB x ENL e SR x ENL.



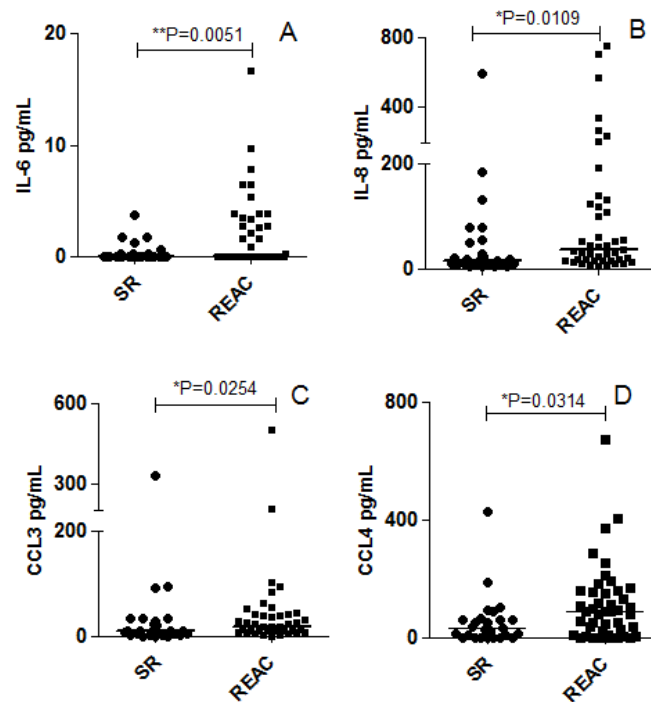
- Valores de expressão normalizados dos genes selecionados para uma análise em células de leucócitos totais de sangue periférico por q-PCR a partir da lista de genes relacionados com a Resposta Imune. Análise realizada com os grupos de pacientes com reação tipo II (ENL) comparados com: o grupo de pacientes com reação RR (A); o grupo de pacientes com a forma multibacilar MB (B) e com o grupo de pacientes sem reação, SR (C).

Tabela 10 - Comparação das concentrações séricas em pg/mL de citocinas e quimiocinas entre os grupos de pacientes não reacionais (n = 24) e reacionais (n = 45).

Citocinas / Quimiocinas (séricas)					Reac x NR	ENL x NR	RR x NR
Média (SD)	NR	Reac	ENL	RR	p valor	p valor	p valor
IL-6	0.35(±0.83)	2.7(±5.95)	4.17(±7.99)	1.28(±2.01)	0.0051	0.0359	0.2675
IL1-β	4.48(±12.64)	1.08(±2.75)	0.51(±1.39)	1.62(±3.49)	0.5328	0.2175	0.9423
IL-12p40	10.33(±16.5)	36.78(±58.91)	48.86(±78.14)	27.25(±29.88)	0.1605	0.3024	0.1813
IL-17	13.93(±49.71)	17.29(±67.19)	4.17(±13.75)	29.85(±91.27)	0.9068	0.4752	0.671
TNF	3.22(±5.57)	2.3(±1.95)	2.22(±2.11)	2.37(±1.78)	0.5347	0.967	0.2748
IL-10	3.23(±3.56)	11.61(±34.24)	18.19(±47.52)	5.32(±7.22)	0.1473	0.0409	0.6609
IFN-γ	9.17(±9.26)	19.73(±19.08)	13.3(±16.62)	14.14(±21.15)	0.5376	0.649	0.5597
IL-8	54.91(±120.34)	105.36(±170.82)	136.16(±206.63)	75.89(±120.32)	0.0109	0.0268	0.0348
CXCL-9	1306.11(±1932.57)	1157.77(±1300.98)	1336.98(±1473.75)	986.35(±1083.46)	0.3579	0.4117	0.4575
CXCL-10	767.61(±778.52)	908.88(±737)	981.63(±771.73)	839.29(±695.09)	0.1296	0.139	0.2705
CCL3	30.42(±66.8)	39.18(±78.67)	53.31(±102.52)	25.66(±40.98)	0.0254	0.0116	0.4149
CCL4	55.55(±89.18)	108.48(±128.38)	108.18(±151.46)	109.72(±101.47)	0.0314	0.0854	0.0525
CCL2	199.4(±144.73)	290.65(±307.33)	277.47(±248.41)	303.25(±354.19)	0.3672	0.4075	0.4829

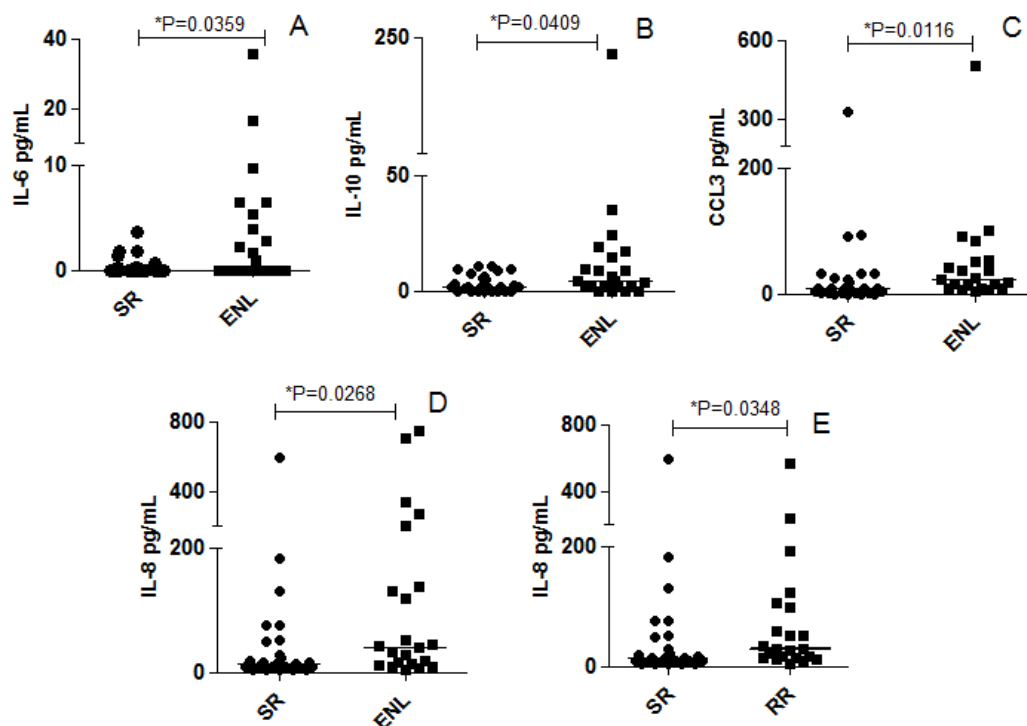
- A tabela mostra os resultados representativos de comparações entre os grupos de pacientes com Eritema Nodoso Leproso (ENL*) (N=22), Reação Reversa (RR*) (N=23) e paciente Sem Reação (SR*) (N=24). Reac.; reacionais. SD: Desvio padrão. A dosagem da concentração das moléculas do soro foi realizada por técnica de ELISA sanduíche. Os valores em negrito denotam os resultados estatisticamente significativos, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001; Teste de Mann-Whitney.

Figura 17 (A, B, C e D) - Análise no soro por ELISA comparando pacientes sem reação (SR) vs pacientes reacionais REAC (RR + ENL).



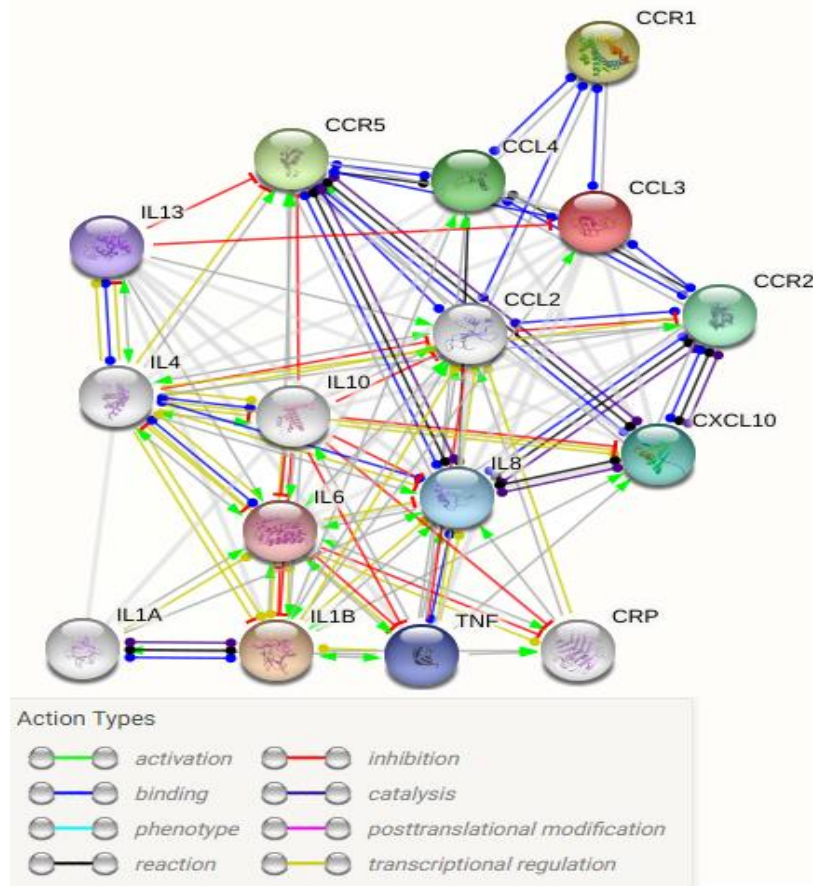
- Análise em soro por ELISA Sanduíche a partir de moléculas relacionadas com a Resposta Imune. As figuras sinalizam a produção significativa dos seguintes grupos: (A) IL-6 ($p = 0,0051$), (B) IL-8 ($p = 0,0109$), (C) CCL3 ($p = 0,0254$) e (D) CCL4 ($p = 0,0314$) do grupo de pacientes sem reação (SR) *versus* pacientes reacionais (RR + ENL). Valores estatísticos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Teste de Mann-Whitney.

Figura 18 (A, B, C, D e E) - Análise no soro por ELISA, comparando pacientes sem reação (SR) vs ENL e SR vs RR.



- Os resultados mostram produção sérica significativa de IL-6 ($p = 0,0359$), IL-10 ($p = 0,0409$), CCL3 ($p = 0,0116$) e IL-8 ($p = 0,0268$) entre SR vs pacientes com ENL e produção de IL-8 ($p = 0,0348$) em pacientes com SR vs RR. Valores estatísticos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Teste de Mann-Whitney.

Figura 19 - Mapa de interação proteica envolvendo o *CCL2* (nível de confiança $> 0,9$).



Fonte: (STRING, 2018) Análise de rede realizada utilizando o programa STRING. As bordas representam associações proteína-proteína. Partindo do gene *CCL2*, a imagem informa diferentes genes de citocinas e quimiocinas que interagem de forma hipotética, por meio de diferentes vias. Desta imagem, genes como *CCL4*, *CXCL10*, *IL1 β* , *IL10*, *IL1 α* , *IL13* e *TNF* participaram do nosso painel de expressão gênica e do estudo de marcadores sorológicos.