



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



JAMILE LEÃO RÊGO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS GENES PARK2 E PACRG NA
HANSENÍASE EM UMA POPULAÇÃO DO ESTADO DA
BAHIA**

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2014

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

R343 Rêgo, Jamile Leão

Avaliação do papel dos genes PARK2 e PACRG na hanseníase em uma população do estado da Bahia / Jamile Leão Rêgo. – Salvador, 2014.

117 f.

Orientadora: Prof^a Dr^a Léa Cristina Castellucci.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina, 2014.

1. Genes. 2. Polimorfismo. 3. Hanseníase. 4. Associação. 5. PARK2. 6. PACRG.

I. Castellucci, Léa Cristina. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU 616-002.73



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



JAMILE LEÃO RÊGO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS GENES PARK2 E PACRG NA
HANSENÍASE EM UMA POPULAÇÃO DO ESTADO DA
BAHIA**

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.

Professor-orientador: Léa Cristina Castellucci

Salvador (Bahia), 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- 1) *Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus* – Pós-doutora em Parasitologia molecular pela Universidade de Rockefeller (USA). Professora de Medicina Interna Universidade Federal de Sergipe, pesquisadora 1C do CNPq. Atua em pesquisa na área de Imunologia, com ênfase em Imunopatogênese e Imunogenética de doenças infecciosas.
- 2) *Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira* - Pós-doutora em Ciências Biológicas (com ênfase em Biologia Genética) pela Universidade de São Paulo. Ex Professora titular da Universidade Estadual de Feira de Santana e Professor Pleno e pela Universidade Federal da Bahia como Professor Adjunto IV.
- 3) *Dra. Songeli Menezes Freire* - Professora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia, do Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do ICS e do Curso de Doutorado da RENORBIO. Professora adjunta de Biossegurança e de Bioética na UFBA.

Membro Suplente:

- 4) *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 do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

...um dia você aprende que o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.

[...]

Aprende que há bem mais dos seus pais em você, do que você supunha.

[...]

Aprende que realmente a vida tem valor, e que você tem muito valor diante da vida!

[...]

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe, justamente depois de pensar que não poderia mais.

William Shakespeare

*Este trabalho é dedicado a Deus,
pois sem Ele nada podemos fazer.*

A Ele toda Honra e Glória.

*Aos meus pais, Pedro e Laura, por serem colunas fortes
que me sustentam nas horas mais difíceis com suas
orações e fé inabalável. Que temos amor
incondicionais recíprocos.*

*As minhas irmãs e sobrinhos Jaciene, Jáfia,
João Victor e Anna Liz com quem pude partilhar meus
momentos de angústia e de conquistas.*

*André Amorim, pelo amor, apoio e compreensão
durante mais essa etapa da minha vida.*

*E às pessoas que sempre estiveram ao meu lado me
acompanhando, apoiando e principalmente
acreditando em mim.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Léa Castellucci, orientadora, educadora, pesquisadora, amiga pela inestimável atenção. Por acreditar nesse projeto desde o início, pela paciência e respeito durante as orientações e pelo crescimento que me proporcionou durante esse período. Meus mais sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Dr. Paulo Machado

Pesquisador responsável, Médico Dermatologista, pelas riquíssimas contribuições e apoio valioso, os quais foram fundamentais para a consecução deste trabalho.

Ao Prof. Edgar Marcelino de Carvalho

Chefe do Serviço de Imunologia (SIM), pela oportunidade oferecida para a realização desse trabalho e pela disponibilidade em atividades desenvolvidas no seu laboratório.

Ao laboratório de Bioquímica da UFRN

Em especial à Dra. Selma Jerônimo, ao Dr. Sérgio Araújo e Amanda Albuquerque pelo apoio e ajuda que tornaram viável a realização das genotipagens, ponto importante neste trabalho.

A Natália Carvalho

Colega do serviço de Imunologia pela valiosa ajuda na padronização e análise dos trabalhos de expressão gênica.

Aos colegas e companheiros do grupo da Genética

De maneira especial Joyce Oliveira, Nadja Santana, Lucas Almeida e as estudantes de iniciação científica Thais Lamago e Thailamar Viana pelas importantes sugestões e ajuda que muito acrescentaram a essa pesquisa.

A toda equipe do Ambulatório Magalhães Neto e Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes

Em especial a Dra. Mayume Shibuya, Dra. Lídia Machado, equipe de médicos, residentes, farmacêuticos, enfermeiros, fisioterapeutas e técnicos do ambulatório de Dermatologia.

Ao grupo de pesquisa do SIM – Serviço de Imunologia do HUPES.

Pelo suporte que viabilizou a minha participação neste curso.

Aos colegas e professores do mestrado

Por tudo o que com eles aprendi e por partilharem a construção do meu estudo.

Aos pacientes, objetivo maior de toda atividade científica, por colaborarem de forma tão generosa com a nossa pesquisa.

À Universidade Federal da Bahia, a todos os professores, aos colegas de trabalho e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

FONTES DE FINANCIAMENTO

- INCT – DT (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais)
PROCESSO N° 573839/2008-5

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	14
ÍNDICE DE FIGURAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
I. RESUMO	19
II. OBJETIVO	20
II.1. Principal	20
II.2. Secundários	20
III. INTRODUÇÃO	21
IV. REVISÃO DA LITERATURA	23
IV.1. Epidemiologia da hanseníase	23
IV.1.1. Aspectos globais da hanseníase	23
IV.1.2. A hanseníase no Brasil	24
IV. 2. Aspectos clínicos da hanseníase	28
IV. 2.1. Aspectos da resposta imune	34
IV. 3. Influência genética na hanseníase	39
IV. 3.1. Relatos genéticos da literatura	39
IV. 3.1. A influência dos genes PARK2 e PACRG	42
V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	45
V.1. Local do estudo	45
V.1.1. Caracterização da amostra	46
V.2. Cálculo de poder para o estudo de associação genética	47
V.3. Definição de casos:	48
V.3.1. Hanseníase <i>per se</i>	48

	12
V.3.2. Reação do tipo 1 ou Reação Reversa (RR)	48
V.3.3. Reação do tipo 2 ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH)	49
V.4. Coleta de sangue e trabalho laboratorial	49
V.4.1. Extração de DNA genômico	49
V.4.2. Genotipagem dos polimorfismos	51
V.4.2.1 SnapShot® Multiplex	51
V.5. Extração de RNA e obtenção de cDNA	54
V.6. Expressão dos genes PARK2 e PACRG	55
V.7. Análise estatística dos resultados	57
V.8. Fluxograma ilustrativo do estudo	59
VI. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	60
VII. RESULTADOS GERAIS	60
VII.1. Características socioepidemiológica da população estudada	60
VII.2. O polimorfismo PACRG rs1040079 T/C	63
VII.3. O polimorfismo PACRG rs1333955 G/A	64
VII.4. O polimorfismo PACRG rs9356058 ou PARK2_e01 (-2599) C/T	65
VII.5. O polimorfismo PACRG rs6939278 A/C	66
VII.6. O polimorfismo PARK2 rs1801334 G/A	67
VII.7. O polimorfismo PARK2 rs1801582 G/C	68
VII.8. O polimorfismo nos marcadores PACRG rs6915128 C/T e PARK2 rs1801474 G/A	69
VII. 9. A análise de desequilíbrio de ligação	69
VII.10. Análise intralocus	72
VII.11. Análise da expressão gênica	74
VIII. DISCUSSÃO	80

IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO	87
X. CONCLUSÕES	88
XI. SUMMARY	89
XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
XII. ANEXOS	99
XII.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doadores do HEMOBA.	100
XII.2. Consentimento informado para o estudo de determinantes genéticos nas leishmanioses no Brasil.	102
XII.3. Questionário - VISITA DE CAMPO -Posto de Saúde de Corte de Pedra	105
XII.4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes	109
XII.5. Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPES	111
XII.6. ADENDO: Inclusão de doadores do HEMOBA ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUPES.	114
XII.7. Modelo do questionário e carta convite - DOADORES HEMOBA	116
XII.8. Modelo da Ficha clínica e questionário – PACIENTES	117

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de Ridley-Jopling adaptada.	30
Tabela 2. Painel de SNPs genotipados	51
Tabela 3. Perfil socioepidemiológica da população de casos estudadas.	62
Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1040079 do gene PACRG.	63
Tabela 5. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1333955 do gene de PACRG.	64
Tabela 6. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs9356058 ou PARK2_e01(-2599) do gene de PACRG.	65
Tabela 7. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs6939278 do gene PACRG.	66
Tabela 8. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1801334 do gene PARK2.	67
Tabela 9. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1801582 do gene PARK2.	68
Tabela 10. Análise intralocus entre os marcadores de PARK2 e PACRG.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxas de prevalência de hanseníase referentes ao ano de 2012. Segundo a Organização Mundial da Saúde.	24
Figura 2. Coeficiente de prevalência de hanseníase por 10 mil habitantes nas Unidades da Federação (A) e municípios (B). Brasil, 2012	25
Figura 3. Coeficiente de detecção de hanseníase por 100 mil habitantes segundo regiões geográficas. Brasil, 2003 – 2012	26
Figura 4. Coeficiente geral de detecção (incidência) de hanseníase por municípios. Bahia – 2010.	27
Figura 5. Mecanismo do SnapShot®	53
Figura 6: Eletroferograma dos marcadores rs1801582 e rs6939278.	54
Figura 7. Mapas do desequilíbrio de ligação entre os marcadores testados.	71
Figura 8. Expressão gênica relativa para PARK2 (A) e PACRG (B) entre os indivíduos afetados pela hanseníase sem e com reação hansênica.	74
Figura 9. Expressão gênica relativa para PARK2 (A) e PACRG (B) em relação aos controles sadios.	75
Figura 10. Expressão gênica relativa para PARK2 (A) e PACRG(B) com os controles sadios <i>versus</i> pacientes.	76
Figura 11. Expressão gênica de PARK2(A) e PACRG(B) para o marcador rs1040079.	77
Figura 12. Expressão gênica de PARK2 para o marcador rs1801334	78
Figura 13. Expressão gênica de PARK2(A) e PACRG(B) para o marcador PARK2_e01(-2599) rs9356058	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	<i>Borderline-Borderline</i>
BCG	“Bacillus Calmette-Guérin”
BI	“Bacteriological Index”: Índice Bacilar
BL	<i>Borderline</i> Lepromatosa ou Virchowiana
BT	<i>Borderline</i> Tuberculóide
CP	Coefficiente de Prevalência
dH₂O	Água destilada
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	“deoxyribonucleic acid”: ácido desoxirribonucleico
EDTA	“Ethylenediamine tetraacetic acid”: ácido etilenodiamino tetra- acético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ENH	Eritema nodoso hansênico
FAM	Frequência alélica mínima
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
HIV	“Human Immunodeficiency Virus”: Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA	“Human leukocyte antigen”: antígeno leucocitário humano
HTLV	“Human T-Lymphotropic Virus”: Vírus linfotrópico T humano
I	Indeterminada
IC	Intervalo de confiança
IFN-γ	Interferon gamma
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IMC	Imunidade Mediada por Células
LL	Lepromatosa ou Virchowiana
<i>M.leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	Multibacilar
MHC	“Major histocompatibility complex”: Complexo principal de Histocompatibilidade
NF-κB	“Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”: fator nuclear kappa B
NOD	“Nucleotide-binding oligomerization domain”: Proteína de Domínio de Oligomerização Nucleotídica 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
OR	“Odds ratio”: razão de chances
PACRG	Gene Co-Regulador da Parkina
PARK2	Proteína parkinson 2, E3 ubiquitina proteína ligase: parkina
PB	Paucibacilar
PCR	“Polimerase Chain Reaction”: Reação em Cadeia da Polimerase
PQT	Poliquimioterapia

RCF	“Relative Centrifugal Force”: Força centrífuga relativa
RNA	“ribonucleic acid”: ácido ribonucleico
RR	Reação reversa
RT-PCR	PCR em tempo real
SDS	“Sodium dodecyl sulfate”: Dodecil sulfato de sódio
SNP	“ <i>Single nucleotide polymorphism</i> ”: polimorfismo de base única
TCD4	Linfócito T CD4
TCD8	Linfócito T CD8
TGF-β1	“Transforming growth factor beta 1”: Fator de Crescimento e transformação beta 1
Th1	Linfócitos T “helper” 1
Th2	Linfócitos T “helper” 2
TLR	“Toll like receptors”: receptores do tipo Toll
TNF	“Tumor necrosis factor”: Fator de necrose tumoral
Treg	Células T regulatórias
TT	Tuberculóide

I. RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, influenciada por fatores genéticos e ambientais. Essa infecção possui um vasto espectro clínico e imunológico, podendo causar aos pacientes altas taxas de morbidade, o que tem grande impacto na saúde pública. Esse trabalho tem como objetivos avaliar por meio de estudo caso-controle a associação dos genes PARK2 e PACRG com a hanseníase em uma população afetada do estado da Bahia e verificar se há diferenças no perfil de expressão desses genes entre indivíduos afetados com a hanseníase em relação a controles. Por meio da estratégia de genes candidatos, foram selecionados marcadores (SNPs) para os genes PARK2 e PACRG previamente associados com a hanseníase em populações do Brasil e Vietnã. Foram selecionados 338 indivíduos diagnosticados para hanseníase e 346 indivíduos sadios da área endêmica de leishmaniose tegumentar. A genotipagem dos marcadores foi realizada pelo método de PCR Snapshot® da Applied Biosystems. O estudo da expressão gênica foi realizado com TaqMan® RT-PCR em 60 pacientes com hanseníase divididos em grupos de 20 indivíduos sem reação (hansen *per se*), 20 indivíduos com reação tipo I e 20 com reação tipo II. Além desses foram utilizados 20 controles saudáveis, doadores voluntários de sangue. Métodos de associação foram utilizados para analisar os dados. Para o estudo genético foi utilizado o teste de regressão logística incondicional (STATA v 9.0TM). Os estudos de expressão gênica foram analisados pelos testes de Mann Whitney e Kruskal-Wallis, utilizando o programa PRISMA. Os resultados confirmam uma associação entre os genes PARK2 (rs1801334 $p < 0,00001$) e o gene co-regulado de PARK2, PACRG (rs1040079 $p < 0,0001$, rs9356058 $p = 0,027$ e rs6939278 $p < 0,00001$) e o status hanseníase *per se*. A expressão *ex vivo* para os genes PARK2 e PACRG foi semelhante entre pacientes com hanseníase (hansen *per se*, e reações I e II) ($p > 0,05$), entretanto menor nos pacientes em relação aos controles sadios avaliados ($p = 0,007$). Como conclusões principais, foi confirmado o papel dos genes PARK2 e PACRG na patogênese da doença na população da Bahia. As análises mostram que pacientes tem menor expressão desses genes em relação aos controles.

Palavras-chave: Genes, polimorfismo, hanseníase, associação, PARK2, PACRG.

II. OBJETIVOS

II.1. PRINCIPAL

Avaliar o papel dos genes PARK2 e PACRG no desenvolvimento da hanseníase em uma população do estado da Bahia.

II.2. SECUNDÁRIOS

- 1- Verificar se variantes polimórficas nos genes PARK2 e PACRG, previamente associadas à hanseníase, também tem associação em uma população da Bahia.
- 2- Analisar o grau de desequilíbrio de ligação entre os marcadores testados e determinar a possível interatividade entre os associados na população.
- 3- Avaliar a expressão *ex vivo* dos genes PARK2 e PACRG em células de pacientes com hanseníase e comparar a expressão em indivíduos sem a doença.

III. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. O modo mais provável de transmissão da doença é através de secreções do nariz e da boca e contato com a pele de infectados não tratados. A doença afeta a pele, mucosa, nervos periféricos especialmente olhos, mãos e pés, podendo causar danos neurológicos permanentes (COEYTAUX; TRUFFERT *et al.*, 2007). Essa doença ainda é considerada um problema de saúde pública em alguns países, com destaque para a Índia e o Brasil. 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 o Brasil. O diagnóstico tardio e o longo período de incubação da doença são fatores que contribuem para a transmissão ativa da hanseníase, dificultando a redução significativa no número de novos casos (ANDRADE; SABROZA *et al.*, 1996; BRASIL...,2010).

A maioria da população (cerca de 90%) tem resistência ao *M. leprae* e conseguem controlar a infecção sem desenvolver clinicamente a doença. Acredita-se que isto se deva a múltiplos fatores, incluindo a genética individual (GOTTRON; SCHÖNFELD; 1963). A hanseníase apresenta um amplo espectro clínico que se deve ao perfil imunológico e genético dos indivíduos afetados. A classificação mais utilizada atualmente foi proposta por RIDLEY e JOPLING em 1966, com base na resposta imunológica do hospedeiro ao bacilo, em um sistema de cinco grupos: TT (tuberculóide polar), BT (tuberculóide Boderline), BB (Boderline Boderline), BL (Boderline lepromatoso) e LL (lepromatoso polar). Para fins de tratamento da hanseníase com a PQT, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a adotar a classificação operacional da doença em dois tipos distintos: paucibacilares – PB e multibacilares – MB, de acordo com o número de lesões

na pele e positividade da baciloscopia. Dessa maneira, os pacientes classificados como PB, podem apresentar até cinco lesões e baciloscopia negativa, e os pacientes MB são aqueles que exibem mais de cinco lesões e baciloscopia positiva (OMS, 1995; BRASIL, 2010).

A infecção pelo *M. leprae* e as manifestações dela decorrentes dependem muito da predisposição individual. Neste sentido, muitos estudos vêm documentando a influência de genes na resistência e susceptibilidade à hanseníase, em diferentes populações (ROY; MCGUIRE *et al.*, 1997; ROY; FRODSHAM *et al.*, 1999; MIRA; ALCAÏS *et al.*, 2003; MIRA; ALCAÏS *et al.*, 2004; MORAES; CARDOSO *et al.*, 2006; ZHANG; LIU *et al.*, 2011; MARQUES; BRITO-DE-SOUZA *et al.*, 2013). Neste contexto, alguns dos resultados já obtidos têm levado a implicação de vias metabólicas, antes insuspeitas, na patogênese da doença como os genes PARK2 (HRISTOVA; BEASLEY *et al.*, 2009) e seu gene co-regulado PACRG. Polimorfismos na região regulatória partilhada por estes genes foram identificadas como sendo fatores de risco comuns para a hanseníase em populações etnicamente diversas do Brasil e Vietnã e Índia (MIRA, ALCAÏS *et al.*, 2004; ALCAÏS, MIRA *et al.*, 2005; CHOPRA, ALI *et al.*, 2013).

No presente trabalho, por meio de um estudo genético populacional e seguindo a estratégia de genes candidatos, foram escolhidos os genes PARK2 e PACRG baseados em dados acima mencionados, com o objetivo de avaliar esses genes como biomarcadores de risco da hanseníase na população do estado da Bahia. Nossos dados buscam corroborar o papel de PARK2 e PACRG na hanseníase. Resultados dessa natureza, em última instância, abrem novas perspectivas para que novas ferramentas terapêuticas possam ser desenvolvidas e testadas.

IV. REVISÃO DE LITERATURA

IV.1. EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE

IV.1.1. ASPECTOS GLOBAIS DA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença negligenciada que se constitui em um grande problema de saúde pública. Embora a sua prevalência tenha sido reduzida extensivamente após a introdução da poliquimioterapia (PQT) e da vacinação com BCG (KARONGA, 1996), a incidência da doença continua alta, com mais de duzentos mil novos casos registrados anualmente (OMS, 2012; 2013). Estimativas populacionais de 2012 e início de 2013 baseados nos dados publicados pelo Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais / Divisão de População das Nações Unidas foram utilizados como denominador para o cálculo da taxa de prevalência e taxas de detecção de novos casos da hanseníase e deficiência de grau 2 (G2D) de incapacidade física em vários países. A Figura 1 mostra que aproximadamente 189.000 pessoas, principalmente na Ásia e na África, foram afetadas entre meados de 2012 e início de 2013, com cerca de 232.000 casos novos em 2012 (OMS, 2012; 2013). Casos de hanseníase são encontrados principalmente em Angola, Brasil, África Central Republicana, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e República Unida da Tanzânia, sendo estes países responsáveis por 75% da casuística da doença no globo (OMS, 2011; 2013).

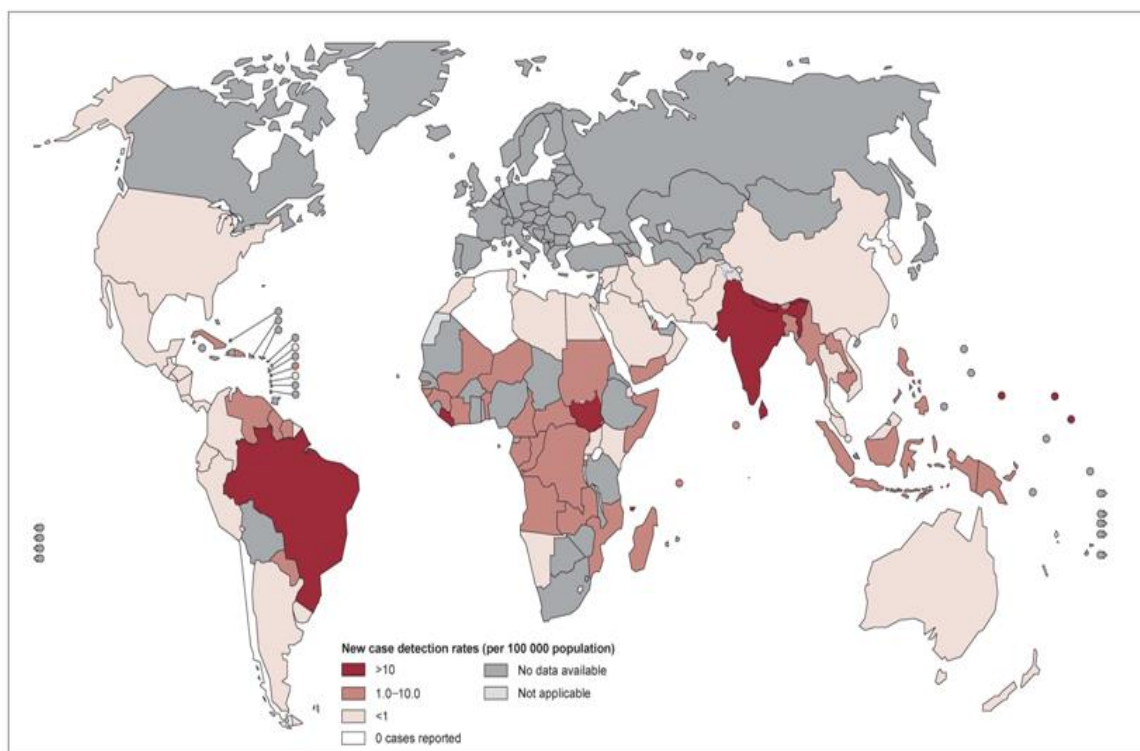


Figura 1. Taxas de prevalência de hanseníase referentes ao ano de 2012, Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013). De acordo com relatórios oficiais de 115 países e territórios, o número total de hanseníase registrados no final do primeiro trimestre de 2013 foi de 189.018 casos, enquanto o número de casos novos detectados durante 2012 foi de 232.857 (excluindo pequeno número de casos em Europa). Fonte: (OMS, 2013)

IV.1.2. A HANSENÍASE NO BRASIL

A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) inclui a hanseníase no grupo das doenças negligenciadas e outras relacionadas com a pobreza. Em algumas regiões do Brasil, a hanseníase é endêmica, mas sua distribuição é bastante heterogênea. Cerca de 33.000 casos novos são detectados a cada ano. Em 2012 foram registrados 33.303 casos novos com coeficiente de prevalência (CP) por 10 mil habitantes de 1,51. O CP vem diminuindo ao longo dos últimos anos e sendo ele um indicador de doença como problema de saúde pública, isso mostra redução progressiva neste aspecto. No entanto, o padrão espacial de distribuição da hanseníase permanece o mesmo (ANDRADE;

SABROZA *et al.*, 1996; ARANTES *et al.* 2010; BRASIL...,2010). O CP é mais elevado em municípios localizados na borda da Amazônia brasileira, nos estados do Maranhão, Mato Grosso, Pará e Tocantins e, ainda, em algumas áreas metropolitanas do Nordeste (ARANTES *et al.* 2010; BRASIL..., 2013b).

De acordo com a Figura 2, os estados de Mato Grosso, Maranhão e Tocantins apresentaram coeficiente de prevalência alto (entre 5 e 9,99 casos por 10 mil habitantes), enquanto parte da região Nordeste e a maioria dos municípios das regiões Sul e Sudeste apresentam baixa endemicidade (BRASIL..., 2012; 2013a).

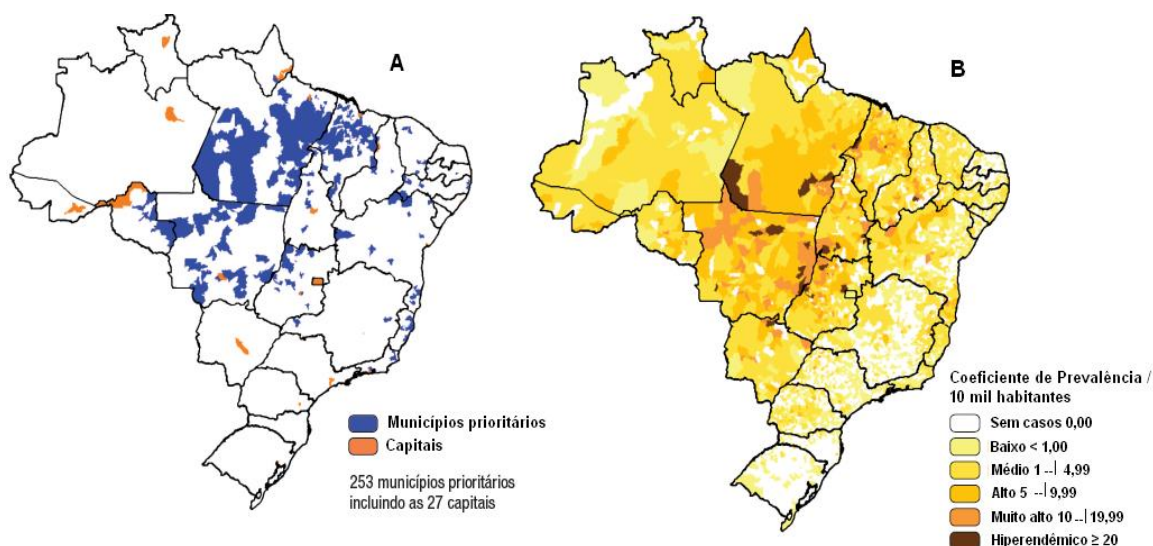


Figura 2. Coeficiente de prevalência de hanseníase por 10 mil habitantes nas Unidades da Federação (A) e municípios (B). Brasil, 2012. A hanseníase não está distribuída de forma homogênea em todo o território nacional. São identificadas áreas geográficas de risco que concentram maior endemicidade considerados prioritário pelo MS para ações de controle. (A) Municípios prioritários para vigilância em hanseníase; (B) Embora o Brasil registre decréscimos contínuos nos coeficientes de prevalência e de detecção de casos novos de hanseníase, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são consideradas as mais endêmicas, com importante manutenção da transmissão. **Fonte:** (BRASIL...,2012).

A Figura 3 mostra o coeficiente de detecção de hanseníase, para o Brasil e regiões, nos últimos dez anos (2003 a 2012). Houve uma queda significativa no coeficiente de detecção de casos em todas as regiões geográficas, inclusive no Sul, que historicamente apresenta os menores coeficientes, que foi de aproximadamente 3,0% e na

região Norte de aproximadamente 40% nos últimos 10 anos. A redução na detecção de casos novos teve início em 2003. Apenas na região Nordeste esta redução ocorre a partir de 2004 e se mantém até o fim do período analisado (OLIVEIRA; ASSIS *et al.*, 2013).

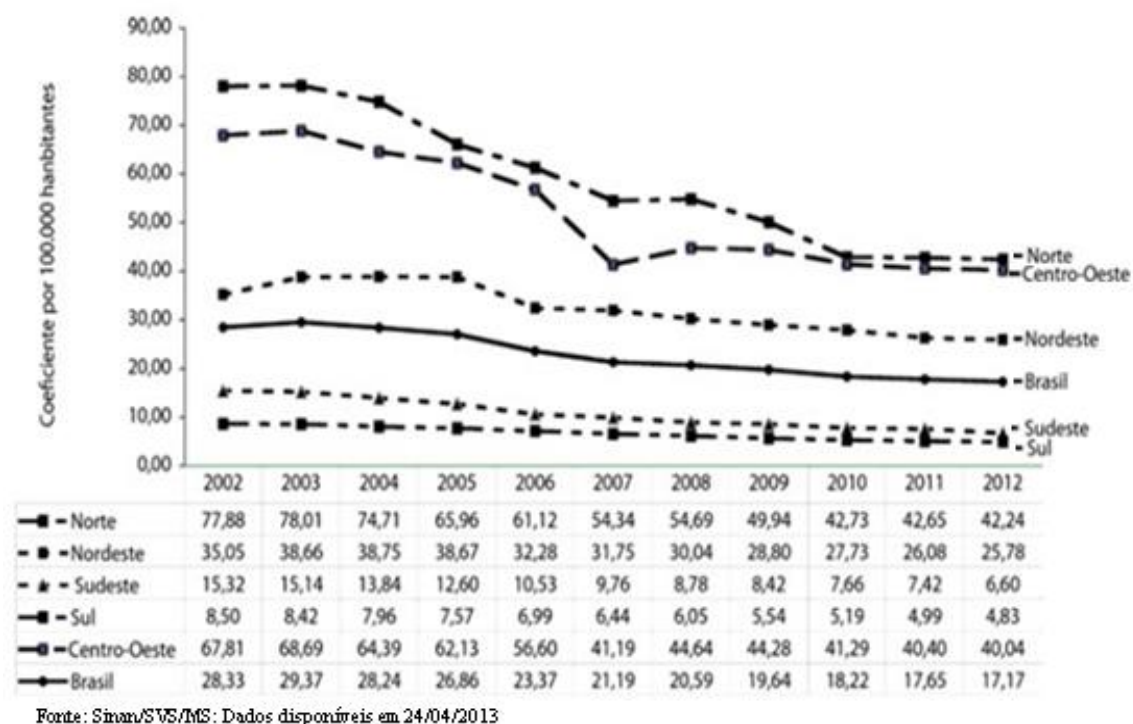


Figura 3. Coeficiente de detecção de hanseníase por 100 mil habitantes segundo regiões geográficas. Brasil, 2003 – 2012. Percebe-se a evolução do coeficiente de detecção de casos novos no Brasil e regiões de 2001 a 2012. Observa-se, no período, uma maior ocorrência de casos nas regiões Norte e Centro-Oeste, seguidas da região Nordeste.

A distribuição da hanseníase no estado da Bahia é muito heterogênea e Salvador atualmente é considerada de alta endemicidade para a hanseníase (BRASIL..., 2011; 2013b;a) como se observa na figura 4, talvez porque as notificações são mais intensa nos grandes centros. Apesar da importante redução do coeficiente de prevalência de hanseníase na Bahia, que em 2010 era de 1,9 casos/10 mil habitantes, o estado demanda intensificação das ações para eliminação da doença, justificadas por um padrão de média endemicidade segundo os parâmetros observados de prevalência (OLIVEIRA; ASSIS *et al.*, 2013). Alguns municípios não notificaram casos, no entanto outros municípios são

considerados hiperendêmicos como Barreiras (região Oeste do Estado) e Juazeiro (região sub-média da bacia do Rio São Francisco) que apresentam maior relevância epidemiológica com mais de 100 casos/100 mil habitantes (BRASIL..., 2011).

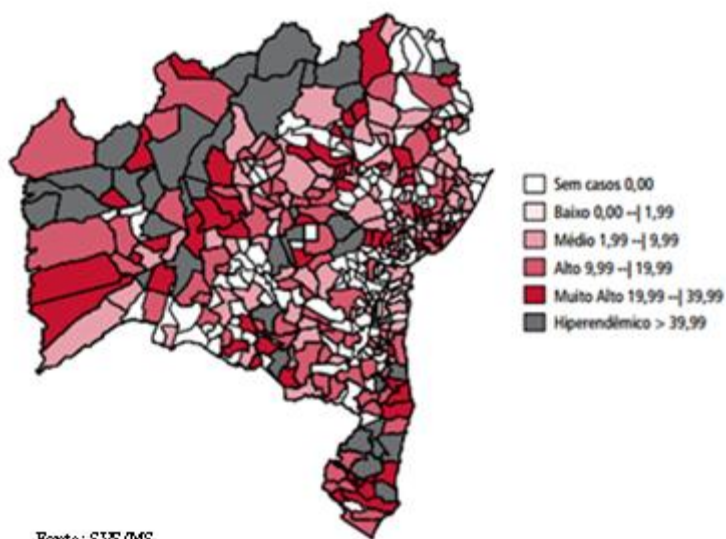


Figura 4. Coeficiente geral de detecção (incidência) de hanseníase por municípios. Bahia-2010. Segundo inquérito epidemiológico MS/SVS, por meio da distribuição espacial, verificam-se áreas mais endêmicas ao Norte, Noroeste e Sul do Estado da Bahia. **Fonte: (BRASIL..., 2011)**

IV. 2. ASPECTOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE

Hanseníase é definida como uma doença infectocontagiosa de caráter crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido (BAAR) resistente atóxico, em forma de bastonete, intracelular obrigatório, que pode induzir uma intensa resposta imune celular nos indivíduos acometidos e que afeta principalmente a pele, ramos nervosos periféricos, mucosa do trato respiratório superior e olhos (COLE; EIGLMEIER *et al.*, 2001; SCOLLARD; ADAMS *et al.*, 2006; MENDONÇA; BRITO ALVIM DE MELO *et al.*, 2008; OMS, 2012).

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. A doença apresenta uma particularidade importante para os clínicos e imunologistas, pois a diversidade de resposta do hospedeiro ao agente etiológico impõe um desafio diagnóstico e um modelo importante para o entendimento da imunidade celular no ser humano (COSTA, MENDONÇA *et al.*, 2008). Apesar de uma diminuição considerável na sua prevalência ao longo das últimas duas décadas, em grande parte devido à introdução da poliquimioterapia no tratamento em 1982, a hanseníase continua sendo um grande problema de saúde pública e uma das mais importantes deficiências evitáveis em muitos países em desenvolvimento (PINHEIRO, SALLES *et al.*, 2011).

A doença se manifesta como um espectro de sintomas que resultam de interações entre a resposta imune do hospedeiro e o *M. leprae*. Neste aspecto, destacam-se dois polos: um pólo tuberculóide (paucibacilar) e outro lepromatoso ou virchowiano (multibacilar), sendo cada um deles associado a um estado imunológico relativamente

estável do hospedeiro. De forma intermediária, uma variedade de manifestações clínicas, é observada de acordo com a resposta imunológica aos bacilos. Dada à baixa diversidade de sequências genômicas entre cepas de *M. leprae* é pouco provável que as diferenças na susceptibilidade ou manifestações clínicas do hospedeiro sejam regidas pela cepa de *M. leprae*. Portanto, os fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro desempenham um papel importante nessa infecção (PREVEDELLO; MIRA, 2007; FRANCESCHI, SACRAMENTO *et al.*, 2009).

Quanto aos aspectos histopatológicos da hanseníase, as lesões da pele de pacientes com a forma tuberculóide (TT) são caracterizadas por infiltrado inflamatório contendo granulomas bem formados com macrófagos diferenciados, células epitelióides gigantes e uma predominância de células T CD4+ no local da lesão, com poucas bactérias ou ausente. Os pacientes apresentam uma resposta imune específica vigorosa para *M. leprae* com um perfil Th1, com produção de IFN- γ e teste cutâneo positivo (lepromina ou reação Mitsuda). Por outro lado, pacientes com a hanseníase lepromatosa (LL) apresentam várias lesões da pele, com uma predominância de células T CD8+ *in situ*, a ausência de formação de granulomas, alta carga bacilar e uma epiderme achatada. O número de bacilos de um paciente LL com diagnóstico recente pode chegar a 1.012 bactérias por grama de tecido. Pacientes com hanseníase LL terão uma proporção de TCD4+: TCD8+ de aproximadamente 1:2 com uma predominância de resposta tipo Th2 e altos títulos de anticorpos anti-*M. leprae*. A imunidade celular contra o *M. leprae* é modesta ou ausente, caracterizado pelo teste cutâneo negativo e diminuição da proliferação de linfócitos (PINHEIRO; SALLES *et al.*, 2011).

O amplo aspecto clínico apresentado na hanseníase se deve, necessariamente, ao perfil imunológico e genético dos indivíduos afetados. A classificação mais utilizada atualmente foi proposta por RIDLEY e JOPLING em 1966 e que é baseada nos aspectos

clínicos, histopatológicos, imunológicos e bacteriológicos, com implicações evolutivas, terapêuticas, epidemiológicas e profiláticas. De acordo com essa classificação, a hanseníase pode ser dividida em cinco grupos: tuberculóide polar (TT) caracterizada por lesão cutânea ou neural localizada e predomínio de resposta imune celular, com pouco ou nenhum bacilo; a lepromatosa polar (LL) apresenta deficiência de resposta imune celular e predomínio de resposta humoral, é a forma contagiosa da doença. As formas interpolares – denominadas *borderline* – são *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline*-*borderline* (BB) e *borderline*-lepromatosa (BL). Elas apresentam, neste sentido, progressiva redução da resposta imune celular, acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosas, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos (RIDLEY; JOPLING, 1966) conforme Tabela 1 acrescida da forma inicial da doença ou indeterminada adaptada de (MOSCHELLA, 2004; RIDLEY; JOPLING, 1966).

Tabela 1. Classificação de Ridley-Jopling adaptada

Características	Indeterminado	Tuberculóide (TT-Polar)	Borderline Tuberculóide (BT)	Borderline (BB)	Borderline lepromatosa (BL)	lepromatosa (LL >+ Polar)
Índice bacilar (índices logarítmicos de Ridley)	Nula (paucibacilar)	Nula (paucibacilar)	Nulo ou escasso (PB) ou multibacilares	2 +; 3 + (multibacilar)	4+; 5+ (multibacilar)	6+ e maior (multibacilar)
Reação de Mitsuda	Variável	Fortemente positiva	Fracamente positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Reações	Nula	Rara	Reação Reversa RR (Tipo I)	Reação Reversa RR (Tipo I)	Reação Reversa RR (Tipo I) e ou ENL (Tipo II)	ENL (Tipo II)

Fonte: Adaptado de (MOSCHELLA, 2004; RIDLEY; JOPLING, 1966).

A hanseníase também pode ser classificada, conforme convenção preconizada no VI Congresso de Leprologia de Madri, em 1953, em quatro diferentes formas clínicas: as formas tuberculóide (HT) e virchowiana (HV) que são consideradas tipos polares opostos e imunologicamente estáveis e as formas indeterminada (HI) e dimorfa (HD) compõem

grupos imunologicamente instáveis. O grupo HI é considerado a forma inicial da hanseníase e, no curso natural da doença, pode evoluir para a cura, para um dos polos ou permanecer como indeterminada (OMS; OPAS, 1989). Frente à necessidade eliminar e ofertar um melhor tratamento para a hanseníase a OMS passou a adotar a contagem do número de lesões de pele como forma de classificar operacionalmente os pacientes (PARDILLO *et al.*, 2007; MENDONÇA, *et al.*, 2008). Sendo considerados como PB e MB aqueles que apresentam de uma a cinco lesões ou mais de cinco lesões, respectivamente (OMS, 1995). No Brasil, para fins de tratamento, os pacientes classificados como PB, podem apresentar até cinco lesões cutâneas e baciloscopia negativa, e os pacientes MB são aqueles que exibem mais de cinco lesões cutâneas e baciloscopia positiva (BRASIL, 2010).

De modo geral, os pólos desse espectro são ocupados de um lado pela forma mais localizada denominada tuberculóide, associada à resposta imune celular Th1 e do outro pela forma lepromatosa sistêmica associada a uma resposta imunológica humoral Th2, com três formas clínicas intermediárias ou *borderline* (RIDLEY; JOPLING, 1966 ; PREVEDELLO; MIRA, 2007). Em 1982, o grupo de programas de quimioterapia da OMS recomendou o uso da classificação de Ridley-Joplin tendo como base o índice bacilar estimado em esfregaços de pele dos pacientes. De acordo com a classificação, os pacientes TT e BT que tem um índice bacilar (BI) $\leq 2 +$ foram classificados como doença paucibacilar e BB, BL e LL pacientes que tem um BI $> 2 +$ foram classificados como doença multibacilar (MOSCHELLA, 2004; MENDONCA; BRITO ALVIM DE MELO *et al.*, 2008).

Durante todo o curso natural da doença, os pacientes também podem desenvolver complicações clínicas, como os estados reacionais ou reações hansênicas que são classificadas como tipo I (reação reversa - RR) ou II (eritema nodoso hansênico - ENH).

As reações hansênicas são alterações do sistema imunológico, que se exteriorizam como manifestações inflamatórias agudas e subagudas. Embora clinicamente diferentes, os dois tipos podem conduzir a danos nos nervos e evoluir com incapacidades físicas (CARDOSO, PEREIRA *et al.*, 2011). As reações hansênicas devem ser prontamente diagnosticadas e tratadas. A reação reversa afeta cerca de 20-30% dos pacientes principalmente com as formas *Borderlines* (BB e BT) e tendem a surgir mais precocemente no tratamento, entre o 2º e o 6º meses. É considerada reação mediada pela imunidade celular. A reação reversa ocorre em pacientes que apresentam características específicas de reação como: inflamação aguda nas lesões pré-existentes, tornando edemaciadas, eritematosas, infiltradas, podendo chegar à ulceração. Pode ocorrer hiperestesia ou acentuação da parestesia sobre as lesões cutâneas. A presença de intumescimento e dor espontânea ou à palpação dos troncos nervosos caracteriza a neurite aguda, que pode acarretar deficiência sensitivomotora permanente (ROSE, P.; WATERS, 1991).

A reação reversa (RR) ocorre, principalmente, em pacientes com as formas BT, BB e BL. Excepcionalmente essa reação pode ser observada na forma LL. O ENH ocorre em pacientes das formas LL e BL. Pode surgir, ainda, episódio reacional com dor espontânea ou à compressão de tronco nervoso acompanhado ou não de espessamento denominado neurite isolada. Nery e colaboradores em 2006 encontraram frequência de 7% de neurite isolada entre pacientes multibacilares (MB) apresentando quadro reacional. A neurite foi mais frequente naqueles com a forma BB (57,1%), seguido dos BL (28,6%) e LL (4,3%) (NERY; SALES *et al.*, 2006, CARDOSO, PEREIRA *et al.*, 2011).

No Brasil, relatos atuais mostram que cerca de 30% de pacientes com a forma paucibacilar e 70% com a forma multibacilar apresentam reações (OLIVEIRA; ALENCAR; *et al.*, 2004; SILVA; GRIEP, 2007). Adicionalmente, os portadores de

hanseníases podem também apresentar reações mistas, ou seja, reações tipo I e II ao mesmo tempo. Em geral, a RR costuma ser mais precoce nos pacientes BT e BB, do que nos BL e observada em pacientes *borderline* após o início da terapia (MENDONÇA; BRITO ALVIM DE MELO *et al.*, 2008).

O diagnóstico dos estados reacionais é realizado através do exame físico geral e dermatoneurológico do paciente. Tais procedimentos são também fundamentais para o monitoramento do comprometimento de nervos periféricos e avaliação da terapêutica anti-reacional. A identificação dos mesmos não contraindica o início do tratamento (PQT/OMS). Se os estados reacionais aparecerem durante o tratamento, esse não deve ser interrompido, pois reduz significativamente a frequência e a gravidade dos mesmos. Deste modo, se forem observados após o tratamento específico para a hanseníase, não é necessário reiniciá-lo e sim iniciar a terapêutica antirreacional como a associação de prednisona e clofazimina (BRASIL... *et al.*, 2005).

Desde meados da década de 1980, esforço global tem sido empregado, sob a orientação da OMS, com o objetivo de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública. Originalmente, essa meta deveria ter sido atingida em 2000. No entanto, em 2007, cerca de 300.000 novos casos/ano ainda foram diagnosticados, a maioria no Brasil e na Índia. Considerando-se que não existe reservatório natural de importância biológica conhecida para o *M. leprae*, que casos novos da doença são tratados por poliquimioterapia através de protocolos 100% eficazes, e que os medicamentos são fornecidos gratuitamente pela OMS a taxa de detecção ainda continua alta (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Diversos fatores podem ser atribuídos ao surgimento de novos casos como o diagnóstico tardio, a evolução insidiosa em alguns casos (6 meses a 3 anos), casos assintomáticos, falta da imunização com a BCG, o desenvolvimento econômico e boas práticas para o controle da hanseníase. DUCATTI (2009) reforça que a

distribuição da hanseníase pelo mundo só pode ser entendida se analisada na perspectiva de seus determinantes sociais, tais como condições sanitárias, de habitação e de educação sanitária. Trata-se, de uma doença da desinformação, já que é plenamente curável, mas suas consequências estão diretamente ligadas ao diagnóstico precoce e ao tratamento adequado, baseado em uma poliquimioterapia de uso prolongado e por isto cercada de falhas de adesão (DUCATTI, 2009; OMS, 2010).

IV. 2.1. ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE

A rota mais provável de transmissão do *M. leprae* é por propagação de aerossol das secreções nasais e absorção através da mucosa nasal ou respiratória (STICKER, 1897; SCHÄFFER, 1898; KLATSER; VANBEERS et al., 1993; JOB; JAYAKUMAR et al., 2008; DA MOTTA-PASSOS; MALHEIRO et al., 2012). Cerca de 5 a 10 das pessoas infectadas pelos bacilos falham nos mecanismos de defesa do sistema imune resultando no desenvolvimento da doença (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; MODLIN, 2010; DA MOTTA-PASSOS; MALHEIRO et al., 2012). Durante o curso da infecção, 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, D. S. A.; SACRAMENTO, W. S. D. et al. 2009). Células dendríticas (CDs) que são derivadas de células mononucleares, sob estímulo de IL(Interleucina)-4 e GM-CSF (Fator de crescimento de Granulócito e Macrófago) são efetivas apresentadoras de antígenos do *M. leprae* (SIELING, P. A.; JULLIEN, D. et al., 1999). As células dendríticas podem ser as primeiras células a encontrar o bacilo no seu local de invasão e exercerem uma resposta imune inata precoce contra o mesmo. Dependendo do nível da maturação das CDs, da interação com o bacilo

e de componentes como a membrana celular do *M. leprae* ou PGL (glicolípido-fenólico)-1, da subsequente produção local de quimiocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-2, IL-12, TNF- α , IFN- γ vs. IL-4, IL-10, TGF- β 1), pode haver regulação da inflamação e, conseqüentemente, respostas Th1 ou Th2 ao *M. leprae* (GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O. *et al.* 2002).

Os primeiros sintomas podem aparecer de 2 a 5 anos após a exposição e as manifestações clínicas serão associados individualmente com a resposta imune a esta doença. Assim, pacientes com a forma tuberculóide (TT) desenvolvem predominantemente uma resposta imune mediada por células na pele e nervos, com a ativação de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e formação de granuloma, configurando uma resposta Th1 (MODLIN, 1994). A célula de Schwann é um alvo importante de invasão bacteriana nos nervos. Desta forma, citocinas como IFN- γ , IL-2 e linfotóxina- α são secretados nas lesões, resultando em atividade fagocítica intensa (YAMAMURA; WANG *et al.*, 1992; SIELING; JULLIEN *et al.*, 1999; SPELLBERG; EDWARDS, 2001). Adicionalmente, macrófagos sob a influência dessas citocinas, juntamente com os linfócitos, formam o granuloma (SCOTT ALGOOD; LIN *et al.*, 2005). Os linfócitos TCD4+ são encontrados principalmente dentro do granuloma, e os TCD8+ são encontrados na área externa que o envolvem (MODLIN; MELANCON-KAPLAN *et al.*, 1988; SIELING; JULLIEN *et al.*, 1999).

Existe uma alta produção de citocinas Th1 em lesões cutâneas de pacientes paucibacilares (TT e BT) como o IFN- γ e IL-2 IL-7, IL-12, IL-15 e IL-18, característico da intensa imunidade mediada por células. Macrófagos infectados são ativados pelo IFN- γ e IL-2 indutores de uma expansão clonal de células T ativadas, o que leva a um aumento da produção de IFN- γ por parte destas. Neste contexto, a produção da citocina fator de necrose tumoral- α (TNF- α) age sinergicamente trabalhando para manter o padrão

Th1. IFN- γ , em sinergia com o TNF- α , ativa macrófagos infectados, iniciando-se assim um mecanismo efetor de resposta imune celular (ASSEMAN; POWRIE, 1998; KISZEWSKI; BECERRIL *et al.*, 2003; ALCAÍŠ; MIRA *et al.*, 2005; FRANCESCHI; MAZINI *et al.*, 2009).

Pacientes com formas multibacilares (BB e LL) apresentam um padrão de citocinas Th2 com produção de TGF- β 1, IL-4, IL-5 e IL-10 em lesões cutâneas locais, com produção elevada de anticorpos e reduzida resposta celular. O efeito imunossupressor conferido pela IL-4 pode levar à proliferação de micobactérias, a ativação de monócitos e inibição de células T. A liberação crônica de IL-10 por outro lado, atua na imunossupressão antígeno-específica. TGF- β 1, um produto de monócitos ativados, inibe a produção de IFN- γ e IL-2, que permite a progressão da doença pela ausência de macrófagos ativados (SIELING; WANG *et al.*, 1994; FRANCESCHI; MAZINI *et al.*, 2009).

A forte resposta Th1 é capaz de controlar - mas não extinguir - o crescimento de bacilos que resulta em menos lesões, mas está associada a danos nos nervos. Por outro lado, em pacientes com a forma LL, a doença se espalha de forma difusa por todo o corpo. A resposta imune humoral do paciente LL é predominante, com o envolvimento de linfócitos B e liberação de IgM delineando uma resposta Th2, além da ativação de células T CD8⁺. Esses pacientes têm lesões em vários órgãos - pele, nervos, olhos, testículos - com macrófagos cheios de bacilos (ARNOLDI; GERDES *et al.*, 1990; MISRA; MURTAZA *et al.*, 1995; JADHAV; SUNEETHA *et al.*, 2011). Células T regulatórias (Treg) foram documentadas em lesões de pele de 95% dos pacientes com hanseníase apresentando células FoxP3-positivas, enquanto no sangue periférico, as Tregs são altamente frequentes em pacientes TT e diminuída em pacientes LL em condições reacionais principalmente no eritema nodoso hansênico (ATTIA;

ABDALLAH *et al.*, 2010; MASSONE; NUNZI *et al.*, 2010). Esse paradigma Th1 - Th2 não inclui outros aspectos da resposta T helper, como células Th17 e elementos do sistema imune inato. Também não explica o que acontece com pessoas expostas e que nunca desenvolvem a doença (DA MOTTA-PASSOS, MALHEIRO *et al.*, 2012). Em camundongos infectados com *M. tuberculosis* e *M. bovis*, a IL- 17A é necessária para a manutenção da resposta inflamatória, no recrutamento de neutrófilos e ajuda no processo de formação de granuloma (BOTELHO; AARÃO *et al.*, 2013).

Como mencionado ainda sobre o espectro imunológico da hanseníase, impõem-se os episódios reacionais. Evidências indicam que reação tipo I ou RR associa-se ao aumento abrupto da imunidade mediada por células, classicamente representada pela reação tipo IV de Gell & Coombs, sendo possivelmente desencadeada por reação aos antígenos bacilares fragmentados. Envolve a participação ativa de linfócitos T, com produção tecidual de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) e de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , principais citocinas iniciadoras na mediação do dano neural e presentes em lesões da pele e nos nervos durante a reação tipo I. As lesões apresentam-se infiltradas por linfócitos TCD4+, com aumento da expressão de HLA-DR e do receptor para IL-2 em células do infiltrado, assim nos ceratinócitos. Além desses, a detecção de neopterina, produto da ativação de macrófagos, mostrou-se significativamente elevada em pacientes reacionais (MODLIN; MELANCON-KAPLAN, *et al.*, 1988; FABER; IYER. *et al.*, 2004; MENDONCA; BRITO ALVIM DE MELO, *et al.*, 2008).

A reação tipo II ou ENH compreende reação inflamatória sistêmica relacionada à deposição de imunocomplexos em resposta ao *M. leprae*, semelhante à reação tipo III de Gell & Coombs que compreende reação inflamatória sistêmica indicando mecanismos humorais envolvidos. A reação tipo 2 acomete primariamente pacientes LL e BL e pode afetar cerca de 13% - 37% dos pacientes multibacilares. A reação pode ser a primeira

manifestação da doença. Ocorre durante ou após o tratamento com a PQT. As manifestações clínicas mais comuns são: aparecimento brusco de nódulos eritematosos, dolorosos à palpação ou até mesmo espontaneamente, sendo frequente o comprometimento sistêmico podendo apresentar febre, mialgia, astenia, artrite, nefrite, vasculite, edema de extremidades, irite, epistaxes, orquite, linfadenite náuseas (estado toxêmico) e dor articular. A evolução é rápida podendo apresentar aspecto necrótico contínuo, com duração de meses e apresentar complicações graves. Pode-se observar o aparecimento de pápulas, nódulos inflamatórios e placas, eritematosas ou eritematovioláceas, dolorosas com calor local, móveis à palpação, às vezes podem evoluir com formação de vesículas, bolhas e ulcerações, distribuindo-se em todo o corpo, com preferência pelas superfícies extensoras dos membros e face. Essas lesões podem evoluir ocasionalmente com necrose central (eritema nodoso necrotizante) (AZULAY; AZULAY, 1997). Duram de uma até poucas semanas, mas em alguns casos tem duração superior a seis meses (NERY; SALES *et al.*, 2006; FAVA, V.; ORLOVA, M.; *et al.* 2012). Associa-se a altas concentrações de TNF α , infiltração de neutrófilos e ativação de complemento, com comprometimento de vários órgãos. A imunopatogênese do ENH é bastante complexa, tendo sido demonstrados, no soro dos pacientes, altos níveis circulantes de IL-1 e TNF- α , paralelamente ao aumento tecidual na expressão de RNA mensageiro para IL-6, IL-8 e IL-10, indicando resposta Th2. O TNF- α foi detectado também, no soro de pacientes com RR e em pacientes PB com neurite isolada, sendo que, nesses casos, os índices foram mais baixos do que no ENH. Foi também documentada a presença de TNF- α e TGF- β , nos macrófagos das lesões de ENH (MODLIN; MELANCON-KAPLAN *et al.*, 1988; YAMAMURA; WANG *et al.*, 1992; GOULART; PENNA *et al.*, 2002; FABER; IYER *et al.*, 2004; MENDONCA; BRITO ALVIM DE MELO *et al.*, 2008).

IV. 3. INFLUÊNCIA GENÉTICA NA HANSENÍASE

IV. 3.1. RELATOS GENÉTICOS DA LITERATURA

Vários genes ou regiões cromossômicas foram estudados e associados com a modulação da susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase incluindo genes relacionados ao complexo principal de Histocompatibilidade (MHC) (VANEDEN; GONZALEZ *et al.*, 1985; XU; DEVRIES *et al.*, 1985). O envolvimento de fatores genéticos do hospedeiro na susceptibilidade à doença foi estabelecido através de estudos de segregação (ABEL; DEMENAI. 1988; ABEL; LAP *et al.*, 1995; FEITOSA *et al.*, 1995; SHIELDS; RUSSELL *et al.*, 1987) estudos com gêmeos (BEIGUELMAN, B. 1971, CHAKRAVARTII, 1973), estudos com genes candidatos (SHAW *et al.*, 2001; MIRA, 2006) e, recentemente, nos estudos de escaneamento do genoma (GWAS) com o que se observou uma associação significativa entre SNPs nos genes CCDC122, C13orf31, NOD2, TNFSF15, HLA-DR1, RIPK2 e LRRK2 e susceptibilidade à infecção, bem como na progressão da doença (ZHANG; HUANG *et al.*, 2009). As associações entre os SNPs em C13orf31, LRRK2, NOD2 e RIPK2 e hanseníase multibacilar foram mais fortes do que as associações entre estes SNPs e a hanseníase paucibacilar. Os polimorfismos desses genes na via de sinalização mediada por NOD2 (que regula a resposta imune inata) estão associados com a susceptibilidade à infecção com *M. leprae*. (WONG; GOCHHAIT *et al.*, 2010). Vários genes candidatos, incluindo IL10, TLR1, TAP, SLC11A1, têm sido associados com a susceptibilidade à hanseníase e com o desenvolvimento das suas formas clínicas (RAJALINGAM; SINGAL *et al.*, 1997; SANTOS; SUFFYS *et al.*, 2002; MALHOTRA; DARVISHI *et al.*, 2005; WONG; GOCHHAIT *et al.*, 2010). No entanto essas associações foram identificadas em populações etnicamente distintas e nem sempre

os dados tem sido reproduzidos. Isso ocorre como um dos efeitos da heterogeneidade populacional (MALHOTRA; DARVISHI et al., 2005; HILL, 2006).

Outros genes também se mostraram associados à hanseníase per se ou a suas diversas formas clínicas em diferentes grupos populacionais tais como o polimorfismo -308G/A no promotor do gene TNFA associado com formas mais agressivas da doença em pacientes brasileiros (SANTOS; ALMEIDA et al., 2000); assim como NRAMP1 (SLC11A1) e polimorfismos nos receptores de Vitamina – D (VDR) podem influenciar numa resposta imune mais intensa (ABEL; SANCHEZ et al., 1998; ROY; FRODSHAM et al., 1999). O gene LTA4H, leucotrieno A4 Hidrolase, que regula os níveis de lipoxina A4 e, possivelmente, interage com eventos relacionados com gotículas de lipídios, também desempenha um papel nas respostas imunes primárias ao *M. leprae*. Juntos, a ativação dessas vias regula o metabolismo celular após a infecção, ativando a produção de citocinas por meio de NF- κ B e receptores de vitamina D, enquanto PARK2 e LRRK2 participam na regulação da apoptose da célula hospedeira (CARDOSO; PEREIRA et al., 2011).

Estudos de escaneamento do genoma (GWAS) em hanseníase seguidos por estudos de replicação envolvendo milhares de casos e controles na China (ZHANG; LIU et al., 2011) identificaram variantes de risco no gene RAB32 do cromossomo 6 e no locus C1orf141 - IL23R no cromossomo 1. O IL23R é parte da cascata de ativação IL-12-IL23 e IFN- γ , referidas como essenciais em infecções por micobactérias (OTTENHOFF; VERRECK et al., 2005). Por outro lado, polimorfismos no gene de IL23R têm sido implicados em estudos anteriores em doenças autoimunes como a psoríase, doença de Crohn e colite ulcerativa, enquanto variações no gene RAB32, apontam para um possível papel da autofagia durante a infecção pelo *M. leprae*. Finalmente, Luke Jostins e colaboradores em 2012, documentaram sobreposições de genes associados a doenças

micobacterianas e doença inflamatória intestinal (IBD-Inflammatory bowel diseases) caracterizadas por infecções localizadas e disseminadas por micobactérias, predominantemente não-tuberculosas. Nesse caso, sete dos oito genes mapeados no GWAS para hanseníase foram também associados com doença inflamatória intestinal, de forma que em alguns destes genes até o mesmo marcador (SNP) foi implicado nas duas doenças (JOSTINS; RIPKE *et al.*, 2012).

Estudos funcionais e de associação genética identificaram um número de polimorfismos em genes TLR que estão associados à susceptibilidade ou resistência a uma variedade de infecções assim como na hanseníase (JOHNSON; LYLE *et al.*, 2007; HART; RICHARD, 2012). O polimorfismo I602S (T1805G) no gene TLR1 tem sido associado a mudanças no padrão de sinalização do gene e menor produção de IL-1b, IL-6 e TNF- α em células estimuladas por *M. leprae* (JOHNSON; LYLE *et al.*, 2007; MARQUES; BRITO-DE-SOUZA *et al.*, 2013). Esse mesmo marcador tem sido associado com proteção à doença em uma coorte da Turquia (JOHNSON; LYLE *et al.*, 2007). A variante TLR1 N248S também foi associada como um fator de risco para o desenvolvimento de hanseníase no Brasil, confirmando dados prévios de uma população de Bangladesh (SCHURING; HAMANN *et al.*, 2009; MARQUES; BRITO-DE-SOUZA *et al.*, 2013).

Estudos mostraram que receptores Toll-like (TLRs) desempenham um papel central na defesa do hospedeiro contra microrganismos, incluindo micobactérias. Os TLRs são membros da família de receptores PRRs (“Pattern recognition receptors”) expressos por células da linhagem mieloide, como monócitos, macrófagos, e células dendríticas, também em células endoteliais, fibroblastos, e células de Schwann, e são o primeiro nível de interação e reconhecimento do *M. leprae* por células. No entanto, subconjuntos de TLR também são expressos em linfócitos, epitélio, endotélio,

fibroblastos, e até mesmo células de Schwann (HART; TAPPING, 2012). Foi documentado também que os polimorfismos no gene de TLR4, D299G (G896A) e T399I (C1196T), conferem proteção à infecção por *Mycobacterium* em um estudo com população da Etiópia (BOCHUD; SINSIMER *et al.*, 2009) e, acompanhando essa mesma coorte por oito anos, o polimorfismo do tipo microssatélite (288bp). Em estudos funcionais, o gene TLR2 foi associado com desenvolvimento de reação hansênica mostrando efeito dessa variação sobre a atividade no promotor do gene TLR2 (BOCHUD; HAWN *et al.*, 2008).

IV. 3.1. A INFLUÊNCIA DOS GENES PARK2 E PACRG

A contribuição dos fatores genéticos do hospedeiro para susceptibilidade à hanseníase tem sido sugerida por vários estudos genéticos, bem como por análises de segregação complexa (SHIELDS; RUSSELL *et al.*, 1987; ABEL, DEMENAI, 1988; ABEL, LAP *et al.*, 1995). Embora estes estudos indiquem um importante papel dos genes na hanseníase e suas formas clínicas, as variações moleculares específicas de cada população são igualmente importantes no aumento da predisposição do indivíduo se exposto ao *M. leprae* (SCHURR, ALCAÏS *et al.*, 2007).

Classicamente, PARK2 ou *parkina* é uma E3-ubiquitina ligase que participa da via de destruição de proteínas dependente de ubiquitinação. Entretanto, estudos demonstram a multifuncionalidade deste gene, interagindo com proteínas do sistema imune como as vias de sinalização de receptores de toll like (TLRs) e interferindo na produção de reativos intermediários de oxigênio (MIRA; ALCAÏS *et al.*, 2004). Os genes da parkina também podem regular a autofagia sob certas condições. Esse gene

reconhece mitocôndrias despolarizadas e ajudam a catalisar a autofagia de toda a organela (mitofagia) através da ubiquitinação de proteínas mitocondriais (VIVES-BAUZA; ZHOU *et al.*, 2010). Estudos recentes têm mostrado semelhanças fundamentais entre o processo pelo qual as mitocôndrias e bactérias intracelulares são "marcadas" para autofagia (DERETIC, V.; 2010; DERETIC, V.; SAITOH. T., *et al.* . 2013). Estas semelhanças suportam a hipótese de que a parkina poderia promover a autofagia de agentes patogênicos intracelulares. Adicionalmente, a PARK2 está envolvida em processos de controle da apoptose, pela regulação de fatores de transcrição. Sob tal hipótese, a parkina teria um efeito protetor durante a infecção, uma vez que pode não só evitar a apoptose como também promover a morte bacteriana por autofagia (SPANDL, J.; D. LOHMANN, *et al.*, 2011). Por outro lado, as variações genéticas associadas com a susceptibilidade à hanseníase poderiam mostrar um fluxo autofágico desregulado. Assim, nestes indivíduos que apresentam tais variações pode-se criar um ambiente permissivo para o crescimento de *M. leprae*. Tem sido proposto que a degradação proteossomal e autofagia podem ser mediadas por gotículas lipídicas, e a localização dos componentes do sistema de ubiquitinação em gotículas lipídicas sugere que estes processos são de fato ligados entre si na regulação da resposta imune inata ao *M. Leprae* (CARDOSO; PEREIRA *et al.*, 2011; SPANDL, J.; D. LOHMANN, *et al.*, 2011).

A função de PACRG é desconhecida, mas tem também sido associada com o sistema ubiquitina-proteassoma (WEST *et al.*, 2003). Alguns polimorfismos genéticos de PARK2 podem levar a uma pequena anormalidade na proteína parkina a qual passa a não funcionar e é rapidamente degradada dentro das células (MIRA *et al.*, 2004). Outras variações podem inserir, excluir ou alterar blocos de construção de DNA (nucleotídeos) no gene PARK2, levando a uma versão defeituosa da proteína *parkina* ou impedindo a produção dessa proteína. Variações genéticas no PARK2 associadas com a doença de

Parkinson geralmente levam a uma perda de atividade deste gene (KITADA, *et al*, 1998) e na hanseníase significa um aumento no risco de desenvolver a doença (MIRA; ALCAÏS *et al.*, 2004). Essas peculiaridades genéticas associadas com a expressão de PARK2/PACRG em macrófagos e células de Schwann, por conseguinte, apontam fortemente para uma função destes genes no dano tecidual e neurológico observados na hanseníase (MIRA; ALCAÏS *et al.*, 2004).

Mira e colaboradores (2004) relataram a primeira identificação dos genes PARK2 e PACRG na hanseníase por clonagem posicional de variantes genéticas. Neste estudo, foi mapeado inicialmente um *locus* de susceptibilidade no cromossomo 6 (região q25 - q26) com posterior mapeamento fino que identificou um intervalo genético, compreendendo os genes de PARK2 e PACRG, como genes de susceptibilidade à hanseníase. O estudo foi realizado inicialmente em uma população vietnamita onde se documentou uma associação significativa entre a hanseníase e marcadores do tipo SNP (“*single nucleotide polymorphism*” - polimorfismo de base única) localizados em um bloco de aproximadamente 80 kilobases na região reguladora compartilhada pelo gene PARK2 também chamado *parquina* (por ter sido inicialmente identificado no parkinsonismo juvenil), e o gene co-regulado PACRG. Dos marcadores estudados, 17 SNPs foram significativamente associados com a hanseníase. A associação foi mais robusta com os SNPs PARK2_e01(-2599), PARK2_e01(-3800), 28Kb_target_4_1, rs1333955 e rs1040079, seguidos dos SNPs rs2849513, rs2849515, rs2903104, 10Kb_target_5_2, PARK2_e01(-697), PARK2_e01(-3024), rs1931225, 28Kb_target_3_1, 28Kb_target_2_1, 40Kb_target_8_F60, 40Kb_target_8_F706 e rs1514343.

Este estudo foi reproduzido em uma população brasileira e confirmada a associação dos mesmos alelos. Assim, dos 17 marcadores associados, 13 foram testados e 9 foram significativamente associados com a hanseníase na amostra brasileira: (10Kb

_target_5_2, PARK2_e01(-697), rs1514343, rs1333955, 40Kb_target_8_F60, PARK2_e01(-2599), PARK2_e01(-3800), 28Kb_target_4_1, e rs1040079). Esses SNPs representaram um risco aumentado de hanseníase nas duas populações. Na população brasileira os mais fortemente associados foram o PARK2_e01(-2599) e o rs1040079. Os polimorfismos da região reguladora compartilhada por PARK2 e PACRG, portanto, foram considerados como fatores de risco comuns para a hanseníase, validando o papel desses genes na patogênese da doença (MIRA; ALCAÏS *et al.*, 2004).

V- CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

V.1. LOCAL DO ESTUDO

Este trabalho foi desenvolvido no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos – Ambulatório Magalhães Neto em Salvador Bahia e no Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes no bairro de Cajazeiras, também em Salvador Bahia. O ambulatório Magalhães Neto atende cerca de 60 pacientes com hanseníase por mês, estando em funcionamento desde 1992, sendo referência no Estado da Bahia para o tratamento de episódios reacionais. O Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes foi fundado há 65 anos e é citado como centro de referência para o atendimento de doenças dermatológicas. A unidade, que faz parte da Secretaria da Saúde do Estado (SESAB), é especializada em dermatologia sanitária e referência, na Bahia, no atendimento aos portadores de hanseníase.

V.1.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Pacientes com hanseníase foram convidados a participar do estudo após confirmação diagnóstica realizada pela equipe do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes de acordo com as orientações do Ministério da Saúde. Foram realizadas avaliação dermatoneurológica, teste de sensibilidade, exame de baciloscopia da linfa e a biópsia de uma ou mais lesões para a confirmação da forma clínica da doença. No grupo de casos foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com idade variando entre 18 a 65 anos, diagnosticados com a doença e que fazem tratamento e acompanhamento ambulatorial. Informações sociodemográficas e ocupacionais foram obtidas por meio da aplicação de questionários (EM ANEXO).

Os participantes do grupo controle para o estudo dos genes PARK2 e PACRG (genotipagem de SNPs) foi formado por 350 indivíduos saudáveis, sendo estes também selecionados para o estudo da leishmaniose, moradores da área endêmica de Corte de Pedra, uma vila do município de Presidente Tancredo Neves- BA, situada na região do litoral sudeste baiano a 280 quilômetros da capital Salvador. O Posto de Saúde de Corte de Pedra é o centro de referência de 20 municípios para diagnóstico e tratamento da leishmaniose. Todos os contactantes selecionados no estudo de genética em leishmaniose foram submetidos a questionário epidemiológico para avaliar fatores de exposição e exame físico que descarta história atual e pregressa de leishmaniose tegumentar (EM ANEXO). Corte de Pedra não é área endêmica de hanseníase. Para o estudo da expressão gênica, foram selecionados 20 participantes para o grupo de controles saudáveis doadores da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia - HEMOBA. Estes indivíduos não apresentavam infecção pelo bacilo *M. leprae* nem qualquer outra doença infecciosa,

também não possuíam resultados anteriores de sorologia positiva para HIV, HTLV-1 e 2, HCV ou HBV, além de não serem contatos de pacientes com hanseníase. Dados dos doadores foram obtidos através de questionários específicos que eram aplicados aos selecionados na triagem para a coleta. Autorização formal foi solicitada de todos os participantes com a idade variando entre 18 e 65 anos após explicação do estudo, por assinatura do indivíduo do termo de consentimento livre e esclarecido (EM ANEXO).

V.2. CÁLCULO DE PODER PARA O ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA

Foi feito cálculo de poder amostral para o estudo genético utilizando modelo matemático multiplicativo desenvolvido por Heather J. Cordell, Newcastle University (<http://www.staff.ncl.ac.uk/heather.cordell/>). Considerando uma frequência alélica mínima (FAM) $\geq 20\%$, uma Odds ratio $\geq 1,5$ (média observada nas associações envolvendo doenças multifatoriais) e um valor de $p = 0,05$, uma amostra de 300 casos e 300 controles confere $\geq 84\%$ de poder estatístico para detecção de associação genética. Por outro lado, nas mesmas condições acima e considerando um valor de $p = 0,01$ e $p = 0,001$, a mesma amostra confere $\geq 66\%$ e $\geq 38\%$ de poder, respectivamente. Adicionalmente, uma FAM $\geq 1,5$, uma Odds ratio $\geq 2,0$ e valor de $p = 0,001$, o poder para 300 casos e 300 controles é de $\geq 93\%$. Assim, mesmo considerando importante um aumento do número amostral *a posteriori*, temos uma margem de poder estatístico aceitável para este estudo de associação genética.

V.3. DEFINIÇÃO DE CASOS:

V.3.1. HANSENÍASE *PER SE*

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* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB), *borderline* lepromatosa (BL) e lepromatosa (LL). O diagnóstico 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 *per se*, aqueles que ao final do tratamento e após retorno para revisão, não apresentavam nenhum tipo de reação hansênica.

V.3.2. REAÇÃO DO TIPO 1 OU REAÇÃO REVERSA (RR)

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

V.3.3. REAÇÃO DO TIPO 2 OU ERITEMA NODOSO HANSÊNICO (ENH)

Foram considerados pacientes com a reação do 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 eritematosos dolorosos, vesículas, pústulas, bolhas ou úlceras . As manifestações clínicas vão desde: febre, mialgia, astenia, artrite, nefrite, vasculite, edema de extremidades, irite, epistaxes, orquite, linfadenite náuseas e dor articular.

V.4. COLETA DE SANGUE E TRABALHO LABORATORIAL

V.4.1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Foi coletado de cada indivíduo em tubo contendo ACD (ácido citrato dextrose) 8,5 ml de sangue periférico para a obtenção de DNA genômico. O DNA foi isolado pelo método “salting-out” modificado como descrito a seguir: (a) após centrifugação para remoção do plasma e posterior divisão do volume de sangue restante do tubo Vacutainer® em dois tubos de polipropileno de 15 ml, foram adicionados 12 ml de solução de lise de eritrócitos (Sacarose 1,6M; Triton X-100 5; MgCl₂1M; Tris-HCl pH 7,5 - 1M) e após centrifugação (8.000 x g durante 10 minutos) e remoção de sobrenadante, o mesmo procedimento foi repetido com dois sedimentos resultantes. Após a lise com tampão de eritrócitos, foi realizado uma lavagem adicionando-se dH₂O sobre o sedimento de leucócitos (após juntá-los em um só tubo) com centrifugação posterior de

8.000 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 5M; EDTA pH8,0 0,5M), 40µl de SDS 20 e 300µl de H₂O, sendo os tubos então incubados durante a noite a 37° em banho-maria; (c) em seguida, os tubos foram retirados do banho-maria e deixados à temperatura ambiente até o resfriamento, quando foram adicionados 200µl de NaCl 6M para a precipitação de proteínas, com posterior centrifugação (13.000 x g durante 20 minutos); e recuperação do sobrenadante para 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°(P.A.) 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 a cada tubo com DNA, 200µl de dH₂O. A concentração e pureza do DNA foi determinada pela leitura de densidade óptica em espectrofotômetro (260 nm) e a pureza pela reação DO a 280/206 nm. As amostras foram posteriormente aliquotadas e congeladas a -20°C.

V.4.2. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

V.4.2.1 SNAPSHOT® MULTIPLEX

Para avaliação do polimorfismo dos genes candidatos, PARK2 e PACRG, foram escolhidos polimorfismos previamente mapeados nas populações brasileira e vietnamita (MIRA; ALCAÏS et al., 2004). A Tabela 2 mostra o painel de SNPs genotipados nesse trabalho. Nota-se que o marcador rs1801474 é monomórfico na população da Bahia e o marcador rs6915128 está fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2. Painel de SNPs genotipados

Gene	Código rs do SNP (NCBI)	Cromosomo	Posição	EHW	Função	Frequência Alélica					
						BAHIA		YRI		CEU	
						Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
PARK2	rs1801334	6	161781475	SIM	Asp394Asn	0,869	0,13	0,987	0,017	0,942	0,058
PACRG	PARK_e01 (-2599) (rs9356058)	6	163151649	SIM	Íntron	0,748	0,251	0,907	0,093	0,725	0,275
PARK2	rs1801582	6	161808105	SIM	Val380Leu	0,865	0,134	0,808	0,192	0,833	0,167
PARK2	rs1801474	6	162622447	SIM* Mono	Ser167Asn	0,99	0,009	0,978	0,022	0,903	0,097
PACRG	28KB_TARGET_4_1 (rs6915128)	6	163212039	NÃO	Íntron	0,956	0,043	0,271	0,729	0,483	0,527
PACRG	rs6939278	6	163152850	SIM	Íntron	0,583	0,416	0,907	0,093	0,633	0,367
PACRG	rs1333955	6	136213704	SIM	Íntron	0,612	0,387	0,772	0,228	0,518	0,482
PACRG	rs1040079	6	163214277	SIM	Íntron	0,538	0,461	0,41	0,59	0,3	0,7

Tabela 2: Polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) selecionados para a genotipagem da amostra de estudo. A tabela 2 mostra o painel de marcadores avaliados. Observa-se que são mostradas as frequências alélicas para a população estudada em comparação com duas populações do HapMap: CEU (caucasóide) e YRI (Yorubá africana).

O ensaio de SNaPshot multiplex foi usado para genotipar 8 SNPs localizados na região cromossômica 6q25.2-q27 selecionados para a genotipagem dos 661 indivíduos. A técnica de Snapshot® permite a genotipagem de múltiplos SNPs é baseada na diferença de um único nucleotídeo na posição polimórfica, após uma reação em cadeia de

polimerase (PCR). A diferenciação alélica é feita através da incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados, que provocam a terminação da extensão da cadeia, e desta forma a cadeia sintetizada terá em uma de suas extremidades uma base marcada com fluoróforo na sua extremidade 5', cuja base será detectada na eletroforese capilar realizada no sequenciador de DNA (MAKRIDAKIS; REICHARDT, 2001).

Resumidamente, o método é descrito a seguir: (a) cada segmento gênico foi amplificado através de PCR, usando um mix de PCR (MgCl 25 mM, ddNTPs 5 mM, Betaína 5M, tampão 10X, ddH₂O), 60 µg de DNA genômico, um par de *primers* desenhado para a região de interesse (tabela 2), numa concentração de 100 ng/µL e 15U de AmpliTaq. As reações de PCR foram realizadas em termociclador My Cycler Bio Rad e seguiram o programa: 1 ciclo de 94°C por 10 minutos; 14 ciclos de 94°C por 20 segundos, 63°C por 1 minuto; 25 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56°C por 1 minuto e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos; (b) os produtos da PCR foram purificados do excesso de *primers* e nucleotídeos não incorporados por meio de degradação enzimática com as enzimas ExoI (Exonuclease I) e SAP (Fosfatase Ácida de Camarão) respectivamente. Após as reações de amplificação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 2,5% para controle da qualidade da reação; (c) a esta alíquota foi adicionado 1 µL de uma mistura dos *primers* de Snapshot® para cada um dos marcadores do painel, numa proporção de 10:1 perfazendo, para estes *primers*, uma concentração final de 1 µM. Também foi adicionado à reação 2,5 µL do master mix multiplex de Snapshot (Applied Biosystems) contendo tampão e ddNTPs marcados com o fluoróforo característico de cada base nucleotídica; (d) após a reação de Snapshot ser concluída, o produto foi purificado com a adição da enzima SAP numa quantidade de 1,5 U diluído numa proporção 2:1 com o tampão da enzima. Uma alíquota de 3 µL do produto de Snapshot purificado foi adicionado a cada poço de uma placa de 96 poços, sendo incluído 7,8 µL

de formamida e 0,2 μL do marcador de peso molecular (Lys 120). As amostras foram então levadas ao sequenciador automático de DNA (ABI Avant 3100) com 4 capilares, onde a separação dos produtos foi concluída em aproximadamente 12h; (e) após a leitura de todas as amostras e armazenamento dos dados em terminal de computador, estes foram analisados quanto ao genótipo através do software Genemapper®. A figura 5 mostra o procedimento de Snapshot desde a amplificação do segmento de DNA até o sequenciamento da base polimórfica, e a figura 6 ilustra dois resultados de genotipagem obtidos da nossa população.

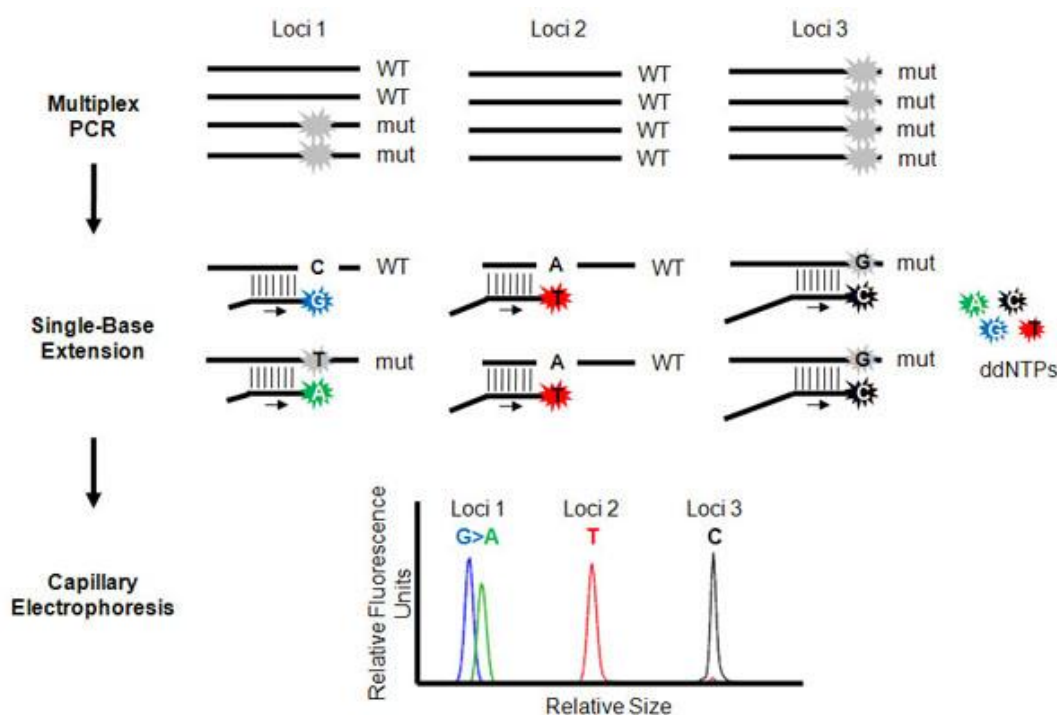


Figura 5. Mecanismo do SnapShot®. A Genotipagem por SnapShot® envolve a amplificação multiplex de alvos de DNA por PCR com oligonucleotídeos não marcados (Multiplex PCR), seguido de extensão de primer de base única multiplexado com didesoxinucleótidos fluorescente marcado (ddNTPs) e posterior análise de produtos marcados por eletroforese capilar. **Fonte:** <http://www.vicc.org/research/shared/translational/services/snapshot.php>

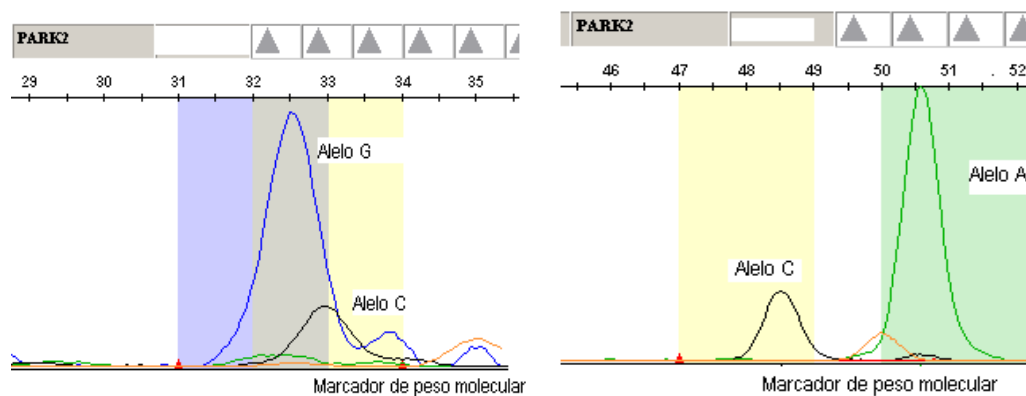


Figura 6. Eletroferograma dos marcadores rs1801582 e rs6939278. Gerado pelo software Genemapper® mostrando a heterozigotidade dos marcadores rs1801582 e rs6939278 testados e a localização dos picos em torno de 32 e 50 pares de bases, respectivamente.

V.5. EXTRAÇÃO DE RNA E OBTENÇÃO DE cDNA

O RNA foi extraído a partir de leucócitos totais de 8,5 ml de sangue periférico conservados em TRIZOL® (Invitrogen Life Technologies), após lise de hemácias, utilizando-se o kit PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies). A partir deste RNA foi obtido o DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reversion Transcription Kit (Applied Biosystems®), seguindo-se as orientações do fabricante. As etapas referentes aos processos referidos são: (a) Recuperação da fase aquosa - os *pellets* conservados em TRIZOL® foram descongelados à temperatura ambiente (TA) e após seu descongelamento foram adicionados 200µl de Clorofórmio P.A. e o tubo passado no mixer por 15 segundos. Após três minutos a TA a amostra foi centrifugada a 12.000 RCF por 20 minutos a 4°C. Cerca de 300 µl da camada superior (aquosa) foi recuperada em um tubo limpo; (b) Purificação do RNA – Adicionou-se 400 µl de álcool a 70° em seguida vórtex por 15 segundos. Após essa etapa, adicionou-se na coluna 700µl da fase aquosa com o etanol. Após centrifugação a 12.000 RCF por 1 minuto e descarte do

sobrenadante foram adicionados mais 500µl de solução de lavagem I® com nova centrifugação e descarte do sobrenadante; (c) adicionou-se 500µl de solução de lavagem II® na coluna e procedeu a nova centrifugação e descarte do sobrenadante. Repetiu-se a etapa anterior. Centrifugou-se a coluna a seco por mais um minuto para retirar os restos de impurezas. Após essa etapa, trocou-se a coluna para um tubo de 1,5 µl devidamente identificado e acrescentou-se 50µl de H₂O livre de RNase, e após 1 minuto centrifugou-se mais 1 minuto a 14.000 RCF. Transferiu-se então a amostra para um tubo de armazenamento o qual foi congelado -70°C; (d) Conversão do RNA em cDNA utilizou-se o kit High Capacity cDNA Reversion Transcription Kit (Applied Biosystems® - Após o descongelamento dos reagentes do kit sob o gelo, preparou-se o 2x RT MASTER MIX: para cada amostra foram adicionados 2,0µl de 10X RT Buffer, 0,8µl de SNTP Mix (100mM), 2,0 10x RT Random primers, 1,0 MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 4,2µl de H₂O livre de RNase, num total de 10µl. Na reação foram pipetados 10µl de 2X RT master mix em cada poço na placa de 96 poços para PCR. Em seguida adicionou-se 10µl da amostra de RNA em cada poço-teste, homogeneizando 2 ou 3 vezes com a ponteira. A PCR foi composta por: 1 ciclo de 25°C por 10 minutos; 1 ciclo de 37°C por 120 minutos, 1 ciclo de 85°C por 5 minutos; 25 ciclos de 94°C por 20 segundos, 56°C por 1 minuto e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. Ao final dos ciclos transferiu-se para um tubo de armazenamento e a amostra mantida sob congelamento até posterior análise.

V.6. EXPRESSÃO DOS GENES PARK2 E PACRG

Ensaio contendo *primers* e sondas específicos para os genes PARK2 (Hs01038318_ml) e PACRG (Hs01125332_ml) foram desenhados pela Applied Biosystems® contendo fragmentos específicos variando de 76-87 bp. As sequências

contexto dos amplicons são descritas a seguir: **PARK2**- TGACCATGA TAGTGTTTGTTCAGGTT e **PACRG** – ACTCAGTCGTGAGAGGCCCTCCAGC.

Para esta análise foram selecionados 60 pacientes com hanseníase, divididos em três grupos com 20 pacientes em cada; 20 indivíduos sem reação (chamados de Hansen *per se*), 20 com RR e 20 com ENH e 20 indivíduos saudáveis, doadores de sangue foram selecionados como controles. A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) com o aparelho 7500 Standard da Applied Biosystems®. Todas as amostras foram preparadas em duplicatas utilizando-se os reagentes orientados pelo fabricante e submetidas à ciclagem. Com luvas sem talco, reagentes e espaço livre de contaminantes para a realização dos experimentos, foram seguidos os seguintes passos: (a) todos os reagentes foram descongelados sob o gelo, bem como o preparo dos mesmos mantidos a 4°C. A placa foi primeiramente elaborada seguindo mapa de trabalho de forma que nela continha as amostras – cDNA (DNA complementar) dos pacientes e dos controles saudáveis ou água como controle negativo; (b) Preparo do Mix específico para o gene alvo e endógeno - em um tubo de 1,5 ml foram adicionados os reagentes correspondentes ao número de amostras de cada gene. Para cada amostra, a quantidade preparada foi a seguinte: 5 µl de “TaqMan Universal Master Mix II, with UNG”, 2,5 µl de água ultra pura livre de RNAase e 0,5µl do ensaio (primers e sondas) 20X concentrado; (c) distribuiu-se 2µl de cDNA de cada amostra em duplicata (ou água) em uma microplaca óptica® de 96 poços de reações, na posição determinada no mapa de trabalho, em seguida adicionou-se 8 µl do mix conforme determinado; (d) selou-se cuidadosamente a placa com o filme adesivo óptico compatível com PCR livre de DNase e RNase; (e) Colocou-se a placa na plataforma de leitura do aparelho 7500 Real Time PCR System, e programou-se no software 7500 v2.0.6 o experimento de Ct comparativo ($\Delta\Delta CT$), definindo-se os “targets” e sondas marcadoras referentes aos

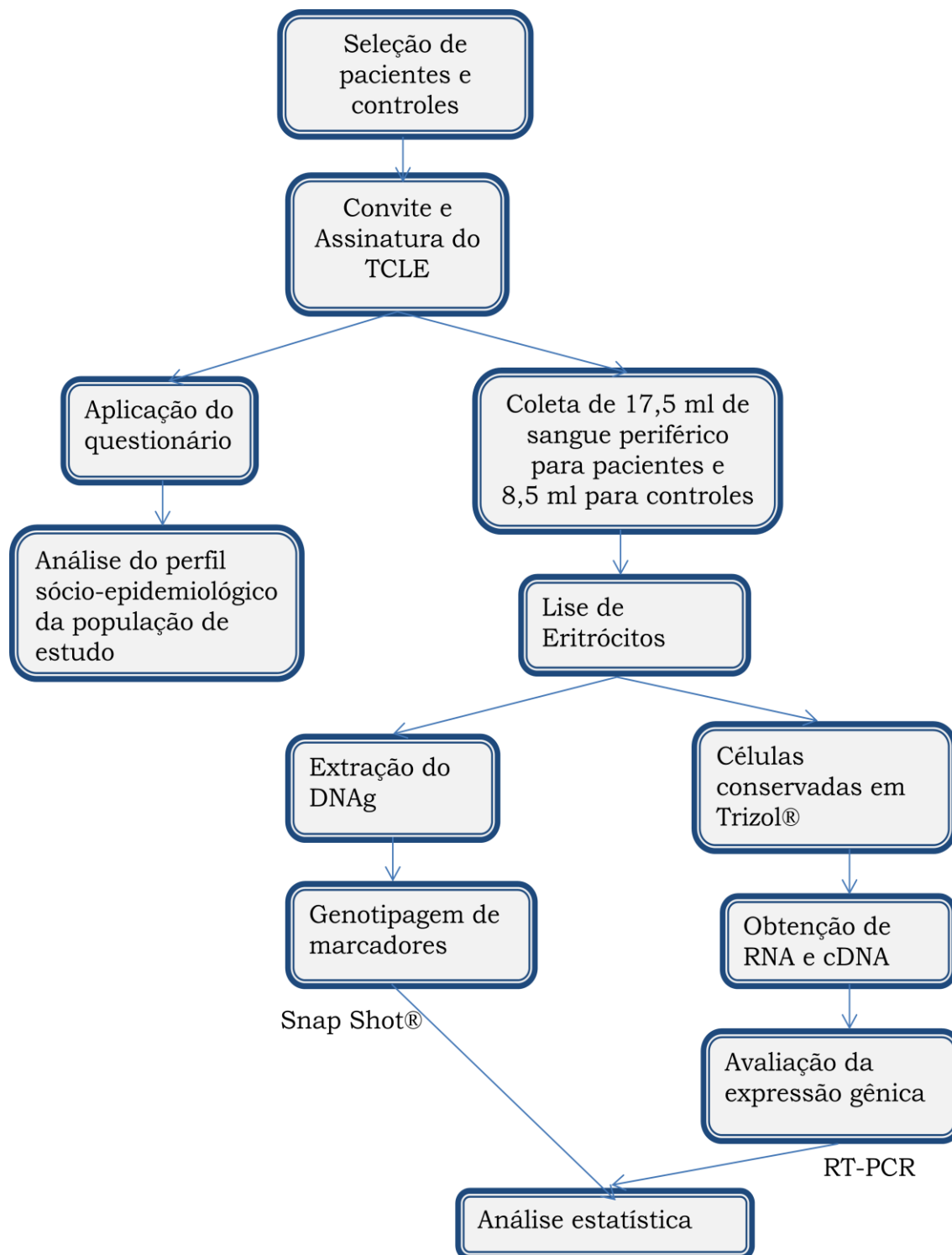
ensaios que no casos dos experimentos são: para a β - actina (Gene endógeno) a sonda VIC, e para os genes alvos PARK2 e PACRG - FAM; (f) A ciclagem obedeceu ao seguinte programa: (1) 50°C - 5 minutos, (2) 95°C - 10 minutos, (3) 95°C- 15 segundos, (4) 60°C – 1 minutos , sendo os ciclos 3 e 4 repetidos 40 vezes. Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde ΔCT é o valor do Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene endógeno; e o $\Delta\Delta CT$ é o valor do ΔCT de cada indivíduo, menos a mediana do ΔCT do grupo controle. Os gráficos ilustrativos para este estudos foram elaborados pelo programa Prism5 através do GraphPad Prism.

V.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados de genotipagem foram armazenados no banco de dados “GenIE” desenvolvido por Richard Francis no “Cambridge Institute for Medical Reserach” da Universidade de Cambridge. Análises de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram feitas utilizando o programa STATATM 9.1, considerando indivíduos não relacionados e marcadores fora do EHW foram excluídos das análises. Métodos de Associação foram utilizados para analisar os dados. A hipótese nula é que o estado da doença é totalmente independente dos marcadores genotípicos, isto é, não há ligação ou associação devido ao desequilíbrio de ligação observado entre os marcadores e qualquer gene casual não observado que controlaria a doença. Análise de regressão logística incondicional na análise do estudo genético de caso-controle e análise intralocus foi realizada através do programa STATATM 9.1 (www.stata.com). As frequências alélicas e genotípicas dos marcadores foram comparadas entre pacientes com as diferentes formas de hanseníase e

controles. A análise do desequilíbrio de ligação entre os marcadores foi realizada através do programa Haploview v4.2. Os estudos de expressão gênica foram analisados pelos testes não paramétricos de Mann Whitney e Kruskal-Wallis com nível de confiança de 95%, utilizado o programa Prism5.

V.8. FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO DO ESTUDO



VI. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia, sob o cadastro 50/10 de 07/10/2010 e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, sob registro 16206 (processo no. 25000.182612/2010-12).

VII. RESULTADOS GERAIS

VII.1. CARACTERÍSTICAS SOCIOEPIDEMIOLÓGICA DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Casos. Os participantes deste grupo foram selecionados no ambulatório Magalhães Neto e no Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes 338 casos de hanseníase. Como ambas as unidades de saúde são centros de referência no estado para tratamento da doença, os indivíduos selecionados não são exclusivamente residentes na cidade de Salvador, mas de vários outros municípios da Bahia. De modo geral, 48 possuíam a forma TT, 46 a forma TB, 33 a forma BB, 36 a forma BL, 35 a forma indeterminada, 5 forma neural pura e outros 118 a forma LL. Na análise de participantes do grupo, 16 casos não foi possível definir qual era a forma, no entanto o diagnóstico era conclusivo para a hanseníase. A média de idade com desvio padrão dos casos foi de 42,32 anos \pm 12,88 e a proporção de homens e mulheres foi 191:147, respectivamente. Os dados demográficos e antecedentes familiares estão detalhados na Tabela 3.

Controles. Dos participantes do estudo, 346 controles da região endêmica de Corte de Pedra, no município de Presidente Tancredo Neves. Os indivíduos são contactantes de

pacientes selecionados para um estudo de genética em leishmaniose tegumentar. Os exames físicos e questionário epidemiológico descartaram história presente ou pregressa de leishmaniose por ocasião da sua participação. A média de idade com desvio padrão dos membros do grupo controle foi de $32,3 \pm 20,5$ e a proporção homens e mulheres foi de 151:190, respectivamente. A maioria dos controles são lavradores e residentes em área rural. A área de Corte de Pedra não é endêmica para a hanseníase. Adicionalmente, foram coletados para os estudos de expressão gênica amostras de 20 participantes cadastrados como doadores de sangue do HEMOBA. Destes 5 eram mulheres e 15 homens, a média de idade com desvio padrão foi de $36,38 \text{ anos} \pm 9,26$. Todos foram perguntados sobre antecedentes familiares para a hanseníase no momento da entrevista e coleta. Segundo informações dos participantes, nem eles, nem seus familiares possuíam história da hanseníase.

Tabela 3. Perfil socioepidemiológica da população de casos estudadas.

DADOS DEMOGRÁFICOS DOS CASOS	TOTAL	PORCENTAGEM %
TOTAL DE HOMENS	191	56,5
TOTAL DE MULHERES	147	43,5
TOTAL DE PAUCIBACILARES	127	37,57
TOTAL DE MULTIBACILARES	194	57,39
NÍVEL DE ESCOLARIDADE		
SEM ESCOLARIDADE	21	6,21
FUNDAMENTAL INCOMPLETO	108	31,95
FUNDAMENTAL INCOMPLETO	52	15,38
ENSINO MÉDIO INCOMPLETO	44	13,01
ENSINO MÉDIO COMPLETO	87	25,73
ENSINO SUPERIOR INCOMPLETO	9	2,66
ENSINO SUPERIOR COMPLETO	25	7,39
TEMPO DE ENDEREÇO ATUAL		
MAIS DE 5 ANOS	261	77,21
DE 2 A 5 ANOS	35	10,35
DE 1 A 2 ANOS	20	5,91
6 MESES A 1 ANOS	18	5,32
MENOS QUE 6 MESES	11	3,25
RENDA FAMILIAR EM SALÁRIOS MÍNIMOS		
MAIS QUE 4 SM	43	12,72
DE 3 A 4 SM	28	8,28
DE 2 A 3 SM	62	18,34
DE 1 A 2 SM	90	26,62
ATÉ 1 SM	109	32,24
SEM RENDA	13	3,84
ANTECEDENTES FAMILIARES		
HANSENÍASE NA FAMÍLIA - TOTAL	87	25,73
NÚMERO DE CASOS NA FAMÍLIA		
4 PESSOAS	3	0,88
3 PESSOAS	4	1,18
2 PESSOAS	16	4,73
1 PESSOA	52	15,38
NÚMERO DE CASOS NA RESIDÊNCIA		
TOTAL DE CASOS	37	10,94
≥5 PESSOAS	2	0,59
4 PESSOAS	2	0,59
3 PESSOAS	5	1,47
2 PESSOAS	5	1,47
1 PESSOA	19	5,62
NÃO SABE	5	1,47
INTERNAMENTO CAUSADO PELA HANSENÍASE		
TOTAL DE CASOS	44	13,01

SM =Salário mínimo. Correspondente ao valor real atual de R\$ 724,00.

Tabela 3. Dados demográficos da população de casos. Observa-se que a maioria dos indivíduos não ultrapassa o ensino fundamental e ganham até dois salários mínimos. A maioria reside no endereço atual por mais de cinco anos e um percentual relevante (25,73%) possuem outros casos da doença na família com cerca de 11% dos casos residindo no mesmo domicílio.

VII.2. O POLIMORFISMO PACRG rs1040079 T/C

A análise do polimorfismo T/C no SNP rs1040079 do gene de PACRG, mostrou frequências alélicas de 0,54 e 0,46 para os alelos T e C respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$).

A análise comparativa entre as frequências feita por regressão logística incondicional revelou haver diferenças significantes na distribuição genotípica global ($p = 0,00001$) e alélica global entre os grupos ($p = 0,00001$), sendo o alelo C considerado o fator de risco para o fenótipo de doença hanseníase *per se*. Na análise genotípica, observa-se uma associação protetora dos genótipos T/C versus C/C (OR=0,25, [IC 95=0,96-0,12], $p = 0,007$) e T/T versus C/C (OR=0,03, [IC 95=0,012-0,09], $p = 0,0001$). A análise de associação alélica mostra uma relevante associação entre a hanseníase e o alelo C (OR=6,26, [IC 95= 4,0-9,77], $p = 0,0001$). As frequências observadas dos alelos T e C, bem como dos genótipos TT, TC e CC nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1040079 do gene PACRG.

(N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
T	192(52,9%)	171(47,1%)	363(54%)
C	266(85,5%)	45(14,5)	311 (46%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
TT	33 (14,41%)	68 (62,96%)	101 (30%)
TC	126 (55,02%)	35 (32,40%)	161(48%)
CC	70 (30,56%)	5 (4,62%)	75(22%)

VII. 3. O POLIMORFISMO PACRG rs1333955 G/A

A análise do polimorfismo G/A no SNP do gene PACRG rs1333955, mostrou frequências alélicas de 0,61 e 0,39 para os alelos G e A respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$).

A análise comparativa entre as frequências feita por regressão logística incondicional não revelou haver diferenças significantes na distribuição genotípica global ($p = 0,4974$) e alélica global entre os grupos ($p = 0,308$). Na análise genotípica, não se observou associação dos genótipos G/A versus A/A (OR=1,32, [IC 95=0,30-2,28], $p = 0,305$) também não foi observada associação nos genótipos G/G versus A/A (OR=1,39, [IC 95=0,79 – 2,44], $p = 0,247$). A análise de associação alélica não mostrou associação entre a hanseníase e o alelo G (OR=1,149, [IC 95= 0,879 – 1,50], $p = 0,309$) e o alelo A (OR=0,870, [IC 95= 0,66 – 1,13], $p = 0,309$). As frequências observadas dos alelos G e A, bem como dos genótipos GG, GA e AA nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 5.

Tabela 5. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1333955 do gene de PACRG.

(N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
G	348(59,2%)	240(40,8%)	588(61%)
A	208(55,9%)	164(44,1%)	372(39%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	105(37,8%)	71 (35,1%)	176 (36%)
GA	138(49,6%)	98 (48,5%)	236 (50%)
AA	35(12,6%)	33(16,3%)	68 (14%)

VII. 4. O POLIMORFISMO PACRG rs9356058 ou PARK2_e01(-2599) C/T

A análise do polimorfismo C/T no SNP rs9356058 ou PARK2_e01(-2599) do gene de PACRG, mostrou frequências alélicas de 0,25 e 0,75 para os alelos C e T respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$).

A análise comparativa entre as frequências feita por regressão logística incondicional revelou não haver diferenças significantes na distribuição genotípica global ($p = 0,068$), no entanto, as análises revelaram haver diferenças significantes na distribuição alélica global entre os grupos ($p = 0,027$), sendo o alelo C considerado o fator de risco para o fenótipo de doença hanseníase *per se*. Na análise genotípica, não se observa uma associação dos genótipos C/T versus T/T (OR=0,933, [IC 95=0,46-1,87], $p = 0,846$) e C/C versus T/T (OR=0,630, [IC 95=0,32-1,24], $p = 0,182$). A análise de associação alélica mostra uma associação entre a hanseníase e o alelo C (OR=1,356, [IC 95= 1,03-1,78], $p = 0,029$). As frequências observadas dos alelos C e T, bem como dos genótipos CC, CT e TT nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs9356058 ou PARK2_e01(-2599) do gene de PACRG.

(N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
C	156(57,8%)	114(42,2%)	270(25%)
T	402(49,9%)	404(50,1%)	806(75%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
CC	23(8,24%)	16(6,2%)	39 (7%)
CT	110(39,4%)	82(31,6%)	192 (36%)
TT	146(52,3%)	161(62,1%)	307(57%)

VII. 5. O POLIMORFISMO PACRG rs6939278 A/C

A análise do polimorfismo A/C no SNP rs6939278 do gene de PACRG, mostrou frequências alélicas de 0,41 e 0,59 para os alelos A e C respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genótípicas observadas e esperadas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$).

A análise comparativa entre as frequências feita por regressão logística incondicional revelou haver diferenças significantes na distribuição genotípica global ($p = 0,00001$) e alélica global entre os grupos ($p = 0,00001$), sendo o alelo C considerado o fator de risco para o fenótipo de doença hanseníase *per se*. Na análise genotípica, observa-se uma associação dos genótipos C/C versus A/C (OR=2,221, [IC 95=1,32-3,71], $p = 0,002$) e C/C versus A/A (OR=3,454, [IC 95=1,99-5,99], $p = 0,0001$). A análise de associação alélica mostra uma associação entre a hanseníase e o alelo C (OR=1,790, [IC 95= 1,37-2,32], $p = 0,0001$). As frequências observadas dos alelos A e C, bem como dos genótipos AC, CC e AA nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 7.

Tabela 7. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas observadas para o polimorfismo rs6939278 do gene PACRG.

(N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
A	195(44%)	248(56%)	443 (41,5%)
C	357(57,3%)	266(42,7%)	623 (58,5%)
(N) Frequências Genótípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
AA	27(9,8%)	57(22,1%)	84 (16%)
AC	141(51%)	134(52,1%)	275 (51%)
CC	108(39,1%)	66(25,7%)	174 (33%)

VII. 6. O POLIMORFISMO PARK2 rs1801334 G/A

A análise do polimorfismo G/A no SNP do gene PARK2 rs1801334, mostrou frequências alélicas de 0,13 e 0,87 para os alelos G e A respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$).

Não foi possível a realização da análise de comparação das frequências genotípicas por regressão logística incondicional devido à ausência do genótipo A/A na coorte de casos. No entanto, a análise revelou haver diferenças significantes na distribuição alélica global entre os grupos ($p = 0,0001$), sendo o alelo A considerado o fator de risco para o fenótipo de doença hanseníase *per se*. A análise de associação alélica mostrou uma importante associação entre a hanseníase e o alelo A (OR=8,750, [IC 95= 5,22-14,64], $p = 0,0001$). As frequências observadas dos alelos e genótipos G e A nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 8.

Tabela 8. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1801334 do gene PARK2.

(N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
G	20(15,2%)	112(84,8%)	132(13%)
A	542(61,5%)	340(38,5%)	882(87%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	0	15(6,63%)	15 (3%)
GA	20(7,1%)	82(36,2%)	102 (20%)
AA	261(92,8%)	129(57%)	390 (77%)

VII. 7. O POLIMORFISMO PARK2 rs1801582 G/C

A análise do polimorfismo G/C no SNP do gene PARK2 rs1801582, mostrou frequências alélicas de 0,13 e 0,87 para os alelos G e C respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$).

A análise comparativa entre as frequências feita por regressão logística incondicional revelou haver diferenças significantes na distribuição genotípica global ($p = 0,018$), no entanto não houve diferenças significantes na distribuição alélica global entre os grupos ($p = 0,314$). Na análise genotípica, observou-se uma fraca associação dos genótipos G/C versus C/C (OR=0,228, [IC 95=0,05-0,90], $p = 0,035$), no entanto não foi observada associação nos genótipos G/G versus C/C (OR=0,365, [IC 95=0,09-1,39], $p = 0,142$). A análise de associação alélica não mostrou associação entre a hanseníase e o alelo G (OR=1,198, [IC 95= 0,84 – 1,70], $p = 0,316$). As frequências observadas dos alelos G e C, bem como dos genótipos GC, CC e GG nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 9.

Tabela 9. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1801582 do gene PARK2.

(N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
G	61(43,3%)	80(56,7%)	141(13,4%)
C	435(47,9%)	474(52,1%)	909(86,5%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	8(3,2%)	3(1,1%)	11 (2%)
GC	45(18,1%)	74(26,7%)	119 (23%)
CC	195(78,6%)	200(72,2%)	395 (75%)

VII. 8. O POLIMORFISMO NOS MARCADORES PACRG rs6915128 C/T e PARK2 rs1801474 G/A

Em relação ao marcador PACRG rs6915128, o SNP apresentou-se fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg na nossa população e, portanto, o mesmo foi excluído da análise. Por outro lado, o marcador no gene de PARK2 rs1801474, apesar de estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado que 99% dos indivíduos eram homozigotos para o alelo 1, o que leva a concluir que se trata de um marcador monomórfico e que não adiciona nenhuma informação que seja relevante à população estudada. Esse marcador também foi excluído das nossas análises.

VII. 9. A ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O desequilíbrio de ligação (DL) é um fenômeno importante nas análises de associação genética porque faz a correlação de marcadores localizados a curtas regiões no genoma. O princípio é de que se um alelo *A* ocorre perto de um marcador polimórfico tendo o alelo *G*, a maioria dos cromossomos portadores de *A* também carregam o alelo *G*. Assim, têm-se duas oportunidades para detectar associação com a doença por genotipagem: *A* ou *G*. Intuitivamente, o DL mede a correlação entre SNPs. Nós fizemos a análise do desequilíbrio de ligação para os marcadores de PARK2 e PACRG genotipados em nossa amostra com o objetivo de esclarecer se os mesmos estavam ou não ligados e, portanto, se poderiam estar “alvejando” a mesma variável ou fator etiológico. Nesta análise, utilizamos o programa Haploview 4.2, e consideramos como medida de ligação os valores do R^2 , que considera a frequência alélica entre os marcadores. Nesse caso, um valor de R^2 acima de 80 é indicativo de forte DL de ligação entre os marcadores; Acima

de 60, essa ligação é considerada moderada e, abaixo desse valor, não é considerada DL. Os resultados mostram que o marcador rs1040079 é independente (não está em DL) com nenhum outro marcador do bloco. Por outro lado, existe um desequilíbrio de ligação forte entre os marcadores rs1801334 e rs9356058 e moderado entre os marcadores rs1801334 e rs6939278.

Adicionalmente, foi também observada uma associação forte entre os marcadores rs9356058 e rs6939278. Essa ligação indica uma relação de interdependência entre estes marcadores. Isso por sua vez é um indicador de que além de uma frequência alélica similar, estes SNPs em DL podem estar ligados à mesma variante ou fator etiológico causal de doença. Em outras palavras, para esses três SNPs em questão (rs1801334, rs9356058 e rs6939278) a associação estatística observada pela análise de regressão logística pode se dever a apenas um deles, sendo os demais efeitos causados pelo DL. Nesse caso, somente uma análise do tipo Intralocus pode identificar o marcador que melhor se associa à doença no bloco. Essa relação entre marcadores é diferente do que ocorre com o rs1040079, fortemente associado com a doença e que parece contribuir como um fator de risco independente na população avaliada. Finalmente, observa-se uma ligação moderada entre os marcadores rs1801474 e rs6915128. Entretanto, esses dois SNPs foram excluídos da análise, um por estar fora do EHW (rs6915128) e o outro por ser monomórfico na população (rs1801474). Dois marcadores não aparecem representados nos mapas, rs1333955 e rs1801502, possivelmente porque estão geneticamente distantes e localizados em outra “bin” ou bloco. A figura 7 mostra os mapas de DL para a população do estudo com as medidas em R^2 .

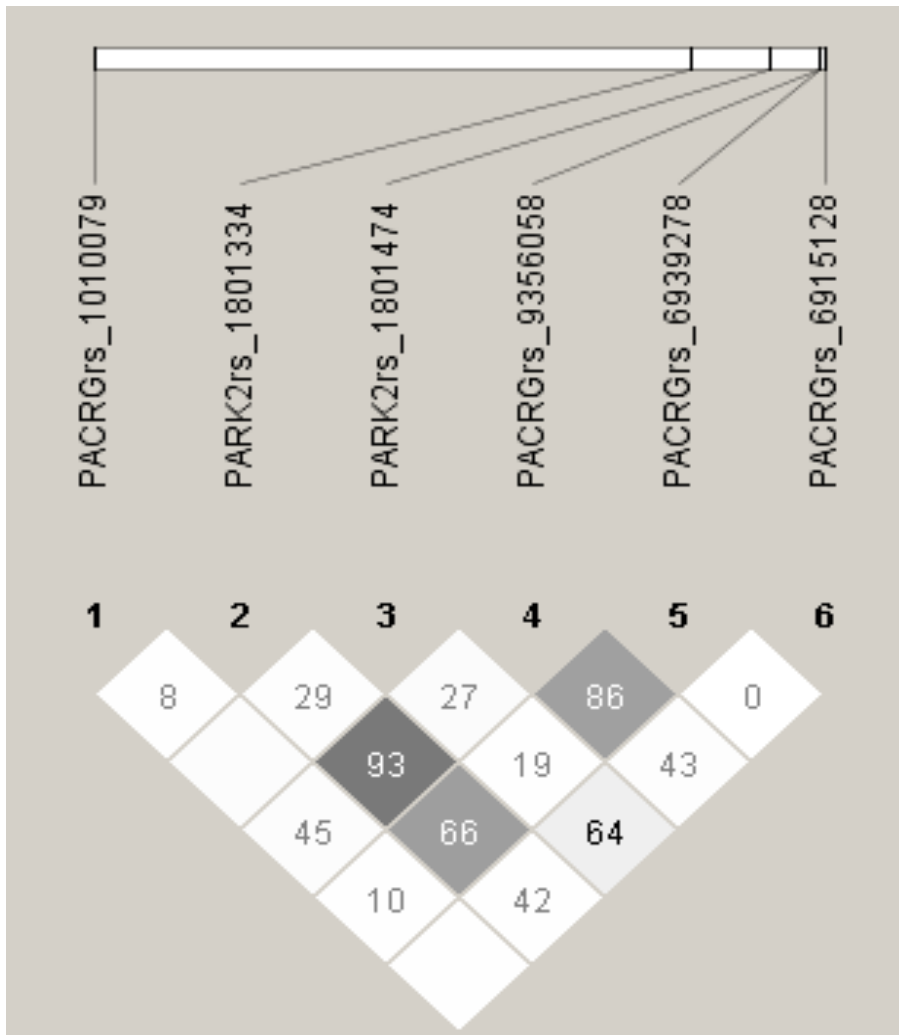


Figura 7. Mapa do desequilíbrio de ligação entre os marcadores testados. Foi feita a análise do desequilíbrio de ligação entre os marcadores utilizando-se o programa Haploview v4.2. A medida de ligação está expressa em valores de R^2 nos losangos entre os marcadores da população avaliada. Observa-se uma não ligação do SNP rs1040079 com os outros marcadores do bloco e, de um bloco de DL entre os SNPs rs1801334, rs9356058 e rs6939278, assim como uma ligação moderada entre os SNPs não analisados, rs1801474 e rs6915128.

VII. 10. ANÁLISE INTRALOCUS

Os resultados anteriores mostraram a análise dos marcadores focada na relação entre os mesmos considerando uma região genética curta (e potencialmente em DL), porém a análise de múltiplos marcadores através do genoma também é importante para identificar a interação entre os genes ou SNPs como fatores de risco de doença. Análise de interação pode ser definida como a medida de interdependência dos efeitos em dois loci. O objetivo desta análise foi avaliar os efeitos dependentes de um marcador sobre o outro, se estão alvejando a mesma variável ou haplótipo ou se a relação de associação apresentada com a doença é independente. Nesta análise, foi possível verificar se esses marcadores agiam como “fatores causais” separados dos outros que foram avaliados na população. Na análise de interação, complemento das análises de DL, foi feita por regressão logística e confirma que o SNP rs1040079 adiciona efeitos independentes em relação aos outros SNPs analisados e vice-versa. O SNP rs1801334 adiciona efeitos independentes em relação à rs1040079, rs9356058, rs6939278 e rs1801502. Entretanto os marcadores rs9356058 e rs6939278 são dependentes do rs1801334. Assim, a associação estatística observada para esses dois marcadores é consequência da ligação com o SNP rs1801334. Finalmente, o marcador rs1801502 adiciona efeitos independentes sobre os SNPs rs1040079, rs18011334, mas não sobre os demais. A Tabela 10 mostra as análises intralocus realizadas entre os SNPs.

Tabela 10. Análise intralocus entre os marcadores de PARK2 e PACRG

MODELO NULO	MODELO ALTERNATIVO	TESTE ROBUSTO		
		X ²	GL	P
rs1040079	rs1040079 x rs6939278	69,37	1	P< 0,00001
rs1040079	rs1040079 x rs9356058	80,36	1	P< 0,00001
rs1040079	rs1040079 x rs1801334	57,88	1	P< 0,00001
rs1040079	rs1040079 x rs1801502	60,34	1	P< 0,00001
rs6939278	rs6939278 x rs1040079	3,75	1	0,052
rs9356058	rs9356058 x rs1040079	6,43	1	0,011
rs1801334	rs1801334 x rs1040079	6,58	1	0,01
rs1801502	rs1801502 x rs1040079	3,69	1	0,054
rs1801334	rs1801334 x rs9356058	21,32	1	P< 0,00001
rs1801334	rs1801334 x rs6939278	21,52	1	P< 0,00001
rs1801334	rs1801334 x rs1801502	25,91	1	P< 0,00001
rs9356058	rs9356058 x rs1801334	0,29	1	0,587
rs6939278	rs6939278 x rs1801334	0,13	1	0,72
rs1801502	rs1801502 x rs1801334	4,94	1	0,026
rs9356058	rs9356058 x rs6939278	0,06	1	0,809
rs6939278	rs6939278 x rs9356058	0,02	1	0,877
rs1801502	rs1801502 x rs9356058	2,61	1	0,105
rs9356058	rs9356058 x rs1801502	0,1	1	0,757
rs1801502	rs1801502 x rs6939278	2,63	1	0,106
rs6939278	rs6939278 x rs1801502	0,12	1	0,732

Tabela 10. Várias combinações possíveis foram feitas entre os SNPs com o objetivo de avaliar se os mesmos adicionavam efeitos dependentes um sobre o outro, isto é, se estariam alvejando a mesma variável ou haplótipo ou se a relação de associação apresentada com a doença era independente.

VII. 11. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão dos genes PARK2 e PACRG foi comparada entre pacientes com e sem reação hansênica (hanseníase *per se* versus RR e ENH) e entre controles sadios do HEMOBA e pacientes com e sem reação (controles *versus* hansen *per se*, RR e ENH). Vale ressaltar que os experimentos foram realizados com leucócitos totais *ex vivo* e não com células estimuladas. Nestas condições, a expressão para o gene PARK2 foi de aproximadamente 55% dos indivíduos analisados e para PACRG aproximadamente 25% das amostras totais.

Foi observado que embora a expressão *ex vivo* dos genes PARK2 e PACRG ter sido menor nos indivíduos que desenvolveram reação, principalmente o ENH, essa diferença não foi estatisticamente significativa (hanseníase *per se* versus RR: PARK2 $p=0,735$ e PACRG $p=0,412$, respectivamente; hanseníase *per se* versus ENH: PARK2 $p=0,196$ e PACRG $p=0,485$, respectivamente), sugerindo que o fato de os indivíduos desenvolverem reação, altera, mas não de forma relevante os níveis de expressão gênica das parkinas, como observado na Figura 8 (A) e (B).

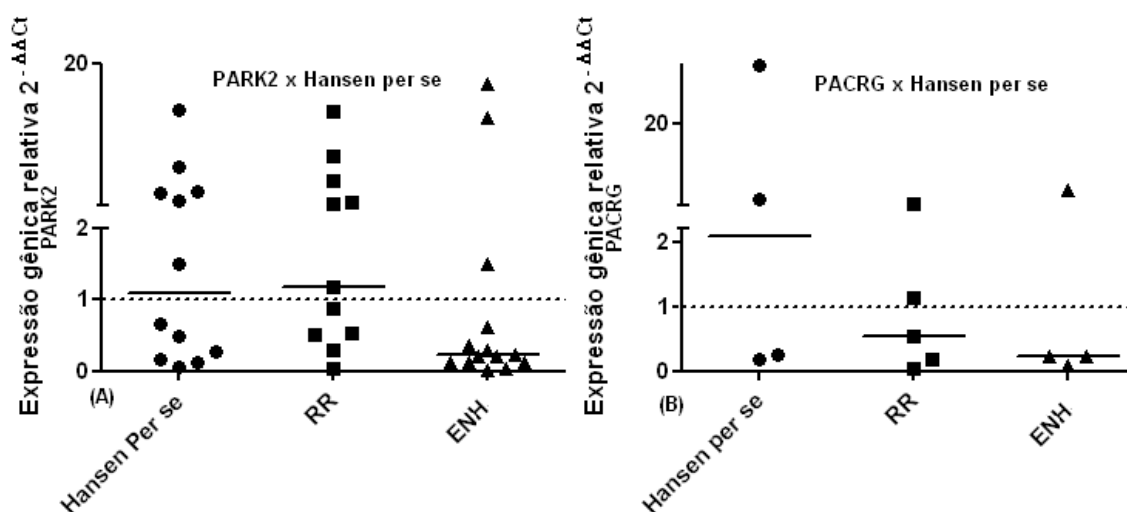


Figura 8. Expressão gênica relativa para PARK2 (A) e PACRG (B) entre os indivíduos afetados pela hanseníase sem e com reação hansênica. PCR em tempo real realizado de cDNA

obtido de RNA extraído *ex vivo* de leucócitos totais de pacientes sem reação e com reação do tipo I (RR) e do tipo II (ENH). Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo hansen *per se* após normalização da expressão gênica da β -actina. A linha tracejada corresponde a uma expressão igual ao do grupo controle, neste caso, pacientes sem reação hansen. Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo. Os dados foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Apesar de os indivíduos com reação (especialmente no ENH) expressarem menos PARK2 e PACRG em relação aos indivíduos sem reação, essa diferença não foi significativa.

Em relação ao grupo de controles saudáveis, foi observado que os mesmos expressam mais, tanto PARK2 como PACRG, em relação aos pacientes, mas essa diferença foi significativa apenas na comparação de PARK2 entre controles e pacientes com ENH (Controles *versus* ENH: PARK2 $p=0,023$) e quanto a PACRG essa diferença foi significativa na comparação entre controles e pacientes com RR (Controles *versus* RR: PACRG $p=0,021$), de acordo com a Figura 9 (A) e (B).

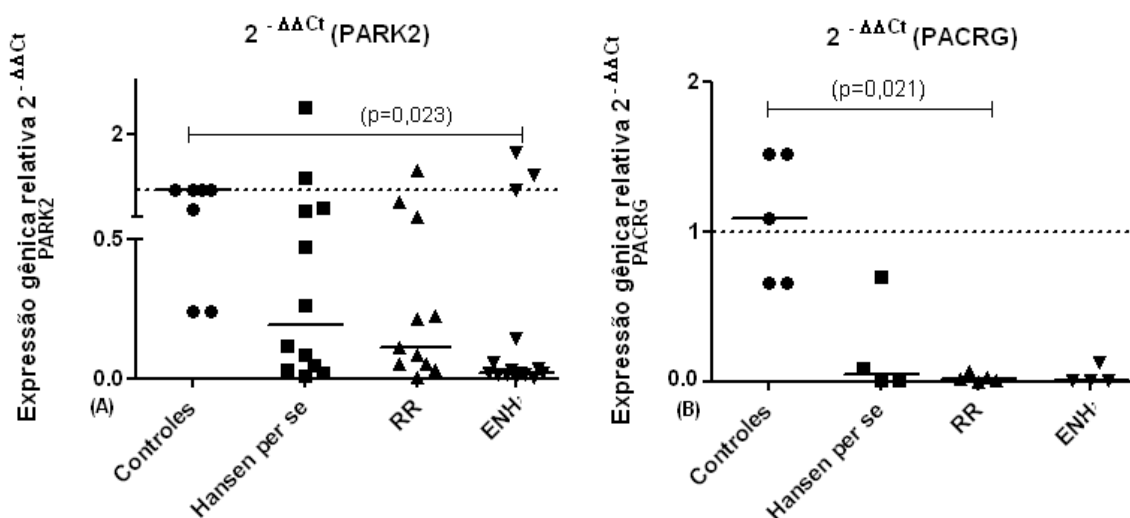


Figura 9: Expressão gênica relativa para PARK2 (A) e PACRG (B) em relação aos os controles saudáveis. PCR em tempo real realizado de cDNA obtido de RNA extraído *ex vivo* de leucócitos totais de controles saudáveis, pacientes sem reação e com reação do tipo I (RR) e do tipo II (ENH). Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo controle sadio após normalização da expressão gênica da β -actina. A linha tracejada corresponde a uma expressão igual ao do grupo controle, os doadores de sangue. Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo. Os dados foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os grupos hansen *per se*, reação do tipo I (RR) e do tipo II (ENH) expressaram menos PARK2 e PACRG em relação aos indivíduos sem a doença, no entanto a comparação do grupo ENH em relação aos controles

para o gene PARK2 e o grupo RR em relação aos controles para o gene PACRG foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

Contudo, na comparação de controles e pacientes, isto é, juntando todos os pacientes em um só grupo, conforme Figura 10(A) e (B), observamos uma diferença de expressão estatisticamente significativa para os dois genes (controles *versus* pacientes: PARK2 $p = 0,0071$ e PACRG $p = 0,0077$, respectivamente).

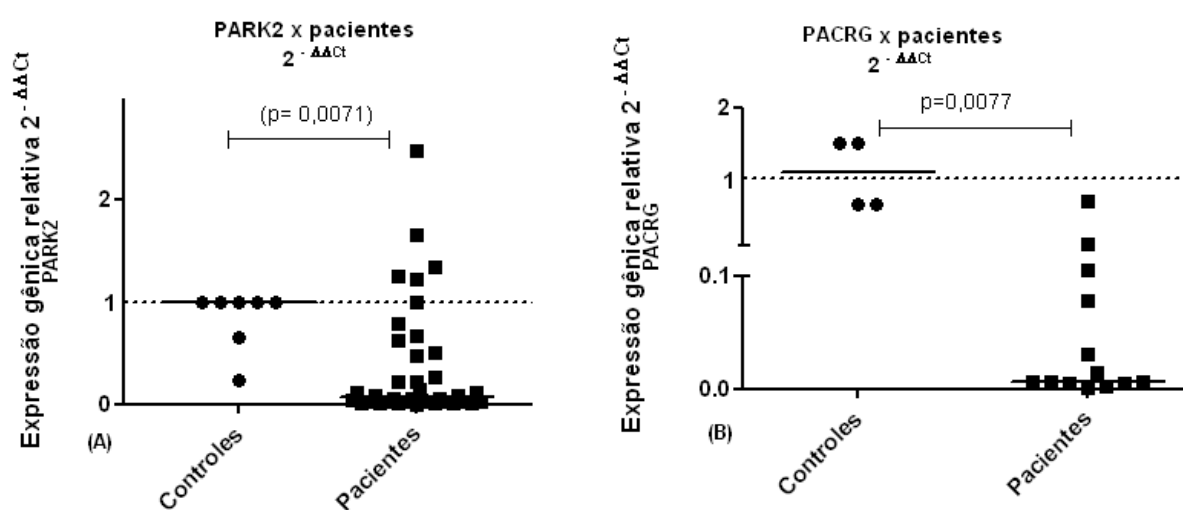


Figura 10: Expressão gênica relativa para PARK2 (A) e PACRG(B) com os controles sadios *versus* pacientes. PCR em tempo real realizado de cDNA obtido de RNA extraído *ex vivo* de leucócitos totais de controles sadios e pacientes (com e sem reação). Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo controle sadio após normalização da expressão gênica da β -actina. A linha tracejada corresponde a uma expressão igual ao do grupo controle, os doadores de sangue. Acima da linha, a expressão. Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo. Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney. A expressão gênica entre o grupo de pacientes em relação aos controles sadios é menor para PARK2 e PACRG e foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Foi também comparada a expressão gênica dos 60 indivíduos genotipados (esse grupo não inclui os doadores do HEMOBA), em relação aos polimorfismos considerados mais relevantes. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de PARK2 e PACRG entre portadores dos diferentes genótipos do marcador rs1040079 (PARK2 $p = 0,958$ e PACRG $p = 0,757$, respectivamente), conforme Figuras 11(A) e (B); Da mesma

forma em relação ao marcador rs1801334, PARK2 $p=0,701$, Figura 12. Como os indivíduos que expressaram PACRG eram todos GG para este marcador, não foi possível confeccionar um gráfico de expressão para esse gene em relação ao rs1801334. Para o marcador PARK2_e01(-2599), também não houve diferença na expressão gênica entre os diferentes genótipos. (PARK2 $p=0,489$ e PACRG $p=0,083$, respectivamente), conforme Figuras 13(A) e (B), respectivamente.

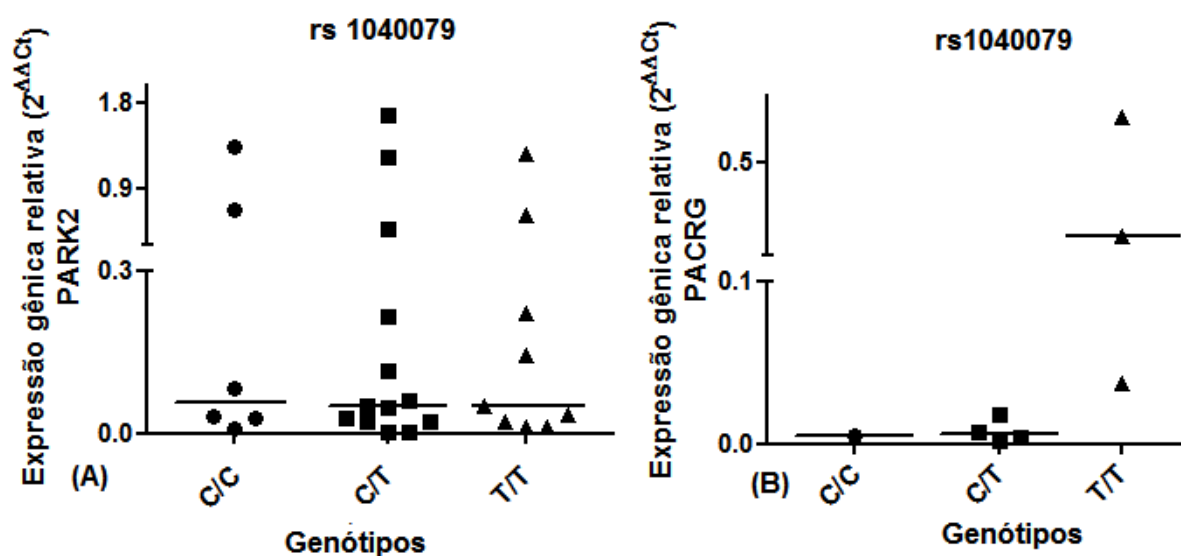


Figura 11. Expressão gênica de PARK2(A) e PACRG(B) para o marcador rs1040079. PCR em tempo real realizado de cDNA obtido de RNA extraído ex vivo de leucócitos totais de pacientes (com e sem reação) e controles saudáveis. Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo controle sadio após normalização da expressão gênica da β -actina. Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo em relação aos diferentes genótipos C/C, C/T e T/T. Os dados foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Não houve diferença significativa em relação à expressão gênica entre portadores dos diferentes genótipos para o marcador PARK2 rs1040079 (PARK2 $p=0,958$ e PACRG $p=0,757$, respectivamente).

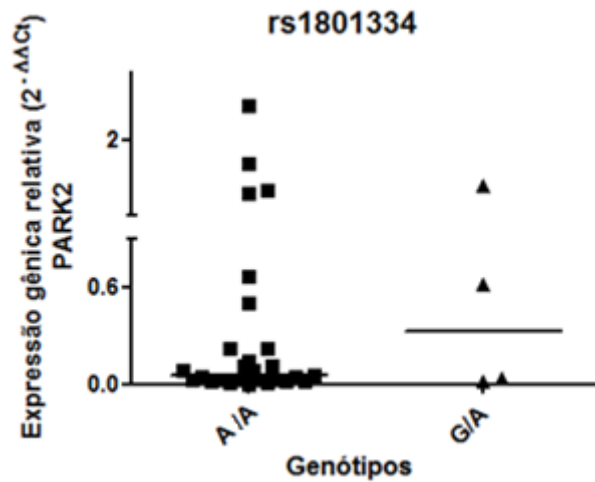


Figura 12. Expressão gênica de PARK2 para o marcador rs1801334. PCR em tempo real realizado de cDNA obtido de RNA extraído ex vivo de leucócitos totais de controles saudáveis e pacientes (com e sem reação). Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo controle saudável após normalização da expressão gênica da β -actina. Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo em relação aos diferentes genótipos A/A e G/A. Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney. Não houve diferença significativa na expressão gênica entre portadores dos diferentes genótipos para o marcador rs1801334 ($p=0,701$). Não foi possível confeccionar o gráfico com a mesma comparação para o gene PACRG devido ao fato de que todos os pacientes que o expressaram compartilham apenas o genótipo GG.

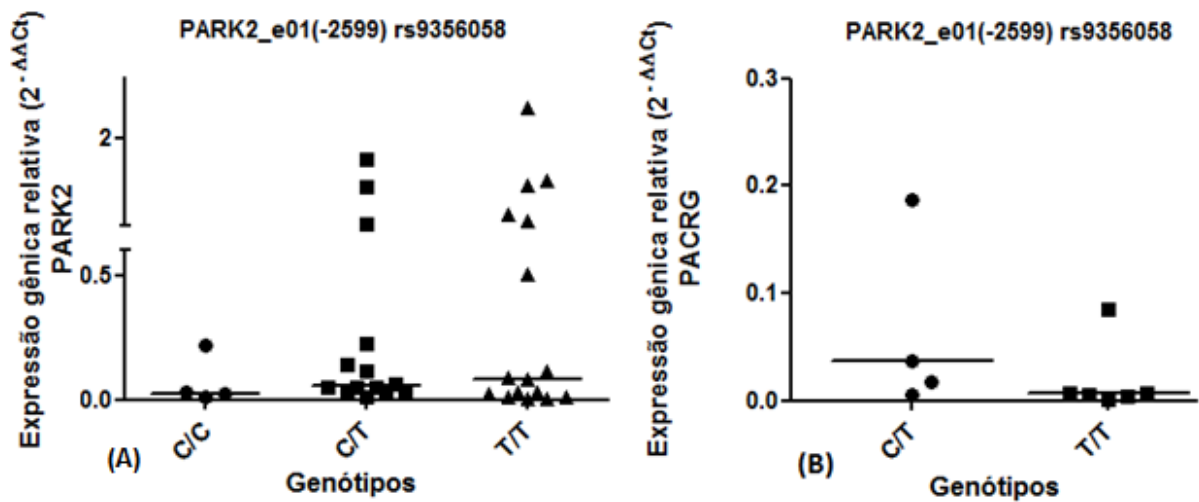


Figura 13. Expressão gênica de PARK2(A) e PACRG(B) para o marcador PARK2_e01(-2599) rs9356058. PCR em tempo real realizado de cDNA obtido de RNA extraído ex vivo de leucócitos totais de controles saudáveis e pacientes (com e sem reação). Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo controle saudável após normalização da expressão gênica da β -actina. Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo em relação aos diferentes genótipos C/C, C/T e T/T. Os dados foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para a análise de PARK2 e analisados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para o PACRG. Não houve diferenças significativas nessa comparação (PARK2 $p=0,489$ e PACRG $p=0,083$, respectivamente).

VIII. DISCUSSÃO

Em muitos países, doenças infecciosas como a tuberculose, malária e hanseníase são um problema de saúde pública relevante devido às taxas elevadas de infecção, morbidade e mortalidade registradas. A hanseníase se constitui ainda em grave problema em diversos países em desenvolvimento a despeito dos avanços na compreensão da sua imunopatogênese e da introdução da poliquimioterapia nos anos 1980. De acordo com relatórios oficiais recebidos de 115 países e territórios o número de casos novos detectados durante 2012 foi de 232.857 (excluindo o pequeno número de casos em Europa) de acordo com a OMS. O Brasil responde por 14% destes números sendo, portanto, considerado endêmico para essa infecção (OMS, 2013).

As doenças infecciosas são multifatoriais, sofrendo a influência de um grande número de variáveis que determinam o fenótipo clínico observado. Entre estas, podemos destacar fatores de exposição ambiental ligados a hábitos sócio-culturais, ocupacionais e de moradia das populações, fatores nutricionais, interações com outras doenças regionais e fatores genéticos que podem contribuir para o aumento da susceptibilidade ou resistência do indivíduo, bem como influenciar a forma clínica da doença (MONOT, M.; HONORE, N.; *et al.*, 2005; MOET, F.J.; PAHAN. D.; *et al.*, 2006). No caso das doenças infecciosas, tais fatores de exposição ganham uma relevância ainda maior, haja vista que o risco de concordância entre irmãos é menor, há dependência de um agente infeccioso essencial e para muitas, também a presença de um vetor de transmissão (SIDDIQUI; MEISNER *et al.*, 2001).

A resposta imune montada pelo hospedeiro contra o *M. leprae* está associada ao fenótipo clínico apresentado pelo paciente. Assim, no pólo tuberculóide, poucas lesões

cutâneas se associam a uma baixa carga bacilar e à presença da resposta imune celular contra o bacilo de Hansen. No outro pólo da doença, a forma lepromatosa, o quadro clínico de lesões disseminadas está associado a uma alta carga bacilífera e ausência de resposta imune celular. Entre esses extremos, encontramos pacientes com formas clínicas que são ditas “*borderline*” e de difícil caracterização imunológica. Diversos estudos sugerem que a susceptibilidade ao *Mycobacterium tuberculosis* e a *M. leprae* seja geneticamente regulada em humanos (SIDDIQUI, MEISNER *et al.*, 2001; BLACK, WEIR *et al.*, 2003; FITNESS, FLOYD *et al.*, 2004; FINE, 2007). A identificação dos genes e a compreensão do mecanismo pelo qual duas pessoas com o mesmo grau de exposição ao *M. leprae* diferem com relação à evolução, seja para doença ou resolução, poderiam auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de intervenção terapêutica e controle. Nesse contexto, pesquisas têm identificado diversas variantes genéticas como biomarcadores de risco à hanseníase por meios de estudos de associação, de ligação e de escaneamento do genoma (GWAS). Muitos desses marcadores tiveram sua relevância validada por meio de análise de via ou por estudos funcionais (TODD, WEST, *et al.*, 1990; ZHANG, HUANG, *et al.*, 2009; WONG, GOCHHAIT *et al.*, 2010).

O presente estudo validou a papel da região regulatória dos genes PARK2 e PACRG previamente associados com hanseníase em uma população brasileira (MIRA, ALCAÏS *et al.*, 2004), em outra população geograficamente distinta, no estado da Bahia. Os marcadores PACRG rs1040079, PARK2 rs1801334, PACRG rs6939278 e PACRG rs9356058 (-2599) foram altamente associados com o fenótipo clínico Hansen *per se*. A análise intralocus e do desequilíbrio de ligação mostrou que os marcadores rs1040079 e rs1801334 adicionam efeitos independentes em relação a todos os outros marcadores testados, indicando que contribuem de forma independente como fatores etiológicos da doença. Por outro lado, os marcadores rs6939278 e rs9356058 apresentam desequilíbrio

de ligação moderado a forte com o SNP rs1801334 e a análise intra-locus mostra que seus efeitos são dependentes do mesmo. Esses dados indicam que a associação observada para estes marcadores é consequência do desequilíbrio de ligação com este último (rs1801334). Uma associação também independente, porém fraca, foi observada para o marcador PARK2 rs1801502. Nesse caso, um aumento da coorte de casos e controles e uma reanálise dos dados pode não sustentar ou vir a confirmar essa associação.

Os marcadores avaliados nesse estudo foram também associados à doença em uma coorte de famílias do Vietnã, mas não nas populações da Índia e da China. Resultados conflitantes são comuns em estudos de associação genética por vários fatores: Os estudos são geralmente realizados com populações etnicamente diferentes e como consequência dessa heterogeneidade genética, a frequência alélica entre populações é altamente variável, tornando-os muitas vezes “bons candidatos” em algumas populações, mas não em outras; Diferentes polimorfismos no mesmo gene podem estar associados com a doença em diferentes populações, porque o polimorfismo estudado não é ele mesmo funcional em muitos casos, mas está em desequilíbrio de ligação com a variante funcional. Como o padrão de DL varia consideravelmente entre diferentes populações, tais associações também tendem a variar (NEWPORT, 2003; SHIFMAN, KUYPERS *et al.*, 2003); Cada indivíduo pode responder de maneira distinta a partir da interação com os componentes ambientais, de modo que essa variação interindividual poderia interferir na especificidade da ativação gênica. Assim, a contribuição relativa de genes específicos para um dado fenótipo de doença é também variável. Não obstante, a validação da associação de um gene quando ocorre em mais uma população, fortalece o papel do mesmo como um potencial biomarcador relevante da doença. Recentemente, Chopra e colaboradores, 2013 fizeram o mapeamento fino dos genes PARK2 e PACRG, genotipando 96 SNPs em duas populações geograficamente distintas da Índia. Esse

estudo revelou que diferenças étnicas, somadas às diferenças na estrutura dos blocos de desequilíbrio de ligação das populações é um fator determinante para a associação observada com diferentes marcadores dentro dos mesmos genes. 11 SNPs em 2 blocos de PARK2 e PACRG foram associados à hanseníase na Índia. Entretanto, estes marcadores não se sobrepunham aos marcadores mapeados no estudo conduzido nas populações brasileira e vietnamita. Considerando apenas achados genéticos, o “background” étnico e a distância geográfica entre as populações, torna-se evidente a contribuição das Parkinas na patogênese da hanseníase.

Zhang e colaboradores (2009) realizaram o primeiro estudo de associação do tipo “genome-Wide” em hanseníase, em uma coorte de indivíduos chineses. Seis genes foram identificados como fatores de risco do hospedeiro, incluindo a associação entre hanseníase e variações em genes da via de sinalização de NOD2, a qual ativa NF- κ B. O GWAS também levou ao mapeamento de variantes de risco no gene RAB32 do cromossomo 6 e no locus C1orf141 - IL23R no cromossomo 1. Não foram detectadas associações significantes com PARK2 e PACRG. Entretanto, análise de via funcional mostrou que variantes de PARK2 e LRRK2 (um gene de susceptibilidade sugestivo no GWAS), interagem diretamente, evidenciando que pode haver uma contribuição ainda que indireta, de PARK2 na susceptibilidade à hanseníase também na população chinesa. As Parkinas são proteínas multifuncionais com um papel importante na proteólise de proteínas danificadas, mas também com funções celulares tão divergentes como controle do ciclo celular, apoptose, controle da função mitocondrial e autofagia (MARIN, LUCAS *et al.*, 2004; ABOU-SLEIMAN, MUQIT *et al.*, 2006). Dados de microarray mostram que as Parkinas desempenham um papel como molécula imunoreguladora, levando a uma redução da expressão de genes da resposta imune. Na hanseníase, PARK2 teria um efeito protetor durante a infecção, de prevenir a apoptose, mas também de promover a morte

bacteriana por autofagia. Adicionalmente, dados de que variantes funcionais na região de PARK2 reduzem a expressão desse gene, sugerem em contrapartida uma regulação positiva de genes inflamatórios, dados corroborados pela associação do efeito maior das Parkinas com a forma multibacilar da doença (CHOPRA, ALI *et al.*, 2013). Em adição, várias ubiquitinas estão associadas à modulação de citocinas como IL-2 e de células T anérgicas (MUELLER, 2004).

Nós avaliamos em leucócitos totais *ex vivo* a expressão dos genes PARK2 e PACRG em indivíduos sem reação hansênica, indivíduos com RR, ENH e controles saudáveis, doadores de banco de sangue. Nossas análises mostraram que embora não substancialmente diferente entre os pacientes com hanseníase (Hansen *per se*, RR e ENH) ($p > 0,05$), a expressão de PARK2 e PACRG foi significativamente menor nos pacientes em relação aos controles ($p = 0,007$), sugerindo que na nossa população esse gene também tem a expressão reduzida nos indivíduos afetados. Nós também avaliamos entre os pacientes genotipados, a expressão de PARK2 e PACRG estratificando os indivíduos de acordo com os diferentes genótipos para os marcadores rs1040079 (T/T, T/C e C/C), rs1801334 (G/G, G/A e A/A) e rs9356058 (T/T, T/C e C/C). Nossos resultados não mostram diferenças no perfil de expressão gênica em relação a essas células ($p > 0,05$), de acordo com os diferentes genótipos. Entretanto, é digno de nota de que essa expressão gênica foi medida em células *ex vivo*, assim, nesse tipo de experimento, a informação obtida é uma “fotografia” do momento. Alguns por exemplo, eram virgens de tratamento, outros já o haviam iniciado. Apenas um percentual de indivíduos estava expressando os genes, na referida amostra. Além disso, a pequena amostra pode interferir nesses resultados. Dessa forma, uma repetição dos experimentos com células devidamente tratadas e cultivadas com e sem estímulos específicos de *M. leprae* dos pacientes e controles poderá trazer novos resultados em relação à estratificação pelos genótipos mais

fortemente associados à doença na população. De todo o modo, é relevante o dado de que em relação a doadores saudáveis, a expressão das parkinas é menor nos pacientes, pois isso reforça o papel destes genes em prevenir o desenvolvimento de doença. Nesse caso, os pacientes teriam um fenótipo de menor produção desses genes.

O desenho do estudo mais simples usado para testar associação genética é o estudo de caso-controle, no qual uma série de casos afetados com a doença de interesse é coletada junto com uma série de indivíduos controle. A escolha específica do fenótipo para os casos pode definir a hipótese exata a ser testada e a aplicação de critérios clínicos consistentes na seleção assegura um conjunto homogêneo de casos (LEWIS; KNIGHT, 2009). Os controles por outro lado, são geralmente amostras de indivíduos não afetados da mesma população. Sabidamente, os estudos de caso-controle em genética são mais sujeitos a viés de seleção em relação aos estudos de base familiar. Este viés é causado principalmente por causa da estratificação da população, um importante fator confundidor gerado pela falta de pareamento ancestral. Nesse estudo, utilizamos controles endêmicos de uma área de leishmaniose. Reconhecemos as limitações que podem advir dessa amostra pelo fato de haver uma exposição em relação a outro agente infeccioso, nesse caso, *Leishmania braziliensis*. Contudo, na nossa população de casos há também muitos indivíduos que vem de outros municípios do estado da Bahia, pois em Salvador estão os maiores centros de referência para o tratamento da hanseníase. Muitos desses lugares também são endêmicos para outras infecções como parasitoses variadas, por exemplo. O fato é que estudos populacionais serão sempre sujeitos a problemas de heterogeneidade genética, o que é evitado em estudos familiares pelo parentesco entre os indivíduos. Fatores que colaboram para contornar o problema no desenho de estudo são geralmente, o recrutamento de largas coortes, estudos de famílias (FBAT) e validação dos dados genéticos por meio de estudo funcional. No nosso caso, fizemos cálculo de poder que nos

asseguraram boa margem de poder com a amostra coletada e um estudo piloto de expressão gênica. Corte de Pedra por sua vez, não é endêmica para a hanseníase.

Diante do exposto, é fundamental considerar que: (1) a partir de experimentos *in vitro*, os polimorfismos avaliados neste trabalho (assim como a maioria dos já descritos na literatura) tiveram sua função avaliada na doença. Assim, não é possível afirmar com certeza que *in vivo*, diante da pressão de uma série de fatores atuando simultaneamente, estas variantes alélicas irão se comportar diferentemente em relação ao seu alelo complementar; (2) Como já mencionado, nas doenças de herança poligênica, genes que podem estar ou não em desequilíbrio de ligação, contribuem com um efeito menor no fenótipo de doença observado depois que estes genes são ativados por fatores ambientais externos. Assim, não se pode atribuir ao polimorfismo de um gene apenas a participação no desenvolvimento de uma patologia multifatorial porque muitos elementos devem estar envolvidos. Apesar disso, observamos a associação dos genes PARK2 e PACRG na população afetada da Bahia e corroboramos o papel de variantes estruturais destes genes já observadas em outras populações distintas como fatores de risco global para a hanseníase. Em adição, mostramos que pacientes expressam menos PARK2 e PACRG em relação a indivíduos saudáveis. Esses achados validam as Parkinas como importantes na imunopatogênese da doença. De fato, alterações nos processos de ubiquitinação, apoptose e autofagia poderiam tornar o ambiente permissivo para o crescimento de *M. Leprae* na célula hospedeira. Nesse contexto, outros estudos de base funcional, serão importantes para elucidar os mecanismos de ação desses genes em linhagens infectadas pelo bacilo.

IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Esse trabalho integra um projeto de pesquisa que tem como objetivo identificar biomarcadores genéticos e imunológicos na hanseníase. Há cerca de três anos, uma coorte de casos vem sendo formada e objetivamos nos próximos anos, dar continuidade à coleta de pacientes com o propósito de elevar a qualidade amostral do nosso estudo, assim como avaliar outros genes candidatos, cujo papel na resposta imune do hospedeiro está bem estabelecido em relação à doença. Em adição, objetivamos desenvolver estudos funcionais que consubstanciem nossos dados genéticos. Para isso, além de DNA genômico, estamos também estocando soro e células dos pacientes para estudos moleculares que nos esclareçam melhor a relação entre variações estruturais do DNA e a consequência no produto proteico final na patogênese da hanseníase.

X. CONCLUSÕES

1. A análise de marcadores polimórficos (SNPs) confirma a associação dos genes PARK2 e PACRG com a hanseníase em uma população do estado da Bahia.
2. A expressão gênica *ex vivo* de células mononucleares do sangue periférico de PARK2 e PACRG é menor em pacientes comparados a controles sadios.
3. Os dados obtidos corroboram o papel de PARK2 e PACRG como possíveis fatores de risco de susceptibilidade na hanseníase.

XI. SUMMARY

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, being influenced by genetic and environmental factors. This infection has a broad clinical and immunological spectrum that might cause to patients high morbidity rates, which has major impact on public health. This work has the aims of to evaluate by a case-control study the association of PARK2 and PACRG genes in the leprosy in an affected population of the state of Bahia and to check if there are differences in the expression of these genes between individuals affected with leprosy in relation to health controls. By using the candidate gene strategy, markers (SNPs) previously associated with leprosy populations from Brazil and Vietnam were selected for PARK2 and PACRG genes. 329 individuals diagnosed for Leprosy and 332 individuals without the disease were recruited. The genotyping of markers was performed by PCR Snapshot[®] from Applied Biosystems; The study of gene expression was performed by TaqMan[®] RT-PCR in 60 leprosy patients divided into groups of 20 individuals without reaction (hansen *per se*), 20 subjects with type I and 20 with type II reactions. In addition to these, 20 healthy blood donors were used as controls. Association methods were used to analyze the data. For the genetic study, unconditional logistic regression implemented by the program STATA v. 9.0TM was used. The gene expression data were analyzed using the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests by the PRISM program. The results confirm an association between PARK2 (rs1801334 p <0.00001) and the co- regulated gene of PARK2, PACRG (rs1040079 p<0.0001; rs9356058 p=0.027 and rs6939278 p<0.00001) and the status leprosy *per se*. Ex vivo expression of the PARK2 and PACRG genes were similar between patients with leprosy (Hansen *per se*, reactions type I and II), however lower as compared to the health controls evaluated (p=0.0016). As main conclusions, the role of PARK2 and PACRG genes was validated in the pathogenesis of disease in the population of Bahia; The analysis show that the development of reactions do not appear to increase in a relevant way the expression of PARK2 and PACRG, and patients have lower expression of these genes as compared to controls.

Keywords: Genes, polymorphism, leprosy, association

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, L. F. DEMENAS. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. **American Journal of Human Genetics**, v.42, n.2, feb, p.256-266, 1988.
- ABEL, L.VU, D. L. *et al.* Complex segregation analysis of leprosy in Southern Vietnam. **Genetic Epidemiology**, v.12, n.1, p.63-82, 1995.
- ABEL, L.; SANCHEZ, F. O. *et al.* Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. **Journal of Infectious Diseases**, v.177, n.1, jan, p.133-145, 1998.
- ABOU-SLEIMAN, P. M.; MUQIT M.M. K., *et al.* Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v.7, n.3, mar, p.207-219. 2006.
- ALCAÏS, A.; M. MIRA, *et al.* Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v.17, n.1, p.44-48, 2005.
- ANDRADE V.; SABROZA P.C.T.; ALBUQUERQUE M.F.M. Séries temporais dos indicadores de morbidade da hanseníase - Brasil, 1946-1994. **Informe Epidemiológico do SUS**, 5:23-41, 1996.
- ARANTES, C. K. et al . Avaliação dos serviços de saúde em relação ao diagnóstico precoce da hanseníase. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília , v. 19, n. 2, jun. 2010.
- ARNOLDI, J.; J. GERDES, *et al.* Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. **American Journal of Pathology**, v.137, n.4, oct, p.749-753, 1990.
- ASSEMAN, C.; POWRIE. F. Interleukin 10 is a growth factor for a population of regulatory T cells. **Gut**, v.42, n.2, feb, p.157-158, 1998.
- ATTIA, E. A. S.; ABDALLAH M. *et al.* Circulating CD4+CD25highFoxP3+T cells vary in different clinical forms of leprosy. **International Journal of Dermatology**, v.49, n.10, oct, p.1152-1158, 2010.
- AZULAY, R. D. ; AZULAY, D.R. Micobacterioses. In: _____ . **Dermatologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997 (Micobacterioses)
- BEIGUELMAN, B. Lepromin reaction: genetic studies including twin pair analysis. **Acta Leprologica**, 44:5-65, 1971.
- BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciênc. saúde coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 1, 2002 .
- BLACK, G. F.; WEIR, R. E. *et al.* Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in healthy, non-Myco bacterium bovis

BCG-vaccinated Malawian young adults. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.4, jul, p.602-611, 2003.

BOCHUD, P-Y.; HAWN, T. R. *et al.* Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v.197, n.2, jan 15, p.253-261, 2008.

BOCHUD, P-Y.; SINSIMER, D. *et al.* Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.28, n.9, sep, p.1055-1065, 2009.

BOTELHO, G. I. S.; AARÃO, T. L. D. S. *et al.* Imunorreatividade das células dendríticas nas lesões foveolares da hanseníase dimorfa. **Rev Pan-Amaz Saude**, v.4, n.no.2, jun. 2013, p.p.19-25, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. 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: 104 p. 2012.

_____. Relatório de Situação Bahia. Editora MS. **Ministério da Saúde**, Brasília/DF, 35 p. 2011.

_____. Hanseníase: situação epidemiológica: **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2013a.

_____. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. **Boletim Epidemiológico**, v. 44, n.11, p.12. 2013b.

_____. Guia de Vigilância Epidemiológica. In: _____ Editora MS. **Ministério da Saúde**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília/DF: Catalogação na fonte –p.816, 2005.

_____. Situação epidemiológica da Hanseníase no Brasil [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde. [acesso em 16 jan 2010]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_novembro.pdf

BRASIL. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da hanseníase. **Diário Oficial da União**. Brasília, v. 198, p. 55 – 60, out. 2010. Seção 1.

BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy. **The Lancet**, v.363, n.9416, p.1209-1219, 2004.

CARDOSO, C. C.; PEREIRA, A.C. *et al.* Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiology**, v.6, n.5, may, p.533-549, 2011.

CHAKRAVARTII, M.R. A twin study on leprosy. Stuttgart: **Georg Thieme**; 1973.

CHOPRA, R.; ALI, S. *et al.* Mapping of PARK2 and PACRG Overlapping Regulatory Region Reveals LD Structure and Functional Variants in Association with Leprosy in Unrelated Indian Population Groups. **Plos Genetics**, v.9, n.7, jul, 2013.

COEYTAUX, A.; TRUFFERT, A. *et al.* Leprosy, a neurologic disease. **Rev Med Suisse**, v.3, n.110, may 9, p.1178, 1180-4, 2007.

COLE, S. T.; EIGLMEIER, K. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v.409, n.6823, feb, p.1007-1011, 2001.

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

DA MOTTA-PASSOS, I.; MALHEIRO, A. *et al.* Decreased RNA expression of interleukin 17A in skin of leprosy. **European Journal of Dermatology**, v.22, n.4, jul-aug, p.488-494, 2012.

DERETIC, V.; Autophagy in infection. **Curr. Opin. Cell Biol.** 22(2), 252–262, 2010.

DERETIC, V., T. SAITOH, *et al.* Autophagy in infection, inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol**, v.13, n.10, p.722-737. 2013.

DUCATTI, Ivan. A hanseníase. In: _____. **A hanseníase no Brasil na Era Vargas e a profilaxia do isolamento compulsório**: estudos sobre o discurso científico legitimador. São Paulo: Departamento de História, Programa de Pós-Graduação em História Social, Universidade de São Paulo, 2009. Dissertação. 199p.

FABER, W. R.; IYER, A. M. *et al.* Serial measurement of serum cytokines, cytokine receptors and neopterin in leprosy patients with reversal reactions. **Leprosy Review**, v.75, n.3, sep, p.274-281, 2004.

FAVA V, ORLOVA M, COBAT A, ALCAIS A, MIRA M, *et al.* Genetics of leprosy reactions: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 107 ((Suppl. I)) 132–42, 2012.

FEITOSA, M.F.; BORECKI, I.; KRIEGER, H.; BEIGUELMAN, B.; RAO, D.C. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. **Am J Hum Genet**, v.56, p.1179-85, 1995.

FINE, P. E. Leprosy: what is being "eliminated"? **Bull World Health Organ**, v.85, n.1, jan, p.2, 2007.

FITNESS, J.; FLOYD, S. *et al.* Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **Am J Trop Med Hyg**, v.71, n.3, sep, p.330-40, 2004.

- FRANCESCHI, D. S. A.; MAZINI, P. S. *et al.* Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v.13, n.4, p.493-498, 2009.
- 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.
- GOTTRON, H. A.; SCHÖNFELD, W.; Die Lepra. In: _____ **Dermatologie und venerologie**; einschliesslich berufskrankheiten, dermatologischer kosmetik und andrologie. Stuttgart: Georg Thieme, 1963.
- GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O. *et al.* Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p.363-375, 2002.
- HART, B. E.; TAPPING, R. I. Genetic Diversity of Toll-Like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. **Journal of Tropical Medicine**. v.2012, 2012.
- HILL, A. V. S. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. In: _____ .Genetics. **Annual Review of Genetics**, v.40, p.469-486, 2006.
- HRISTOVA, V. A.; BEASLEY, S. A. *et al.* Identification of a Novel Zn²⁺ -binding Domain in the Autosomal Recessive Juvenile Parkinson-related E3 Ligase Parkin. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, n.22, may 29, p.14978-14986, 2009.
- _____. Identification of a Novel Zn(2+)-binding Domain in the Autosomal Recessive Juvenile Parkinson-related E3 Ligase Parkin. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, n.22, may, p.14978-14986. 2009.
- JADHAV, R.; SUNEETHA, L. *et al.* Analysis of Antibody and Cytokine Markers for Leprosy Nerve Damage and Reactions in the INFIR Cohort in India. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.3, mar. 2011.
- JOB, C. K.; JAYAKUMAR, J. *et al.* Transmission of leprosy: A study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, n.3, mar, p.518-521, 2008.
- JOHNSON, C.M.; LYLE, E.A. *et al.* Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. **Journal of Immunology**, v.178, n.12, jun 15, p.7520-7524, 2007.
- JOSTINS, L.; RIPKE, S. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**, v.491, n.7422, nov 1, p.119-124, 2012.
- KARONGA, P. T. G. Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. **The Lancet**, v.348, n.9019, p.17-24, 1996.

KISZEWSKI, C. A.; BECERRIL, E. *et al.* Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.57, n.3, mar, p.279-285, 2003.

KITADA, T. *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, v392, 605–608, 1998.

KLATSER, P. R.; VANBEERS, S. *et al.* Detection of Mycobacterium leprae nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.11, nov, p.2947-2951, 1993.

LEWIS, C. M.; J. KNIGHT. Introduction to Genetic Association Studies. **Cold Spring Harbor Protocols**, v.2012, n.3, march 1, 2012, p.pdb.top068163, 2009.

MAKRIDAKIS, N. M.; REICHARDT, J. K. V. Multiplex automated primer extension analysis: Simultaneous genotyping of several polymorphisms. **Biotechniques**, v.31, n.6, dec, p.1374-1380, 2001.

MALHOTRA, D.; DARVISHI, K. *et al.* Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. **Eur J Hum Genet**, v.14, n.4, p.438-442, 2005.

MARIN, I.; LUCAS, J. I. *et al.* Parkin and relatives: the RBR family of ubiquitin ligases. **Physiological Genomics**, v.17, n.3, may, p.253-263, 2004.

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.

MASSONE, C.; NUNZI, E. *et al.* T Regulatory Cells and Plasmacytoid Dendritic Cells in Hansen Disease: A New Insight Into Pathogenesis? **American Journal of Dermatopathology**, v.32, n.3, may, p.251-256, 2010.

MENDONCA, V. A.; BRITO ALVIM DE MELO, G. E. *et al.* Immunology of leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.83, n.4, jul-aug, p.343-350. 2008.

MIRA, M. T., ALCAÏS, A. *et al.* Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. **Genes and Immunity**, v.4, n.1, jan, p.67-73, 2003.

_____. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v.427, n.6975, p.636-640, 2004.

_____. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes Infect.** v8:1124-31, 2006.

MISRA, N.; MURTAZA, A. *et al.* Cytokine profile of circulating T-cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets - T-helper phenotype

is stable and uninfluenced by related antigens of mycobacterium-leprae. **Immunology**, v.86, n.1, sep, p.97-103, 1995.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 Paradigm - Insights from leprosy. **Journal of Investigative Dermatology**, v.102, n.6, jun, p.828-832, 1994.

_____. The innate immune response in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v.22, n.1, p.48-54, 2010.

MODLIN, R. L.; MELANCON-KAPLAN, J. *et al.* Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.85, n.4, february 1, 1988, p.1213-1217, 1988.

MOET, F.J.; PAHAN. D.; SCHURING, R.P.; *et al.* Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. **J Infect Dis**, 193: 346–353, 2006.

MONOT, M.; HONORE, N.; GARNIER, T.; *et al.* On the origin of leprosy. **Science**, 308: 1040–1042, 2005.

MORAES, M. O.; CARDOSO, C. C. *et al.* Genetics of host response in leprosy. **Leprosy Review**, v.77, n.3, Sep, p.189-202, 2006.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **J Am Acad Dermatol**, v.51, n.3, sep, p.417-26, 2004.

MUELLER, D.L. E3 ubiquitin ligases as T cell energy factors. **Nature Immunology**, v5,n.9 sep, p.883-890, 2004.

NERY, J. A. D. C. ; SALES, A. M. *et al.* Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais: uma abordagem prática. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, p.367-375, 2006.

NEWPORT, M. The genetics of nontuberculous mycobacterial infection. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, n.06, p.1-13. 2003.

OMS. Global leprosy situation, 2012. **Weekly epidemiological record**, v.34, n.87, p.317–328, ago. 2012.

_____. Leprosy (Hansen's Disease). Geneva: **World Health Organization**, 2011.

_____. Global leprosy: update on the 2012 situation - **World Health Organization**, WHO. Geneva: Weekly Epidemiological Record (WER) vol. 88, 35 365–380 p. 2013.

_____. Estratégia global aprimorada para redução adicional da carga da hanseníase: 2011-2015 : diretrizes operacionais (atualizadas). / **Organização Mundial da Saúde**. Brasília : Organização Pan-Americana da Saúde, 70p., 2010.

_____. Action Programme for the Elimination of Leprosy. A guide to eliminate leprosy as a public health problem. - **World Health Organization**, WHO. Geneva, 1995.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Manual para o controle da lepra**. 2ed. Washington, DC ,USA , 1989.

OLIVEIRA, V. M.; ASSIS, C. R. D. *et al.* Levantamento epidemiológico da hanseníase no nordeste brasileiro durante o período de 2001-2010. **Scire Salutis**, v. v.3,p.16-27, 2013.

OLIVEIRA C.R; ALENCAR M.J.F; SANTANA S.C; SENA NETO A.S; RAMOS JÚNIOR A.N. Fatores que influenciaram a inadequação do diagnóstico e do acompanhamento dos estados reacionais em hanseníase no estado de Rondônia, Brasil. **Hansen. Int.** v.32(2), p.185-195, 2007.

OTTENHOFF, T. H. M.; F. A. W. VERRECK, *et al.* Control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberculosis**, v.85, n.1-2, jan-mar, p.53-64, 2005.

PARDILLO, F. E. F. *et al.* Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 8, p. 1096-1099, Apr. 2007

PINHEIRO, R. O.; SALLES, J. D.S. *et al.* Mycobacterium leprae-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiology**, v.6, n.2, feb, p.217-230, 2011.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v.82, p.451-459, 2007.

RAJALINGAM, R.; SINGAL, D. P. *et al.* Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. **Tissue Antigens**, v.49, n.2, feb, p.168-172, 1997.

RIDLEY, D.S; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v.34(3), 1966 jul-sep, p.255-73, 1966.

ROSE, P.; WATERS, M.F.; Reversal reactions in leprosy and their management. **Lepr Rev** 62: 113-121, 1991.

ROY, S.; FRODSHAM, A. *et al.* Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **Journal of Infectious Diseases**, v.179, n.1, jan, p.187-191, 1999.

ROY, S.; MCGUIRE, W. *et al.* Tumor Necrosis Factor Promoter Polymorphism and Susceptibility to Lepromatous Leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v.176, n.2, aug 1, p.530-532, 1997.

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

SANTOS, A. R.; SUFFYS, P. N. *et al.* Role of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms in Leprosy **Journal of Infectious Diseases**, v.186, n.11, dec 1, p.1687-1691, 2002.

SCHÄFFER. Ueber die Verbreitung der Leprabacillen von den oberen Luftwegen aus. **Archiv für Dermatologie und Syphilis**, v.44, n.1, p.159-174, 1898.

SCHURING, R. P.; L. HAMANN, *et al.* Polymorphism N248S in the Human Toll-Like Receptor 1 Gene Is Related to Leprosy and Leprosy Reactions. **Journal of Infectious Diseases**, v.199, n.12, jun 15, p.1816-1819. 2009.

SCHURR, E., A. ALCAÏS, *et al.* Mycobacterial infections: PARK2 and PACRG associations in leprosy. **Tissue Antigens**, v.69, p.231-233. 2007.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.2, apr, p.338-81, 2006.

SCOTT ALGOOD, H. M., P. L. LIN, *et al.* Tumor Necrosis Factor and Chemokine Interactions in the Formation and Maintenance of Granulomas in Tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, aug 1, 41 Suppl 3:S189-93, 2005.

SHAW, M.A.; DONALDSON. I.J; COLLINS, A.; PEACOCK, C.S.; LINS LAINSON, Z.; SHAW, J.J. *et al.* Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. **Genes Immun**.v2:196-204, 2001.

SHIELDS, E. D.; RUSSELL, D. A. *et al.* Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. **Journal of Clinical Investigation**, v.79, n.4, apr, p.1139-1143, 1987.

SHIFMAN, S.; KUYPERS, J. *et al.* Linkage disequilibrium patterns of the human genome across populations. **Human Molecular Genetics**, v.12, n.7, apr 1, 2003, p.771-776, 2003.

SIDDIQUI, M. R.; MEISNER, S. *et al.* A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nature Genetics**, v.27, n.4, apr, p.439-441. 2001.

SIELING, P. A.; JULLIEN, D. *et al.* CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: Correlation with effective host immunity. **Journal of Immunology**, v.162, n.3, feb, 1, p.1851-1858, 1999.

SIELING, P. A.; WANG, X. H. *et al.* IL-12 Regulates T-Helper Type-1 Cytokine responses in human infectious-disease. **Journal of Immunology**, v.153, n.8, oct, p.3639-3647, 1994.

SILVA, S. F.; GRIEP, R. H. Reação hansênica em pacientes portadores de hanseníase em centros de saúde da área de planejamento 3.2 do município do Rio de Janeiro. **Hansen. Int**, v.32, n.2, sep.09, p.155-162. 2007.

SPANDL, J.; D. LOHMANN, *et al.* Ancient Ubiquitous Protein 1 (AUP1) Localizes to Lipid Droplets and Binds the E2 Ubiquitin Conjugase G2 (Ube2g2) via Its G2 Binding Region. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.7, feb 18, p.5599-5606, 2011.

SPELLBERG, B.; EDWARDS. J. E. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, n.1, jan 1, p.76-102. 2001.

STICKER, G. "Mitteilungen über Lepra nach Erfahrungen in Indien und Ägypten. **Munchener Med. Wochenschr**, v.44, n.39, p.1063, 1897.

TODD, J. R.; WEST, B. C. *et al.* Human-leukocyte antigen and leprosy - study in northern louisiana and review. **Reviews of Infectious Diseases**, v.12, n.1, jan-feb, p.63-74, 1990.

VANEDEN, W.; GONZALEZ, N. M. *et al.* HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v.151, n.1, p.9-14. 1985.

VIVES-BAUZA, C.; ZHOU, C. *et al.* PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, n.1, jan 5, p.378-383, 2010.

WEST, A. B., LOCKHART, P. J., O'FARELL, C. & FARRER, M. J. Identification of a novel gene linked to *parkin* via a bi-directional promoter. **J. Mol. Biol.** 326, 11–19, 2003.

WONG, S. H.; GOCHHAIT, S. *et al.* Leprosy and the Adaptation of Human Toll-Like Receptor 1. **Plos Pathogens**, v.6, n.7, jul, 2010.

XU, K., DEVRIES, R. R. P. *et al.* HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v.53, n.1, p.56-63, 1985.

YAMAMURA, M.; WANG, X. H. *et al.* Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **The Journal of Immunology**, v.149, n.4, Aug 15, p.1470-5. 1992.

ZHANG, F.; HUANG, W. *et al.* Genomewide Association Study of Leprosy. **New England Journal of Medicine**, v.361, n.27, p.2609-2618, 2009.

ZHANG, F.; LIU, H. *et al.* Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. **Nature Genetics**, Oct 23;43(12):1247-51, 2011.

XII. ANEXOS

Anexo I

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.





Anexo II
CONSENTIMENTO INFORMADO PARA O ESTUDO DE
DETERMINANTES GENÉTICOS NAS LEISHMANIOSES
NO BRASIL

Nome do Projeto: Determinantes genéticos nas leishmanioses no Brasil

Nome do Paciente: _____

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Edgar M. Carvalho, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo identificar pessoas que tem ou que tiveram leishmaniose cutânea e ou leishmaniose mucosa. Além disso, estudaremos todos os membros de sua família para verificar se existe alguma predisposição genética para o desenvolvimento de doenças infecciosas. Após lhe ser explicado o que contém neste questionário você pode perguntar tudo sobre o estudo a seu médico. Famílias dos pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa diagnosticados no posto de saúde de Corte de Pedra serão convidadas a participar do estudo. Caso decida participar do estudo você será solicitado a assinar este formulário de consentimento. Aproximadamente 2000 pessoas participarão deste estudo.

Participação voluntária:

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

Finalidade do estudo: Este estudo visa determinar se familiares de pacientes com leishmaniose cutânea e ou mucosa têm maior tendência a desenvolver a leishmaniose, que vizinhos que não tem este tipo de doença. Adicionalmente, nós tentaremos demonstrar através de estudo genético se existe uma associação entre alguns genes que são transmitidos aos seus filhos que influenciam no desenvolvimento desta doença ou de outras doenças infecciosas.

Procedimentos: Caso você aceite participar do estudo um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação, seus hábitos e se você já teve leishmaniose. Um médico examinará você para ver se existe qualquer lesão que indique se você tem ou já teve leishmaniose. Também com o auxílio de uma lanterna e de um espécuro nós examinaremos você para ver se tem evidência de leishmaniose no nariz ou na boca. Caso seja detectada lesão ativa na pele ou na mucosa, você será convidado a comparecer no posto de saúde de Corte de Pedra para realizar exames de rotina para o diagnóstico da doença, como exame de sangue (sorológico), teste cutâneo e biópsia / aspiração da lesão para isolamento do parasito que causa a doença e exame histopatológico da lesão. Se você concordar em retirar sangue para realização dos estudos de pesquisa genética para avaliar a susceptibilidade a doenças infecciosas, 10 ml de sangue serão colhidos (equivalente a 1 colher de sopa).

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada, com outros membros da equipe médica. Do Comitê de Ética do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, o Órgão de Proteção dos Direitos Humanos e o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que

possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Institutional Review Board e o Office for Human Research Protection and the National Institute of Health of the United States of America.

Análise de riscos e benefícios: A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. O exame da sua pele, do seu nariz e da sua boca poderá documentar que você tenha leishmaniose cutânea ou leishmaniose mucosa. Neste caso você será tratado com antimônio (glucantime) o que trará vantagem para você desde que a doença foi documentada na sua fase ainda inicial. Este tratamento será acompanhado no Posto de Saúde de Corte de Pedra e caso haja necessidade, ou pela realização de exames, ou complicações do tratamento, você será internado no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos em Salvador. A passagem para Salvador será custeada pela pesquisa, contudo a vaga para internamento será de acordo com as normas do Hospital, sendo às vezes necessário esperar alguns dias para consegui-la.

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

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

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Edgar M. Carvalho, Dra. Lea Castellucci e Dr. Luiz Henrique Guimarães, responsáveis por este estudo (Tel.: 71-3237-7353 ou 71-3339-6234). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, cujo endereço consta no início deste consentimento.

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

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

Não **ACEITO** que amostras de meu sangue sejam armazenadas, para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

4. N° do LTCP | | | | | | 3. N° do TMRC | | | | | | | | * 5. N° da Família | | | | |
6. N° da indivíduo na Família | | | | | *

Data da assinatura do TCLE para Estudo de Genética:.....| | | / | | | / | | | | |

Dados Demográficos

14. Sexo:..... masculino feminino

15. Data de nascimento* (dd/mm/aaaa):.....| | | / | | | / | | | | |

16. Naturalidade: _____

17. Ocupação:

Trabalhador rural Dona de casa Estudante Comerciante Motorista Outra

18. Cidade/Vilarejo* _____

19. Tempo em endereço atual (anos):.....| | | | , | |

20. N° de moradores no domicílio (exceto paciente):.....| | | |

21. N° de moradores no domicílio com leishmaniose passada ou ativa:.....| | | |

191. Grau de parentesco com o caso índice:..... Pai/mãe Irmão Filho Outro

História Médica Progressiva

192. Leishmaniose cutânea ativa:..... não sim

Se “não” ir para item 200. Se “sim” preencher também itens 193 a 199 e 52 a 71.

193. Já esteve no PSCP?..... não sim

194. Local da lesão: Segmento cefálico Tronco MMSS MMII Genitália/glúteo

195. N° de cicatrizes sugestivas de leishmaniose:.....| | | |

196. Lesões acima da cintura:..... não sim

197. Ano de início da lesão cutânea: _____

198. Tratado lesão cutânea:..... não sim

199. Completou o tratamento:..... não sim

200. Leishmaniose mucosa:..... não sim

Se “não” ir para item 171. Se “sim” preencher também itens 201 a 203.

201. Ano de início da lesão mucosa: _____

202. Tratada lesão mucosa:..... não sim

203. Completou o tratamento da lesão mucosa:..... não sim

Exposição Ambiental

171. Você já trabalhou ou morou (pelo menos um mês) em fazenda?..... não sim

172. Possui animais em casa?..... não sim

4. N° do LTCP | | | | | | 3. N° do TMRC | | | | | | | | * 5. N° da Família | | | | |

Exposição Ambiental (Continuação)

Se “não” possui animais em casa, ir para item 179. Se “sim”, especifique:

173. Cachorros..... não sim
174. Cavalos..... não sim
175. Galinhas..... não sim
176. Porcos..... não sim
177. Outros..... não sim
178. Se “outros”, especifique: _____

179. Há eletricidade em casa? não sim
180. Há sanitário em casa?..... não sim
181. Usa mosquiteiro para dormir?..... não sim
182. Há resto de mata próximo a casa (raio de 100 m)..... não sim
183. Há roça próxima a casa (raio de 50 metros)?..... não sim
184. Há galinheiro próximo a casa (raio de 50 metros)?..... não sim
185. Há pocilga próxima a casa (raio de 50 metros)? não sim
186. Há curral próximo a casa (raio de 50 metros)? não sim

187. Ocupação entre 16:00 e 24:00 hs:..... Permanece em casa Sai de casa

188. Se “Sai de casa”, sai para:

- Caçar/pescar..... Estudo/trabalho..... Outro

189. Se “Sai de casa para outro”, especifique: _____

Exame Físico Médico (preencher itens 52 a 71, se respondeu “sim” no item 192)

52. N° total de lesões de pele:.....

53. Tempo de duração da lesão ativa (dias):.....

Número e tipos de lesões:

54. Ulceradas.....

55. Pápulas

56. Nódulos

57. Vegetações

58. Verucosas.....

Lesão principal:

59. Local maior lesão (marque apenas UM):

- Cabeça Face Pescoço Tronco Braço D Braço E
 Antebraço D Antebraço E Coxa D Coxa E Perna D Perna E Outro

60. Se “Outro”, especificar: _____

4. N° do LTCP | | | | | 3. N° do TMRC | | | | |* 5. N° da Família | | | |

Exame Físico Médico (Continuação)

Tamanho da maior lesão (mm):.....61a. | | | | x 61b. | | | |

62. Tipo da lesão: ulcerada pápula nódulo vegetação verrucosa NE

63. Infecção secundária:..... não sim NE

64. Cicatriz sugestiva de Leishmaniose cutânea:..... não sim NE

65. N° de cicatrizes:.....| | |

66. Tempo de duração das cicatrizes (meses):.....| | | |

Linfoadenopatia:

67. Linfoadenopatia presente:..... não sim NE

68. Mais de 1 cadeia envolvida:..... não sim

69. Local: Cervical Ocipital Axilar Inguinal Crural Outra

70. Tamanho do maior linfonodo (mm):.....70a: | | | | x 70b | | | |

71. Foto das lesões realizada:..... não sim

Triagem Otorrinolaringológica

204. Lesões mucosas ativas:..... não sim NE

205. Cicatriz característica de lesão mucosa:..... não sim NE

206. Referido ao PSCP para exame ORL:..... não sim

Coleta e Exames Realizados

190. Colhido sangue para genética:..... não sim

46. Realizada IDRМ prévia*:..... não sim NA

47. Se "sim":..... POS NEG Duvidoso

48. Se "não", realizado agora*:..... não sim

.....Iniciais do entrevistador _____

Leitura da IDRМ:

IDRM:.....49a. | | | | x 49b. | | | | mm

50. IDRМ:..... POS NEG Duvidoso

Diagnóstico da Forma Clínica de Leishmaniose - Fenótipo

207. Fenótipo da Forma Clínica:

Cutânea (CL=0)..... Mucosa (ML=1)..... Disseminada (DL=2)

Muco-cutânea (MCL=3)..... Pré-ulcerativa (4)..... Sub-clínica (5)

Iniciais do investigador _____



Anexo IV

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 V

Parecer Consubstanciado de Projeto

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E MARCADORES GENÉTICOS NA HANSENÍASE.

Pesquisador Responsável : Paulo Roberto Lima Machado

Data da Versão 16/06/2010

Cadastro 50/10

Data do Parecer 07/10/2010

Grupo e Área Temática I.1 Genética Humana

Objetivos do Projeto

Objetivo 1: Determinar o perfil de citocinas in vitro e identificar quais as células produtoras dessas citocinas em grupos de pacientes com lepra tuberculóide, com lepra lepromatosa, pacientes borderline, em resposta ao antígeno de M. leprae em comparação ao grupo controle - indivíduos saudáveis.

Objetivo 2: Identificar mecanismo(s) envolvido na mudança do padrão de resposta imune em pacientes com episódios reacionais, tais como ativação de células T, NK e macrófagos.

Objetivo 3: Avaliar a frequência de monócitos pró-inflamatórios (CD14+CD16+) em pacientes com as formas tuberculóide, lepromatosa e borderline.

Objetivo 4: Verificar se polimorfismos nos genes candidatos IL-10, IL-8, IL-9, IL-13, INF- γ , TNF- α , PARK2/PACRG e ErbB2 estão afetando os níveis de expressão dos genes ou a função da proteína expressa e, se podem influenciar os estados reacionais nos pacientes com hanseníase.

Objetivo 5: Avaliar a expressão gênica global em lesões hansênicas.

Sumário do Projeto

Este projeto tem com objetivo estudar as alterações imunológicas que ocorrem em pacientes portadores de hanseníase, utilizando as técnicas de determinação de citocinas in situ e em sangue periférico além de estudar através de técnica de biologia molecular estudar os possíveis genes reguladores das citocinas envolvida nos mecanismos imunopatogênico da doença. Os pesquisadores farão biopsias e colherão sangue dos pacientes para a realização desse estudo. Esse projeto tem uma equipe de pesquisadores nacionais e com demonstrada experiência no estudo dessa patologia e no domínio das técnicas que vão ser utilizadas. O consentimento informado é claro e expressa a real natureza do estudo e os benefícios e riscos da participação do paciente no estudo. Fica confuso e discordante da folha de rosto o número de pacientes a serem envolvidos no estudo. A folha de rosto diz que irá incluir 250 pacientes e na descrição do projeto soma-se 410 pacientes. Os pesquisadores informam que irão incluir no estudo os seguintes pacientes: 40 pacientes no Grupo 1 (sem reação hansênica), 20 pacientes no Grupo 2 (com reação tipo 1 ou reação reversa), e 20 pacientes no Grupo 3 (com reação tipo 2 ou eritema nodoso leproso). Para os objetivos 4 e 5 planeja-se incluir 150 pacientes no Grupo 1 (sem reação hansênica), 50 pacientes no Grupo 2 (com reação tipo 1 ou reação reversa), e 50 pacientes no Grupo 3 (com reação tipo 2 ou eritema nodoso leproso). Farão a coleta de sangue e realizarão biópsia de pele para realização do estudo.

Aspectos relevantes para avaliação	Situação
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não

Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em Seres Humanos
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 410 Na Instituição
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	não informado
Data de término prevista	2 anos
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Não
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Parecer:

Projeto Aprovado

Informações ao pesquisador

• O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

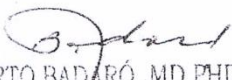
• O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

• O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ____/____/____ e ao término do estudo.

Para projetos do Grupo 1 do fluxograma acrescentar:

Seu projeto (Registro 50/10 Grupo I Área temática especial Genética Humana) está sendo encaminhado a CONEP e só poderá ser iniciado após parecer aprovatório desta.


ROBERTO BADARÓ, MD PHD
Coordenador CEP
CHUPES

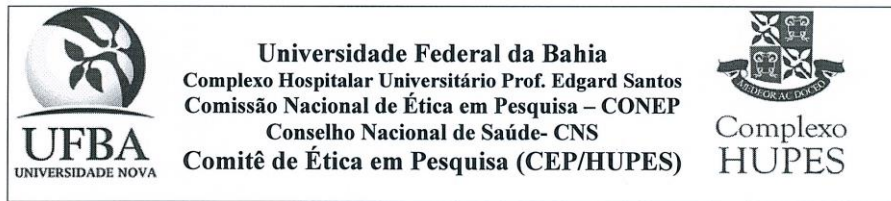
Relatórios Parciais : 16 04 2011

16 10 2011

16 04 2012

Relatório FINAL : setembro 2012

Anexo VI



PARECER ADENDO CEP/HUPES Nº 50/2010

O Pesquisador Responsável, **Paulo Roberto Lima Machado**, encaminhou ao Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo HUPES o adendo do projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da resposta imune e marcadores genéticos na hanseníase**”, que foi protocolado sob nº 50/2010, avaliado e aprovado em parecer datado de 09 de dezembro de 2010.

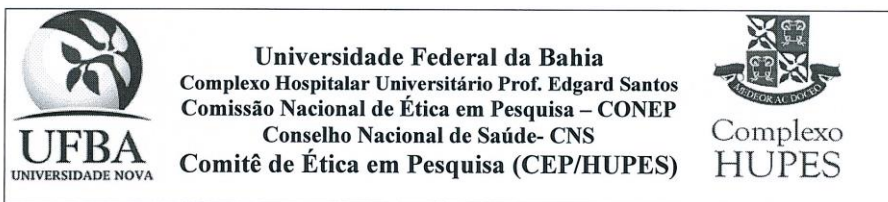
O supracitado solicita a aprovação da:

- Inclusão de indivíduos controles sem a doença investigativa, que serão recrutados a partir de doadores voluntários de banco de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA) na cidade de Salvador;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- versão 02 de 19 de abril de 2013.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d);

O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata;

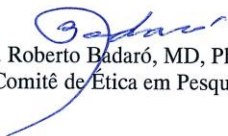
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas



adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

O CEP/HUPES Avaliou E Aprovou As Solicitações Do Adendo Em:

17 / 05 / 2013


Prof. Dr. Roberto Badaró, MD, PhD
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/HUPES



Anexo VII
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: ____/____/____

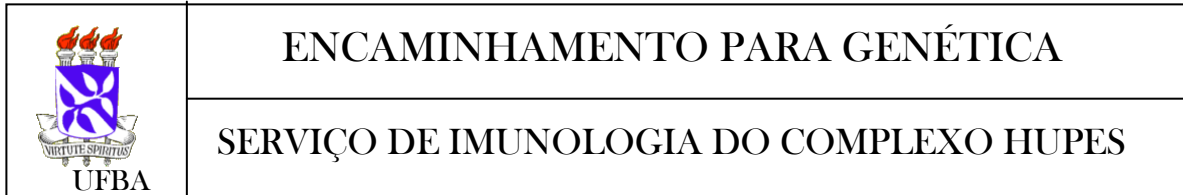
2. Você conhece alguém que tem (ou já teve) a Hanseníase? [ex.: parente, vizinho]

É contactante? Sim () Não ()

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?



PREZADO DOADOR DE SANGUE,

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

GOSTARÍAMOS 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 VIII
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 MH: ()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 ()
- 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: ___/___/___

RESPOSÁVEL 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 5 anos

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