



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



MECANISMOS DE REGULAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA EM
UMA AMOSTRA POPULACIONAL AFETADA PELA HANSENÍASE

Joyce Moura Oliveira

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

O48 Oliveira, Joyce Moura,
Mecanismos de regulação genética e epigenética em uma amostra
populacional afetada pela Hanseníase / Joyce Moura Oliveira.- Salvador:
[s.n.], 2015.
xi, 104f.

Orientador: Profa. Dra. Léa Cristina Castellucci

Tese (Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde) Faculdade de Medicina. Universidade Federal da Bahia.

1.Polimorfismo. 2. Genes - Imunopatogênese. 3. Genes - Epigenética. 3.
Hanseníase. I. Universidade Federal da Bahia. II. Título.

CDU: 616.993.161



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



**MECANISMOS DE REGULAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA EM
UMA AMOSTRA POPULACIONAL AFETADA PELA HANSENÍASE**

JOYCE MOURA OLIVEIRA

Professor Orientador: Léa Cristina de Carvalho Castellucci

Professor Co-orientador: Paulo Roberto Lima Machado

Tese de Doutorado apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, da área de concentração em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2015

BANCA EXAMINADORA:

Membros Titulares:

Profa. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus – UFS (SE)

Profa. Dra. Angela Maria Vianna-Morgante – USP (SP)

Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueirêdo - UFBA (BA)

Prof. Dr. Jamary Oliveira Filho – UFBA (BA)

Profa. Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa – FIOCRUZ (BA)

Membros Suplentes:

Profa. Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci – UFBA (BA)

“...É preciso ter força, é preciso ter raça, é preciso ter gana sempre.

Quem traz no corpo a marca...mistura dor e alegria.

...É preciso ter manha, é preciso ter graça, é preciso ter sonho sempre.

Quem traz na pele essa marca possui a estranha mania de ter fé na vida. “

(Milton Nascimento – Fernando Brant)

Dedico esta tese à minha amada família:

*Pilares da minha vida, que seguem inabaláveis ao meu lado, seja dia de sol ou de
chuva...*

*Aos meus amores incondicionais, a quem posso dar a mão e seguir... sabendo que jamais
estarei sozinha.*

Chego onde sempre quis. E o que hoje sou, é também o reflexo de vocês em mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

A minha orientadora, Dra. Léa Castellucci, que me deu o privilégio de ser sua aluna.

Por quebrar paradigmas e ser acessível. Por traduzir de maneira tão clara a palavra *orientação*.

Por guiar de forma firme, mas com calor humano... por discutir os dados de forma simples, exercendo sua competência sem pose...

Por marcar de forma definitiva, o meu currículo profissional e minha vida pessoal... agradeço e reconheço numa intensidade que jamais seria possível expressar com palavras.

Lembrarei com muito carinho de tantos impagáveis ensinamentos científicos e momentos de descontração na mesma proporção!

Minha eterna gratidão, não apenas por esta jornada chamada *tese*, mas por uma grande jornada de *vida*.

“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS:

A Dr. Edgar Carvalho, por me permitir ser parte integrante do Serviço de Imunologia e por todos os frutos colhidos deste momento em diante. Pelo impacto que isto sempre terá na minha vida profissional. O meu reconhecimento e toda minha gratidão pela confiança depositada, ontem, hoje e SEMPRE.

A Dra. Léa Castellucci, acima de tudo quero agradecê-la por ter me propiciado a oportunidade da minha vida profissional, levando-me ao Serviço de Imunologia e à Dra. Amélia, quando eu ainda era estudante de graduação. Por me ensinar de forma tão amigável e entusiasta as sonhadas técnicas de Biologia Molecular, e a reconhecer a grandeza do trabalho de campo. Meu eterno reconhecimento.

A Dr. Paulo Machado, que coordena os estudos de hanseníase no Serviço de Imunologia do hospital das clínicas, chefia o setor e o ambulatório Magalhães-Neto, pelo privilégio de ser sua estudante. Por co-orientar este trabalho com extrema dedicação. Por sempre estar disponível para discutir nas dificuldades e, principalmente pelo prazer de tê-lo como exemplo de professor... um guia. Por todas as oportunidades de aprendizagem, meu sincero agradecimento.

A equipe médica e técnica que avalia os pacientes nos ambulatórios Magalhães-Neto e Dom Rodrigo de Menezes/Couto Maia e presta todo o suporte necessário, Drs. Paulo Machado, Lídia Machado, Mayume Shibuya, Sales e residentes.

Ao colega do Doutorado Lucas Almeida pela intensa troca de idéias e experiências, e pela amizade construída ao longo de tantos anos. Por tanto se dispor a ajudar neste trabalho, todo meu reconhecimento.

A colega de Doutorado Jamile Rêgo pela participação onipresente em todas as etapas deste trabalho e desdobramentos, mantendo sempre um sorriso no rosto, meu eterno agradecimento.

Aos Mestrandos Nadja Santana e Marcos Braz pela ajuda nas genotipagens, ELISAS e trabalho de campo em um ambiente de trabalho colaborativo e agradável.

As Estudantes de IC Thailamar Vieira e Thaís Magalhães o reconhecimento pela ajuda nas lises, extrações, trabalho de campo e revisões de literatura com muita energia e alegria.

Aos queridos colegas do Serviço de Imunologia pelo senso de colaboração que torna nossa convivência tão agradável, em especial aqueles de contato mais estreito: Lucas Almeida, Jamile Rêgo, Nadja Santana, Marcos Braz, Thailamar Vieira, Thaís Magalhães, Andréa Magalhães, Anselmo Souza, Angela Giudice, Thais Delavechia, Silvane Braga, Olívia Bacellar, Lucas Carvalho, Sara Passos, Juliana Almeida, Viviane Magalhães, Lílian Medina, Taís Menezes, Rúbia Suely, Giovana Bergheme, Daniela Celestino, Cristiano Sampaio, Orlando Sanches.

A Secretaria da Pós-Graduação em Ciências da Saúde na pessoa de Cibele pela agilidade na resolução de todas as questões práticas necessárias a conclusão deste trabalho.

Aos agentes de saúde, e corpo clínico do hospital Dom Rodrigo de Menezes/Couto Maia, em especial a Sales, pela constante disposição de prestar todo o suporte e infraestrutura às necessidades do trabalho de captação de pacientes.

Aos pacientes e controles participantes da pesquisa, todo o meu reconhecimento e gratidão por concordarem e contribuírem com grande disposição em participar dos estudos, sem a qual, este trabalho jamais seria realizado.

A Thailamar Vieira pela valorosa ajuda na revisão, formatação e tabulação do texto. Agradeço toda a generosidade na forma de dedicação intensa às necessidades diversas para a finalização deste trabalho. Por tudo isto, pelos finais de semana e noites, todo meu reconhecimento.

Aos meus Pais e minha Irmã pelo apoio atemporal e carinho incondicional.

A Deus por tudo isto e mais uma infinidade...!

FONTES DE FINANCIAMENTO:

- CAPES

- INCT – DT (Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Doenças Tropicais)

PROCESSO Nº 573839/2008-5

ÍNDICE

Índice de Tabelas.....	15
Índice de Figuras.....	18
Lista de Abreviaturas e Siglas	20
I. RESUMO	23
II. OBJETIVOS.....	24
III. INTRODUÇÃO	25
IV. REVISÃO DA LITERATURA.....	28
IV. 1. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DA HANSENÍASE.....	28
IV. 2. ASPECTOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE	30
IV. 3. ASPECTOS IMUNOLOGICOS NA HANSENÍASE	34
IV. 4. ASPECTOS GENÉTICOS NA HANSENÍASE	35
IV. 5. ESTUDOS GENÉTICOS EM GENES DO MHC DE CLASSE III - <i>TNFA, LTA E BAT1</i> - E A HANSENÍASE.....	38
IV. 6. ESTUDOS GENÉTICOS COM INTERLEUCINA 10 (IL- 10).....	40
IV. 7. ESTUDOS GENÉTICOS COM O (FLI-1)	41
V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	43
V. 1. SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS E DESENHO DO ESTUDO	43
V. 2. DEFINIÇÃO DE CASOS.....	46
V.2.1. HANSENÍASE <i>PER SE</i>	46
V.2.2. REAÇÃO DO TIPO 1 OU REAÇÃO REVERSA (RR).....	46

V.2.3. REAÇÃO DO TIPO 2 OU ERITEMA NODOSO HANSENICO (ENH).....	46
V. 3.PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	47
V.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DOS MARCADORES GENÉTICOS.....	47
V.3.2 CULTURA DE MACROFAGOS.....	48
V.3.3. EXTRAÇÃO DE RNA, OBTENÇÃO DE cDNA E ENSAIO DE EXPRESSÃO GÊNICA PARA O GENE DE <i>TNFA</i>	48
V.3.4. EXTRAÇÃO DE RNA, OBTENÇÃO DE cDNA E ENSAIO DE EXPRESSÃO GÊNICA PARA O GENE DE <i>IL10</i>	49
V.3.5. EXTRAÇÃO DE DNA PARA AVALIAÇÃO DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA.....	51
VI. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
VII. RESULTADOS.....	44
VII. 1. RESULTADOS DO OBJETIVO 1.....	55
VII. 1.1. ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO EM GENES DO MHC DE CLASSE III: <i>TNFA</i> , <i>LTA</i> E <i>BATI</i> E A HANSENIASE.....	55
VII. 1. 2. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS NO GENE DE <i>IL10</i> E A HANSENIASE.....	65
VII.1.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NO GENE DE <i>FLII</i> E A HANSENIASE.....	69
VII. 2.RESULTADOS DO OBJETIVO 2.....	73
VII. 2. 1.EXPRESSAO DO GENE DE <i>TNFA</i>	73

VII. 2. 2. EXPRESSAO DO GENE DE <i>IL10</i>	77
VII. 3. RESULTADOS DO OBJETIVO 3.....	79
VII. 3. 1. EXPRESSAO DO GENE DE <i>FLII</i>	79
VII. 3.2. METILAÇÃO DO GENE DE <i>FLII</i>	80
VIII. DISCUSSAO.....	81
IX. CONCLUSAO.....	90
X. SUMMARY.....	91
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	92
XII. ARTIGO PUBLICADO.....	102
XIII. ARTIGO SUBMETIDO.....	103
XIV. APENDICE.....	104

□

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Classificação de Ridley-Jopling adaptada.....	31
TABELA 2. Painel de SNPs genotipados no estudo.....	47
TABELA 3. Características clínico-epidemiológicas da amostra populacional da Bahia, Brasil.....	55
TABELA 4. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1800629 no gene <i>TNFA</i>	56
TABELA 5. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>TNFA</i> rs1800629 A/G e a hanseníase: casos vs. controles.....	57
TABELA 6. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1799964 no gene <i>TNFA</i>	58
TABELA 7. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>TNFA</i> rs1799964 C/T e a hanseníase: casos vs. controles.....	58
TABELA 8. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1800683 no gene <i>LTA</i>	59

TABELA 9. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>LTA</i> rs1800683 A/G e a hanseníase: casos vs. controles.....	59
TABELA 10. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs909253 no gene <i>LTA</i>	61
TABELA 11. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>LTA</i> rs909253 A/G e a hanseníase: casos vs. controles.....	61
TABELA 12. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1799964 no gene <i>BAT1</i>	62
TABELA 13. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>BAT1</i> rs2239527 C/G e a hanseníase: casos vs. controles.....	63
TABELA 14. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1800871 no gene <i>IL10</i>	65
TABELA 15. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>IL10</i> rs1800871 A/G e a hanseníase: casos vs. controles.....	66
TABELA 16. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1800896 no gene <i>IL10</i>	67

TABELA 17. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>IL10</i> rs1800896 C/T e a hanseníase: casos vs. controles.....	67
TABELA 18. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs3024496 no gene <i>IL10</i>	68
TABELA 19. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>IL10</i> rs3024496 A/G e a hanseníase: casos vs. controles.....	69
TABELA 20. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs7930515 no gene <i>FLII</i>	71
TABELA 21. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>FLII</i> rs7930515 C/G e a hanseníase: casos vs. controles.....	71
TABELA 22. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>FLII</i> rs7930515 C/G e a hanseníase: Pacientes com reações do tipo I (RR) e II (ENH) vs. controles.....	72
TABELA 23. Estatística da comparação entre o polimorfismo no gene de <i>FLII</i> rs7930515 C/G e a hanseníase: ENH vs. controles.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

✚	Figura 1. Razões de prevalência de hanseníase referentes ao ano de 2013.....	30
	Figura 2. Fluxograma esquemático do estudo caso-controle.....	45
	Figura 3. Padrão do desequilíbrio de ligação entre os marcadores do MHC de classe III: <i>BAT1, LTA e TNFA</i>	64
	Figura 4. Expressão gênica relativa de <i>TNFA</i> -308 A/G (rs1800629) Entre casos de hanseníase e controles avaliados.....	74
	Figura 5 A, B e C. Expressão gênica relativa de <i>TNFA</i> entre os grupos de pacientes com diferentes fenótipos clínicos: não reacionais (PB+MB) e reacionais (RR+ENH).....	75
	Figura 6. Expressão gênica relativa de <i>TNFA</i> entre os grupos de genótipos do polimorfismo -308 A/G (rs1800629) em pacientes avaliados.....	77
	Figura 7. Expressão gênica relativa de <i>IL10</i> entre os grupos de fenótipos clínicos da hanseníase nos pacientes e controles avaliados.....	78
	Figura 8. Expressão gênica relativa de <i>FLII</i> (rs7930515) em macrófagos de pacientes estimulados em diferentes tempos.....	79

Figura 9. Padrão de metilação do gene de *FLII* (rs7930515) em macrófagos de pacientes estimulados em diferentes tempos..... 80

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 desoxirribonucléico
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	Poliqumioterapia
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 negligenciada que permanece como um importante problema de saúde pública, mantendo índices de detecção acima do preconizado pela OMS para o controle da doença. Com o objetivo de entender melhor os mecanismos moleculares de patogênese e contribuir para o controle futuro da doença, este estudo buscou avaliar o papel de genes do locus do MHC de classe III: *TNFA*, *LTA* e *BAT1* e nos genes de *IL10* e *FLII* na hanseníase em uma população da Bahia. Foi utilizado o modelo caso-controle com casuística de 362 pacientes com hanseníase e 368 indivíduos controles sem a doença. Nessa amostra, foram genotipados nove marcadores genéticos (SNPs) e avaliada a expressão gênica das principais citocinas, TNF- α e IL-10. Mecanismos de regulação epigenética do gene de *FLII* na hanseníase *per se* foram avaliados pelo padrão de metilação do gene em células de pacientes, cultivadas sem estímulo e estimuladas com antígeno sonicado de *M. leprae* em diferentes tempos. Não foram encontradas associações significantes entre a doença e os polimorfismos do MHC de classe III avaliados em *TNFA*, *LTA* e *BAT1*, e o mesmo ocorreu com os marcadores avaliados no gene de *IL10* ($p > 0,05$). A expressão do gene de *TNFA* *ex vivo* foi significativamente maior em pacientes quando comparados a controles sem a doença ($p = 0,002$). Na análise deste gene considerando o SNP rs1800629 (-308 A/G), um marcador previamente associado à hanseníase em diferentes populações, observamos que indivíduos homocigotos para o alelo G expressam mais o gene do que indivíduos portadores do alelo A (GA+AA) ($p = 0,002$). Estes resultados reforçam que, mesmo não diretamente associado a hanseníase nesta população, este marcador pode ter um papel indireto na regulação da produção de TNF- α na infecção pelo *M. leprae*. A expressão do gene de *IL10* *ex vivo* foi maior em indivíduos com o fenótipo de reação hanseníase tipo I (Reação reversa – RR), do que pacientes sem manifestações agudas da doença e significativo em relação a controles ($p = 0,01$). Análise do marcador no gene de *FLII* (rs7930515 G\C) revelou um maior risco para o desenvolvimento de reações hanseníase entre portadores do alelo C (OR=1,53; 1.09 - 2.15 $p = 0,001$) em comparação com alelo G. Nas análises subsequentes observamos que essa associação ocorre na presença de reação do tipo II (ENH) com risco de 1,89 vezes maior para o seu desenvolvimento entre portadores do alelo C (OR=1,89; IC: 1.25-2.85; $p = 0,001$) e associação negativa para a reação do tipo I ($P > 0,05$). O polimorfismo avaliado no gene de *FLII*, que impacta no caminho de cura de lesões na Leishmaniose em humanos, aparece reforçado como potencial marcador de doença na hanseníase e para o desenvolvimento de reação hanseníase do tipo II. Sendo a hanseníase uma doença complexa este resultado pode contribuir para um melhor entendimento sobre a patogênese, e inspirar a investigação de novas vias importantes no processo de dano tecidual observado nessa doença.

Palavras-Chave: 1. Polimorfismo; 2. Epigenética; 3. *FLII*; 4. Hanseníase.

II. OBJETIVOS

II. 1. PRINCIPAL:

- Avaliar polimorfismos em genes importantes na imunopatogênese da hanseníase em uma amostra populacional afetada do estado da Bahia.

II. 2. ESPECÍFICOS:

II. 2. 1. Avaliar a associação entre polimorfismos nos genes do complexo principal de histocompatibilidade de classe III: *TNFA*, *LTA* e *BAT1*; E nos genes de *IL10* e *FLII* com a hanseníase e suas manifestações clínicas.

Hipótese: Existe uma associação entre polimorfismos nestes genes e a susceptibilidade à doença ou suas manifestações clínicas.

II. 2. 2. Avaliar a expressão dos genes *TNFA* e *IL10* em pacientes com e sem reações hansênicas em relação a controles.

Hipótese: Ocorre uma expressão diferencial destes genes entre controles e indivíduos com diferentes formas clínicas da hanseníase.

II. 2. 3. Realizar estudo piloto avaliando a ocorrência de mecanismos de regulação epigenética no gene de *FLII* na hanseníase em células de indivíduos com a doença.

*Hipótese: O mecanismo de metilação epigenética silencia ou ativa de forma diferencial o gene de *FLII* trazendo repercussão na susceptibilidade ao desenvolvimento da hanseníase.*

III. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, que consiste em importante problema de saúde pública especialmente em países em desenvolvimento. Mais de duzentos mil casos novos por cada 100 mil habitantes foram registrados anualmente nos anos de 2012 e 2013, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012; 2013). A doença é notificada em 102 países ao redor do mundo, principalmente na África (20 países), Américas (25 países), sudeste da Ásia (11 países), região mediterrânea-oriental (14 países) e região pacífica-ocidental (32 países), sendo estes países responsáveis por cerca de 75% da casuística da doença. (WHO, 2011; 2014).

No Brasil, o coeficiente de detecção de novos casos para o período entre 2001 e 2007 foi de 26,26/100.000 habitantes, sendo que das 5 regiões do país, 4 apresentam áreas consideradas hiperendêmicas [coef.>10], exceto a região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). A cada ano, cerca de 47.000 casos novos são detectados no país, sendo 8% deles diagnosticados em menores de 15 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011).

A doença afeta geralmente a pele, nervos periféricos, vias aéreas superiores e a transmissão via aerossóis exige um contato íntimo e prolongado com indivíduos bacilíferos para que a infecção ocorra. A hanseníase apresenta um largo espectro de manifestações clínicas caracterizadas pelas formas polares tuberculóide (TT), lepromatosa (LL), e manifestações intermediárias limítrofes ou “borderlines”: *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB) e *borderline lepromatosa* (BL). Em adição, episódios inflamatórios agudos podem ocorrer: reação hansênica do tipo 1 (reação reversa – RR) e do tipo 2 (eritema nodoso hansênico – ENH) (ALCAIS *et al.*, 2005; LOCKWOOD *et al.*,

2008; KAHAWITA *et al.*, 2008), que refletem tanto a resposta imune celular ao *M. leprae* (GOULART *et al.*, 2000; FINIASZ *et al.*, 2006; SINSIMER *et al.*, 2010) quanto a susceptibilidade genética do indivíduo à infecção (BEIGUELMAN, 2002; FRANCESCHI *et al.*, 2009; HSIEH *et al.*, 2010).

Em um pólo da doença está a forma tuberculóide (TT), caracterizada por uma resposta inflamatória do tipo Th1, poucas lesões que apresentam baixo número relativo de bacilos, e uma robusta resposta imune mediada por células. Análises das lesões de pacientes com a forma TT mostraram maiores quantidades de células T CD4+ e o perfil de resposta imune do tipo TH1 com predominância de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-1 (YAMAMURA *et al.*, 1991; SALGAME *et al.*, 1991). No pólo oposto da doença está a forma lepromatosa (LL), caracterizada por uma resposta imune de perfil Th2 e ampla imunidade humoral, bem como numerosas lesões com alta carga bacilar, representando a disseminação da doença (PIRIS *et al.*, 2010; MODLIN, 2011). Além disto, lesões provenientes de pacientes com a forma LL apresentaram maiores quantidades de células T CD8+ com perfil de citocinas do tipo TH2 como IL-4 e IL-10 (YAMAMURA *et al.*, 1991; SALGAME *et al.*, 1991).

No curso da doença podem ocorrer episódios inflamatórios agudos, as reações hansênicas, as quais são responsáveis pela maior parte do dano tecidual observado nos pacientes, e a morbidade resultante associada à doença ocorre devido a resposta imune exagerada induzida no curso destas reações (YAMAMURA *et al.*, 1992). Sabidamente, a RR representa uma resposta inflamatória exacerbada da imunidade mediada por células (resposta Th1) acometendo pacientes com apresentações limítrofes “borderlines” da doença, enquanto o ENH acontece geralmente em pacientes que apresentam a forma lepromatosa da doença pela deposição de complexos imunes, levando a vasculite cutânea e sistêmica (PIRIS *et al.*, 2010; SCOLLARD *et al.*, 2006).

Genes da região do MHC de classe III são importantes reguladores da resposta imune. Neste contexto, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória produzida por células Th1 que pode inibir a proliferação de células Th2, e desempenha um papel chave na defesa do hospedeiro contra patógenos (MOSMANN *et al.*, 1989; FISHMAN *et al.*, 1994; MOORE *et al.*, 2001). A linfotóxina alfa (LTA) também denominada de TNF- β , é uma citocina membro da família de TNF que medeia uma variedade de respostas imunoestimulatórias e antivirais (NEDWIN *et al.*; 1985; AGGARWAL *et al.*; 1986). O transcrito 1 associado ao HLA de classe III (BAT1) está localizado em região gênica vizinha a TNF- α e atua regulando negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (ALLCOCK *et al.*; 2001). De forma antagônica, a interleucina 10 (IL-10) é secretada por células de perfil Th2 e atua modulando a síntese de citocinas inflamatórias por células Th1, representando uma das mais importantes citocinas imunoregulatórias (MOSMANN *et al.*, 1989; FISHMAN *et al.*, 1994; MOORE *et al.*, 2001). O fator de transcrição e integração semelhante a leucemia 1 (*FLII*) é membro da família dos fatores de transcrição de fixação de DNA e está envolvido na proliferação celular, tumorigênese e caminho de cura de lesões (MHAWECH-FAUCEGLIA *et al.*; 2006; KORODA *et al.*; 2006; SAKTHIANANDESWAREN *et al.*; 2010). Polimorfismos nos genes destas citocinas e fatores de transcrição vêm sendo associados com doenças autoimunes como doença de Crohn, artrite reumatóide e psoríase (AGUILLON *et al.*, 2006), doenças neurodegenerativas como alzheimer e parkinson (CARDOSO *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011) e doenças infecciosas como dengue (FERNANDEZ-MESTRE *et al.*, 2004) tuberculose (PACHECO *et al.*, 2008), leishmaniose (KARPLUS *et al.*, 2002; CASTELLUCCI *et al.*, 2011) e também com a hanseníase (FRANCESCHI *et al.*, 2009).

Nos últimos anos vêm sendo demonstrada a importância do componente genético na susceptibilidade à infecção pelo *M.leprae* (SIDDIQUI *et al.*, 2001; MIRA *et al.*, 2004;

FINE *et al.*, 2007; FRANCESCHI *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2011). Entretanto, o foco de estudos que mostram a contribuição de fatores genéticos do hospedeiro no entendimento da susceptibilidade ou resistência a hanseníase é recente, se comparado ao interesse e ao avanço sobre a imunopatogênese da doença. Considerando a hanseníase uma doença complexa, fazem-se necessários estudos buscando um melhor entendimento sobre a patogênese, de acordo com as populações afetadas, a fim de auxiliar no desenvolvimento futuro de novas formas de prevenção e terapia.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DA HANSENIASE

De acordo com relatórios oficiais recebidos de 103 países a partir de 5 regiões da Organização Mundial da Saúde, a prevalência mundial da hanseníase registrada no final do ano de 2013 foi de 180 618 casos. O número de novos casos relatados globalmente em 2013 foi de 215 656 em comparação com 232 857 no ano de 2012 e 226 626 em 2011, incidência que indica grau de transmissão continuada da infecção na população (WHO, 2015).

Embora um total de 13 países não tenham notificado casos em 2013, as estatísticas globais mostram que 206 107 (96%) novos casos de hanseníase foram notificados de 14 países, e apenas 4% dos casos novos foram provenientes do resto do mundo. Apenas esses 14 países são responsáveis cada um, por mais do que 1000 casos novos em 2013. Bolsões de alta endemicidade da hanseníase ainda permanecem em algumas áreas de muitos países, mas alguns são citados como referência: Angola, Bangladesh, Brasil, República Popular da China, República Democrática do Congo,

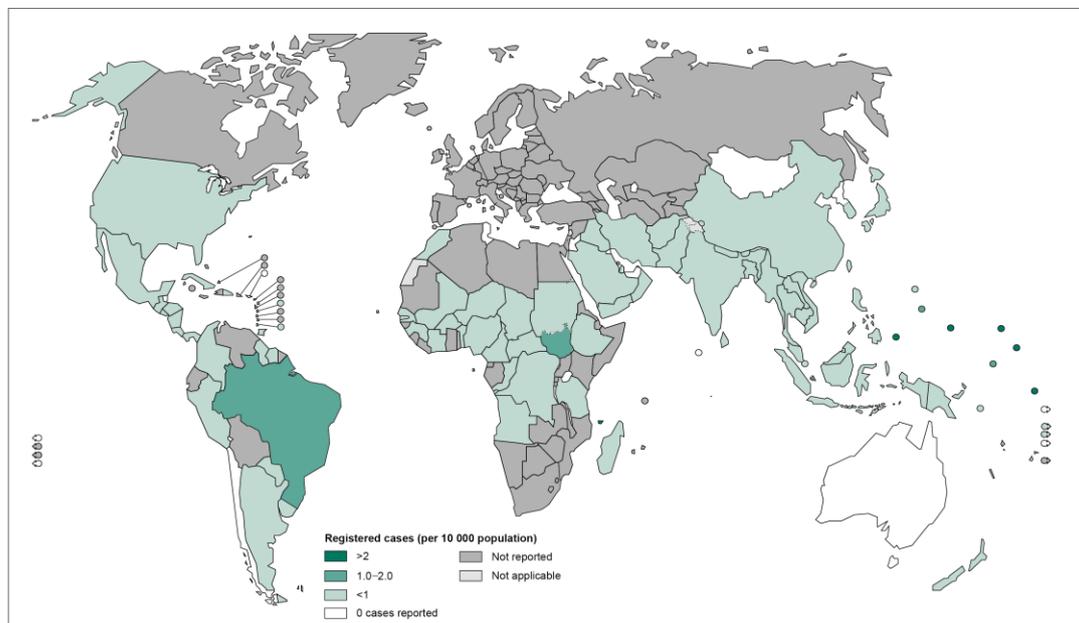
Etiópia, Índia, Indonésia, Madagascar, Moçambique, Mianmar, Nepal, Nigéria, Filipinas, Sudão do Sul, Sri Lanka, Sudão e República Unida da Tanzânia (WHO, 2015).

Apesar deste cenário, a taxa de prevalência global da doença caiu em 90%: de 21,1 por 10 000 pessoas para menos de 1 por 10 000 pessoas em 2000. Redução impactante foi alcançada na carga global de doenças: de 5,2 milhões em 1985; 805 000 em 1995; 753 000 no final de 1999 e 180 618 casos no final de 2013. Entretanto, no início de 2014, um total de 102 países notificou casos de hanseníase à OMS: 20 da Região Africana, 25 da Região das Américas, 11 da região sudeste da Ásia, 14 da Região do Mediterrâneo Oriental e 32 da Região do Pacífico Ocidental. A maioria dos países europeus não relataram casos nos últimos anos, embora vários tenham detectado alguns casos anualmente. No início de 2014, foram registrados 215 656 casos novos de hanseníase, e a prevalência foi da ordem de 180 618 casos ao redor do mundo, conforme ilustrado na Figura 1 (WHO, 2015).

No Brasil a razão de prevalência foi da ordem de 1.42168 casos registrados para cada 10.000 indivíduos na população em 2013 (WHO, 2015). O coeficiente de detecção de novos casos para o período entre 2001 e 2007 foi de 26,26/100.000 habitantes, sendo que das 5 regiões do país, 4 apresentam áreas consideradas hiperendêmicas [coef.>10], exceto a região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2008). A cada ano, cerca de 47.000 casos novos são detectados no país, sendo 8% deles diagnosticados em menores de 15 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2011).

Figura 1. Taxa de prevalência de hanseníase referentes ao ano de 2013, Segundo a Organização Mundial de Saúde (2015, dados de 2013).

Registered cases of leprosy per 10 000 population (prevalence rates), 2013



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2014. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 1: Taxa de prevalência de hanseníase referentes ao ano de 2013, Segundo a Organização Mundial de Saúde (2015, dados de 2013). De acordo com relatórios oficiais, a prevalência da doença foi da ordem de 180 618 casos ao redor do mundo. No Brasil a razão de prevalência foi da ordem de 1.42168 casos registrados para cada 10.000 indivíduos na população em 2013. Fonte: (OMS, 2015).

IV.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE

O amplo espectro clínico apresentado na hanseníase se deve, necessariamente, ao perfil imunológico e genético dos indivíduos afetados. A classificação mais utilizada foi proposta por RIDLEY e JOPLING em 1966 e 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: a forma tuberculóide polar (TT)

caracterizada por lesão cutânea ou neural localizada e predomínio de resposta imune celular, com pouco ou nenhum bacilo; a forma lepromatosa polar (LL) onde observa-se deficiência de resposta imune celular e predomínio de resposta humoral, sendo a forma contagiosa da doença. No meio deste espectro estão as formas interpolares ou intermediárias – denominadas *borderlines* – são: *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB) e *borderline* lepromatosa (BL). Estas formas 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, também denominada de forma indeterminada (I), 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, ou evoluir para um dos

polos ou permanecer como forma 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). Neste contexto, são considerados como paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) aqueles indivíduos 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 ou baciloscopia negativa, e os pacientes MB são aqueles que exibem mais de cinco lesões cutâneas e baciloscopia positiva (BRASIL, 2010).

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; MENDONÇA; BRITO ALVIM DE MELO *et al.*, 2008).

Durante todo o curso natural da doença, os pacientes também podem desenvolver complicações clínicas denominadas 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 gerando incapacidades físicas (CARDOSO, PEREIRA *et al.*, 2011). As reações hansênicas devem ser prontamente diagnosticadas e tratadas. A RR 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, sendo considerada reação mediada pela imunidade celular. A RR ocorre em pacientes que apresentam características específicas de reação como: inflamação aguda nas lesões pré-existentes, tornando-se 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 RR ocorre, principalmente, em pacientes com as formas BT, BB e BL, ocorrendo excepcionalmente em indivíduos com forma LL.

O ENH ocorre mais frequentemente em pacientes das formas LL e BL da hanseníase, e pode se manifestar cursando 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 quadros reacionais (OLIVEIRA; ALENCAR; *et al.*, 2004; SILVA; GRIEP, 2007). Adicionalmente, os portadores de hanseníase podem também apresentar reações mistas, ou seja, reações tipo I e II ao mesmo tempo.

O diagnóstico dos estados reacionais é realizado através do exame físico geral e dermatoneurológico do paciente, e sua identificação não contraindica o início do tratamento (PQT/OMS). Quando os estados reacionais aparecem durante o tratamento, o procedimento é manter o esquema de tratameto de acordo com a forma clínica apresenada pelo paciente, sem interrupção, uma vez que esta connduta reduz significativamente a

frequência e a gravidade das reações. Adicionalmente à PQT/OMS deve ser adicionadas a terapêutica antirreacional com prednisona ou clofazimina de acordo com o quadro clínico apresentado (BRASIL *et al.*, 2005).

IV. 3. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA HANSENIASE

A resposta do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae* como determinante das características clínicas apresentadas pelo paciente foi apontada em 1954, quando Mitsuda mostrou pela primeira vez que a injeção intradérmica destes bacilos mortos levava um tempo de 3 a 4 semanas para produzir uma reação da pele com eritema e edema no local. Tais reações foram observadas apenas nos pacientes com a forma TT e não com os pacientes LL, indicando que a resposta inflamatória do sujeito era dependente da resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae*, único bacilo capaz de infectar e residir em células de Schwann, levando à perda sensorial (EICHELMANN *et al.*, 2013; LASTÓRIA & ABREU, 2014; NATH *et al.*, 2015). Subsequentemente foi demonstrado que um fator lipídico solúvel do bacilo também produzia reação imunológica semelhante em período mais curto, de 48 a 72 horas, correspondendo à reação de hipersensibilidade tardia. Características histopatológicas em conjunto com os testes cutâneos e estudos imunológicos, indicam que os pacientes TT têm imunidade mediada por células T e manifestam reações de hipersensibilidade do tipo tardia ao patógeno, enquanto sujeitos LL tem elevada produção de anticorpos, mas pouca ou nenhuma função de células T. (LASTÓRIA & ABREU, 2014; NATH *et al.*, 2015).

O pólo TT da hanseníase é imunologicamente caracterizado por resposta inflamatória do tipo Th1, poucas lesões que apresentam baixo número relativo de bacilos, e uma robusta resposta imune mediada por células. Análises das lesões destes pacientes mostraram maiores quantidades de células T CD4+ e o perfil de resposta imune do tipo

TH1 com predominância de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-1 (YAMAMURA *et al.*, 1991; SALGAME *et al.*, 1991). O pólo BB é caracterizado por resposta imune de perfil Th2 e forte imunidade humoral, bem como numerosas lesões de pele e alta carga bacilar, representando a disseminação da doença (PIRIS *et al.*, 2010; MODLIN, 2011). Análises das lesões destes pacientes apresentaram maiores quantidades de células T CD8+ com perfil de citocinas do tipo TH2 como IL-4 e IL-10 (YAMAMURA *et al.*, 1991; SALGAME *et al.*, 1991). Nas apresentações agudas da hanseníase, a RR representa uma mudança do sistema imunológico para imunidade mediada por células (resposta Th1) acometendo pacientes com apresentações limítrofes *borderlines* da doença, enquanto o ENH acomete geralmente pacientes que apresentam a forma lepromatosa da doença, refletindo a deposição de complexos imunes, levando a vasculite cutânea e sistêmica (PIRIS *et al.*, 2010; SCOLLARD *et al.*, 2006).

Devido à ausência de um bom modelo animal para mimetizar o espectro da hanseníase, as investigações imunológicas são possíveis apenas em doentes depois de terem desenvolvido a doença clínica, o que torna difícil separar os efeitos causais iniciais a partir das características já estabelecidas de imunidade adquirida. Isto é ainda mais complicado pelo longo período de incubação da doença, que se estende desde meses a muitos anos, bem como pelo fato do *Mycobacterium leprae* não ser cultivável *in vitro* (NATH *et al.*, 2015).

IV. 4. ASPECTOS GENÉTICOS NA HANSENÍASE

Os estudos que mostram a contribuição de fatores genéticos do hospedeiro no entendimento da susceptibilidade ou patogênese da hanseníase é recente, considerando o interesse e o avanço sobre a imunopatogênese da doença. O envolvimento de fatores genéticos do hospedeiro na susceptibilidade à doença foi estabelecido através de estudos de

segregação (ABEL; DEMENAIIS *et al.*, 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). 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, como ocorre em outras doenças complexas, 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).

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*. Juntas, 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). O gene *PARK2* codifica uma ubiquitina ligase E3, que desempenha um papel importante na via da ubiquitina-proteassoma de degradação da proteína intracelular. No entanto, *PARK2* também regula o processamento de antígenos proteicos dentro de macrófagos, afetando a apresentação de antígenos (SCOLLARD & ADAMS *et al.*, 2006), além de estar envolvido na resposta celular antioxidante e anergia das células T (SCHURR & ALCAIS *et al.*, 2006)

. O *PACRG* é um gene vizinho de função desconhecida (MIRA *et al.*, 2003; MIRA & ALCAIS *et al.*, 2004), mas em conjunto com *PARK2* têm sido relatado como envolvido na degradação de proteínas da via de sinalização de TLRs e NF- κ B (SCHURR & ALCAIS *et al.*, 2006). Marcadores destes dois genes foram fortemente associadas à hanseníase em uma amostra de famílias vietnamitas e esta associação foi replicada na população brasileira em estudo tipo caso-controle, mostrando um papel estável destes genes em diferentes condições geográficas e epidemiológicas (MIRA *et al.*, 2004).

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).

Estudos funcionais e de associação genética identificaram um número de polimorfismos em genes toll like receptors (*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).

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). 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. 5. ESTUDOS GENÉTICOS EM GENES DO MHC DE CLASSE III – *TNFA*, *LTA* E *BATI* - E A HANSENÍASE

O TNF- α é uma citocina codificada pelo gene *TNFA* e sintetizada como uma proteína de membrana, principalmente por macrófagos e células T, que é clivada para produzir uma forma solúvel de 17KDa (VASSALI, 1992). O TNF- α solúvel é um potente mediador capaz de induzir estímulos potencialmente patogênicos que atuam rapidamente na promoção da resposta inflamatória e imunológica. Entretanto, quando produzido em excesso e liberado de forma sistêmica em grandes quantidades, pode levar a complicações fatais como colapso circulatório e falência múltipla de órgãos (SILVA, 2003).

O polimorfismo -308A/G no promotor do gene *TNFA* foi associado com formas mais agressivas da hanseníase em pacientes brasileiros do Sudeste do país (SANTOS & ALMEIDA *et al.*, 2000). Franceschi e colaboradores, 2009, demonstraram associação entre o genótipo GG com a hanseníase em população brasileira, sendo o genótipo GG associado com as formas tuberculóide e *borderline borderline* de doença em relação a controles sem a doença avaliados (14,5% vs. 25.9%; p=0,009). O genótipo GG também foi descrito por Tarique e colaboradores, 2015, como associado com a hanseníase em população indiana (p=0,01).

Cardoso e colaboradores, 2011, mostraram um efeito protetor do alelo -308A ([OR] 0,77; P=0.005), reforçado por uma meta-análise subsequente após a inclusão dos novos dados (OR=0,74; P =0,04). Além disso, uma análise de subgrupo incluindo somente estudos brasileiros sugeriu que esta associação é específica para essa população (OR=0,63; P =0,005). Estudo realizado em famílias com múltiplos indivíduos afetados demonstrou que o alelo TNF*1 da região promotora -308 está associado com a doença *per se* com alta significância (P=0.0001). Análise de desequilíbrio de ligação revelaram dois locus em haplótipos sugerindo susceptibilidade (TNF*1/LTA*2) e proteção (TNF*2/LTA*2) na região do MHC de classe III (SHAW *et al.*, 2001).

A linfotóxina alfa (LTA) é uma glicoproteína citotóxica composta por 17 aminoácidos homóloga ao fator de necrose tumoral- β e produzida por linfócitos Th1 (RUDDLE *et al.*, 1968, Williams *et al.*, 1968). O gene de *LTA* está geralmente em desequilíbrio de ligação com a região promotora de *TNFA* (GRAUDET *et al.*, 2007; ALCAIS *et al.*, 2007). Tanto *LTA* quanto *TNFA* são essenciais para a regulação do granuloma, mas tem papéis distintos no recrutamento linfocitário e manutenção da resposta granulomatosa durante infecção crônica por *M. leprae* (HAGGE *et al.*, 2009)

Estudo familiar do tipo caso-controle em população indiana e estudo familiar vietnamita mostraram baixa produção desta linfocina entre carreadores do alelo A (LTA +80 A/G) significativamente associada com aumento de risco para hanseníase (P = 0,007 e P = 0,01, respectivamente). Análises de um caso-controle adicional em amostra brasileira e extensão do estudo familiar vietnamita mostraram que o efeito deste polimorfismo foi ainda mais forte em indivíduos jovens (ALCAIS *et al.*, 2007). Existem apenas 16 estudos publicados na base de dados PubMed sobre linfotóxina e doenças infecciosas, e a maior parte relata influência sinérgica com TNF devido ao desequilíbrio de ligação bem documentado entre os dois genes.

O transcrito 1 associado ao HLA de classe III (*BAT1*), está localizado no braço curto do cromossomo 6 do genoma humano, nas proximidades dos genes de *TNFA* e *LTA*, associado ao complexo principal de histocompatibilidade de classe III Humano, região que contém genes que afetam a susceptibilidade a desordens imunopatológicas (ALLCOCK, PRICE *et al.*, 1999; PRICE, WONG *et al.*, 2004). O *BAT1* atua na regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α (ALLCOCK, WILLIAMS *et al.*, 2001; PRICE, WONG *et al.*, 2004), e desempenha um papel fundamental na exportação do RNA mensageiro do núcleo para o citoplasma (SPIES, 1989; PEELMAN, CHARDON *et al.*, 1995) e na translação (ALLCOCK, PRICE *et al.*, 1999).

Pesquisa na base de dados do PubMed sobre polimorfismos no gene de *BAT1* com a hanseníase, revelou a existência de apenas uma publicação, na qual Ali e colaboradores, 2012, referem associação entre os genótipos TT+CT do polimorfismo rs2523504 com a doença em população Indiana (OR=1,48; IC=1,25-1,91; p=2,5).

IV. 6. ESTUDOS GENÉTICOS COM A INTERLEUCINA 10 (IL-10)

A IL-10 é inibidora da síntese de outras citocinas, representando uma das mais importantes citocinas imunoregulatórias. É produzida por macrófagos, mastócitos e linfócitos T e B, e algumas linhagens de células tumorais (MOSMANN *et al.*, 1989; MOORE *et al.*, 2001).

Franceschi *et al.*, 2009, avaliou polimorfismos no promotor do gene de IL10 nas posições -592, -819 e -1082 com a hanseníase e encontrou baixa frequência para o haplótipo GCC/GCC em pacientes com a forma lepromatosa em comparação com controles sem a doença avaliados (6,2% vs. 15,4%), embora esta diferença não tenha sido significativa. Pereira e colaboradores, 2009, observou associação entre alelo T do polimorfismo na posição -819 de *IL10* com susceptibilidade a hanseníase em brasileiros

(OR=1,40; p=0,01). Cardona-Castro *et al.*, 2012, avaliando população Colombiana encontrou associação entre os genótipos CC e CT do polimorfismo na posição -819 com a hanseníase, com um risco aumentado em 4,34 vezes para o desenvolvimento da doença (p=0,001).

Moraes *et al.*, 2004, avaliando polimorfismos nas posições -3575, -2849 e -2763 do gene de *IL10*, documentou associação entre o haplótipo AGC com resistência contra hanseníase e desenvolvimento de formas graves de doença tanto nos modelos binomial quanto ordinal, respectivamente (controles vs. casos, P=0,005, OR=0,35, IC=0,13–0,91), PB vs MB, P=0,006, OR=0,32, IC=0,12–0,83). Em contraste, o haplótipo TAC foi associado com susceptibilidade a hanseníase *per se*, mas não com formas clínicas da doença (P=0,027, OR=2,37, IC=1,04–5,39).

IV. 7. ESTUDOS GENÉTICOS COM O (FLI-1)

O *FLII* é um fator transcricional que é ativado quando seu sítio de ligação se localiza nas proximidades do sítio de iniciação da transcrição gênica, especialmente em regiões contendo microssatélites (BOEVA *et al.*, 2010). Mapeamento fino na região do cromossomo 9 em camundongos (cromossomo 11q24 nos seres humanos) identificou o *Fli1* (Friend leukemia virus integration 1; *FLII* em seres humanos) como um novo candidato influenciando na resistência à *L.major* e na resposta à cura de lesões e reparo tecidual em modelo murinho de leishmaniose. Para determinar se o polimorfismo no gene *FLII* era importante também na leishmaniose em humanos, SNPs ligados a dois grandes blocos de desequilíbrio de ligação e ao promotor proximal do gene *FLII* foram analisados em 325 famílias afetadas por *L. braziliensis* em uma área endêmica da Bahia (CASTELLUCCI *et al.*, 2011). A região promotora proximal do *FLII* contém uma região de microssatélites GAn funcional, bem como ilhas CpG, que abrange a região promotora

proximal e a região intrônica 5' deste gene. O trabalho supracitado mostra uma significativa associação entre *FLII* (rs7930515, $P=1.8 \times 10^{-4}$) e susceptibilidade à leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* também em humanos, corroborando o que foi previamente observado em camundongos congênicos. No modelo animal, resistência a *L. major* determinada por genes ligados à *Fli1* e à via da citocina TGF- β , foi correlacionada com uma melhor resposta de cicatrização de lesões com presença de grande população de fibroblastos, deposição de uma organizada e abundante rede de colágeno e, menor deposição de células inflamatórias. Estudos recentes têm mostrado uma associação entre aumento da expressão do colágeno tipo I e repressão epigenética do gene *FLII*. (WANG *et al.*, 2006).

Na literatura não existe até o momento estudos sobre polimorfismos no gene de *FLII* e a hanseníase. Sendo esta uma doença que como a leishmaniose tegumentar, também se manifesta clinicamente com lesões na pele, a avaliação que este estudo propõe pode fornecer uma via relacionada ao dano tecidual, que seja compartilhada pelas duas doenças. Essa associação pode fortalecer a via do gene de *FLII* como candidata a estudos de novos alvos terapêuticos no tratamento de lesões cutâneas (SAKTHIANANDERWAREN *et al.*, 2005; SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2010; CASTELLUCCI *et al.*, 2012).

V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

V. 1. SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS E DESENHO DO ESTUDO

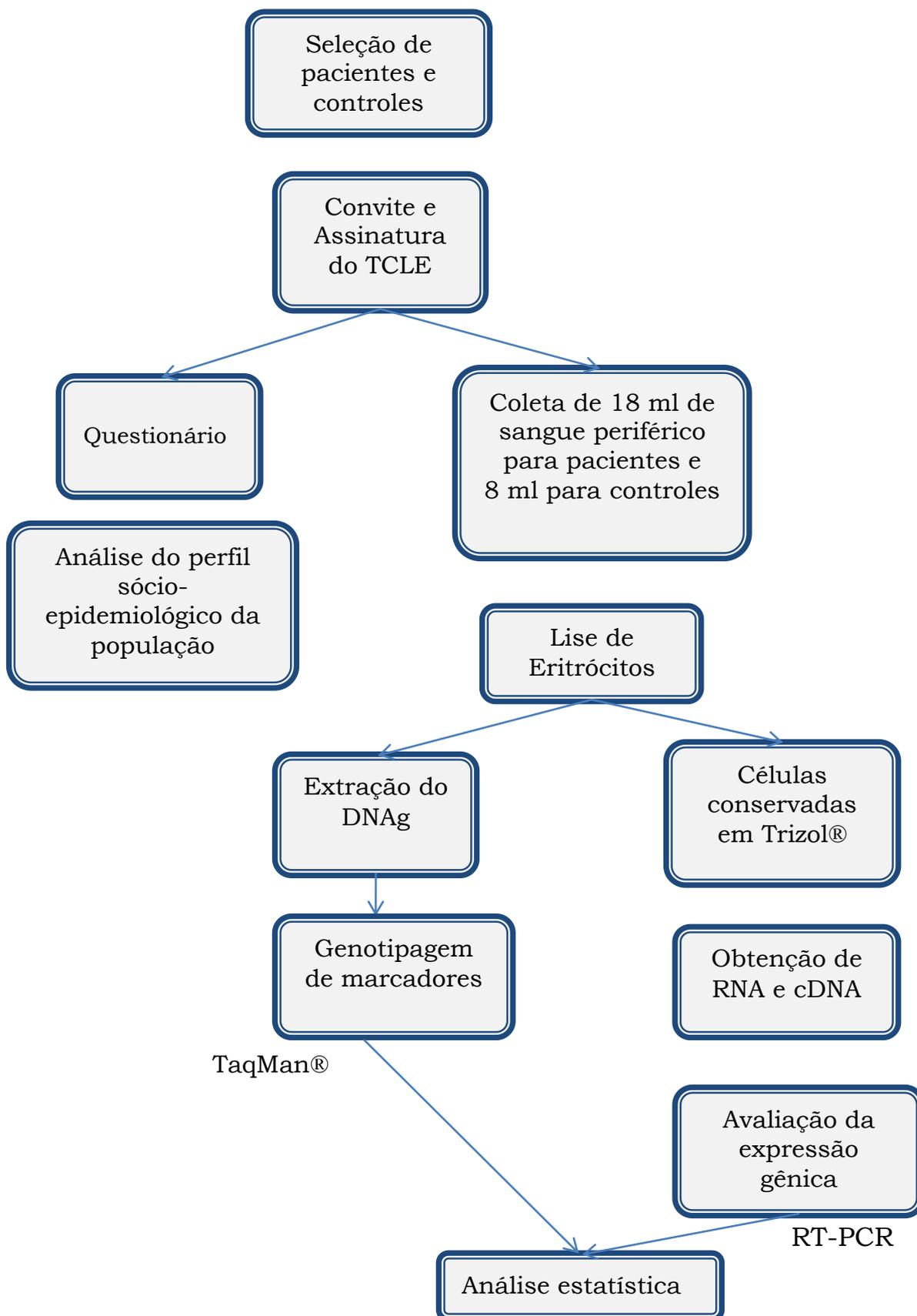
O ambulatório de hanseníase no edifício Magalhães Neto – Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia, e o Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes, localizados em Salvador, Bahia, são centros de referência para o diagnóstico e tratamento da hanseníase para todo o estado. O ambulatório Magalhães Neto atende cerca de 60 pacientes com hanseníase por mês, funciona desde 1992, e é especializado no tratamento de episódios reacionais. O Hospital Especializado Dom Rodrigo de Menezes fazia parte da Secretaria da Saúde do Estado (SESAB), era especializado em dermatologia sanitária e funcionou até o ano de 2013, sendo o atendimento transferido para o Hospital Couto Maia, localizado na mesma cidade e que é um reconhecido centro de referência para o diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas na Bahia.

Para este estudo caso-controle foram incluídos 362 pacientes matriculados nestes hospitais (Casos-índice), de ambos os sexos, diagnosticados para a doença e que faziam tratamento e acompanhamento nestes centros, com a idade variando entre 18 e 65 anos. Todos os indivíduos que preencheram estes critérios de inclusão foram convidados à participação, após explicação acerca do estudo, e foi procedida a coleta da autorização formal mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) com os que aceitaram participar. Em seguida, realizou-se entrevistas guiadas por questionário clínico-epidemiológico para registro de informações sociodemográficas e ocupacionais, bem como posterior coleta de sangue para obtenção de DNA, RNA e soro. Previamente à inclusão, foram realizadas confirmações diagnósticas pela equipe clínica, mediante avaliações dermato-neurológicas, teste de sensibilidade (estesiometria), exame de

baciloscopia da linfa e a biópsia de uma ou mais lesões para a definição da forma clínica da doença. Foram excluídos aqueles pacientes com quadro infeccioso relatado em entrevista, ou verificado durante exame, num prazo inferior a 30 dias, portadores de doenças auto-imunes ou genéticas.

Foram recrutados 368 indivíduos controles sem a doença entre doadores de sangue sem grau de parentesco com os pacientes, da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), convidados à participação no estudo após explicação acerca do mesmo, coleta de assinatura do TCLE mediante aceite, e coleta de material biológico, obedecendo o mesmo critério de inclusão de idade aplicado para os casos-índice incluídos. Estes indivíduos não apresentavam infecção pelo bacilo *M. leprae* nem qualquer outra doença infecciosa, e 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. O grupo controle sem a doença incluído foi triado na entrevista clínico-epidemiológica a fim de serem recrutados aqueles não-contactantes e, portanto, não expostos à indivíduos com hanseníase, buscando a minimização de vies. Como os centros de atendimento do estudo são referencia para diagnóstico e tratamento da doença para todo o estado da Bahia, esta característica trouxe a dificuldade de incluir um grupo de controles contactantes dos casos-índice, devido a dificuldade operacional de custo para trazer um acompanhante de diversas cidades do interior para o tempo de execução e análise deste estudo. Entretanto, este grupo foi sendo construído ao longo do tempo para os trabalhos subsequentes e enriquecimento das análises e comparações com o grupo controle ideal. O fluxograma esquemático do estudo é apresentado na Figura 2.

Figura 2. Fluxograma esquemático do estudo caso-controlado.



V.2. DEFINIÇÃO DE CASOS:

V.2.1. HANSENÍASE *PER SE*

São aqueles pacientes diagnosticados com hanseníase, nas diferentes formas clínicas, sem evidência do desenvolvimento de reação hansênica. Os pacientes foram classificados de acordo com critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde, nas formas clínicas: indeterminada, tuberculóide (TT), *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB), *borderline* lepromatosa (BL) e lepromatosa (LL). 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 do 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.2.2. 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 presença desta reação durante o tratamento ou após seu retorno para acompanhamento. Foi definido como portadores de reação tipo I na avaliação médica os pacientes que apresentavam: 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.2.3. 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. 3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS:

MÉTODOS DO OBJETIVO 1:

V. 3. 1. Extração de DNA e genotipagem dos marcadores genéticos:

Sangue (8 mL) foi coletado através de punção venosa em tubos a vácuo contendo citrato ácido dextrose (ACD) (Becton Dickinson). O DNA genômico foi obtido utilizando o método de *salting-out* com Proteinase K, como descrito por Sambrook e colaboradores (Sambrook et al., 1989).

A genotipagem dos marcadores (SNPs) foi realizada utilizando ensaios pré-desenhados de PCR quantitativo pelo método de TaqMan® (Life Technologies) para polimorfismos no genes de *TNFA*, *LTA* e *BAT1*, *IL10*, e *FLII*, como apresentado na Tabela 2. Os SNPs foram selecionados com base em sua utilização prévia como *tagging* SNPs em outros estudos de associação (METLAPALLY *et al.*, 2009; ERDEI *et al.*, 2013), disponibilidade de ensaios pré-desenhados de PCR qualitativo validados, e frequência alélica mínima (FAM) $\geq 0,10$ para as populações Caucasiana (CEU) e Africana (Yri) do projeto HapMap. Estas duas populações de referência foram selecionados para simular ao máximo possível a mistura étnica da população da Bahia. Todos os SNPs avaliados estavam em Equilíbrio de Hardy Weinberg.

Tabela 2. Painel de SNPs genotipados no estudo.

Gene_SNP	Localização	Cromossomo	Alelos	Frequência alélica mínima		
				(BA)	(CEU)	(YRI)
TNF_rs1800629	promotor(-308)	6	A/G	0,175	0,173	0,088
TNF_rs1799964	promotor	6	C/T	0,210	0,212	0,124
LTA_rs909253	Intron (+252)	6	A/G	0,357	0,360	0,482
LTA_rs1800683	5`UTR	6	A/G	0,397	0,392	0,466
BAT_rs2239527	5`UTR	6	G/C	0,381	0,382	0,466
IL10_rs1800896	Inter/Promotor	1	T/C	0,369	0,469	0,274
IL10_rs1800871	Inter/Promotor	1	A/G	0,373	0,170	0,464
IL10_rs3024496	3`UTR	1	A/G	0,594	0,478	0,363

FLI1_rs7930515	Intron 1	11	C/G	0,303	0,308	0,039
----------------	----------	----	-----	-------	-------	-------

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).

MÉTODOS DO OBJETIVO 2:

V. 3. 2. Cultura de macrófagos:

Células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) foram isoladas por gradiente de centrifugação de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare BioSciences AB, Sweden) a partir de sangue venoso (60 mL) heparinizado. Após duas lavagens com 0,9% NaCl, células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 6 dias em RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 UI/mL de penicilina e 100 ug/mL de estreptomicina para maturação dos monócitos em macrófagos. Após este período de incubação, as células foram ajustadas para 1 x 10⁶ células/mL e plaqueadas em placas de 12 poços em duplicatas. As placas foram incubadas por 24 horas para aderência das células na placa. Após esta incubação, os poços foram lavados com HBSS para retirada de células que não aderiram. Os macrófagos foram estimulados com antígeno sonificado de *M. leprae* 5ul por poço na concentração de 10mcg/mL e incubados durante 3, 24, 48 e 72 horas. Após estes períodos, procedeu-se a coleta dos sobrenadantes e dos macrófagos aderidos. Uma das duplicatas de células foi utilizada para extração de DNA e recuperada com solução de congelamento (50% soro fetal bovino, 40% RPMI-1640 e 10% DMSO), e mantida a -70°C, enquanto na duplicata restante, as células foram utilizadas para extração de RNA e recuperadas em TRIzol Reagent (Invitrogen), sendo também congeladas a -70°C.

V. 3. 3. Extração de RNA, obtenção de cDNA e ensaio de expressão gênica para o gene de *TNFA*:

Leucócitos totais de pacientes que não estavam sob tratamento com fármacos imunossupressores, tais como talidomida ou prednisona (no caso dos pacientes usando com ENH) foram homogeneizados em TRIzol (Life Technologies). RNA foi extraído usando o kit PureLink™ RNA Mini Kit (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração total de RNA foi determinada em espectrofotômetro óptico com mensuração da densidade (260 and 280 nm). Para cada amostra testada, a razão entre as leituras espectrofotométricas entre 260 nm and 280 nm (OD260/OD280) foi utilizada para fornecer uma pureza estimada do ácido nucléico, e a razão em todas as amostras foi entre 1,7 e 2,0. Reações da transcriptase reversa foram realizadas usando o High Capacity cDNA Reversion Transcription Kit (Applied Biosystems®) seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi mantido a -70°C até o uso. Ensaio contendo primers e sondas específicas para o gene de *TNFA* (Hs01038318_ml) foi adquirido com a Applied Biosystems®. Os níveis de mRNA foram normalizados contra o gene da beta-actina dentro de cada amostra. Real-time PCR foi realizado seguindo o protocolo usando o equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems®). Os resultados foram analisados comparando o ciclo “threshold” (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ onde ΔCT é o valor de Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene endógeno, e $\Delta\Delta\text{CT}$ o valor de ΔCT de cada indivíduo, menos a mediana de ΔCT do grupo controle.

V. 3. 4. Extração de RNA, obtenção de cDNA e ensaio de expressão gênica para o gene de *IL10*:

O RNA e o DNA foram obtidos como descrito anteriormente. A expressão do gene de *IL10* foi realizada pelo método qRT-PCR multiplex em sistema microfluídico da

Fluidigm, no qual é analisado um painel de genes, dentre ele, nosso gene de interesse, avaliando até 96 amostras de uma única vez.

Inicialmente, 100 ng de cDNA foi pré-amplificado em um termociclador convencional (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) com uma mistura de 48 oligonucleotídeos para cada uma das 96 amostras simultaneamente. Para isso, foi utilizado 2,5 µL do TaqMan preAmp Master mix (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) na presença de 200 nM de cada oligonucleotídeo e 1,25 µL de cada cDNA em 5 µL finais, nas seguintes condições da reação: 95° C por 10 minutos, seguido de 14 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos. Posteriormente, o cDNA pré-amplificado é carregado no controlador de fluídos e depois amplificado no sistema Biomark (Fluidigm, EUA), que com um sistema de microfluidica, define 9216 pontos com poços de 8nl possibilitando a amplificação simultânea de 96 amostras por 96 oligonucleotídeos, ou como foi utilizado em nosso estudo, 48 oligonucleotídeos em duplicata.

Para a amplificação em tempo real no sistema Biomark (Fluidigm, EUA), 2 µL de cada cDNA pré-amplificado foi misturado a 2,5 µL de 2x Taqman Gene Expression Master mix (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) e 0,25 µL de 20x EvaGreen DNA binding dye (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) em 5 µL finais. Paralelamente, 20 µM de cada um dos 48 oligonucleotídeos foi misturado a 2,5 µL de 2x Assay Loading Reagent (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) em 5 µL finais. Então, ambos cDNA⁵⁷ pré-amplificado e as sondas, foram adicionados no chip (96.96 Dynamic Array IFC, Fluidigm, EUA), em seus respectivos poços, e esse chip foi colocado no IFC Controller MX (Fluidigm, EUA) para que fosse carregado. Em seguida, o chip carregado foi adicionado ao termociclador Biomark (Fluidigm, EUA) para a amplificação

simultânea das 96 amostras onde cada oligonucleotídeo foi analisado em cada uma das amostras.

A análise foi realizada a partir dos dados de acúmulo de fluorescência das duplicatas da reação de PCR multiplex em tempo real de cada amostra (ΔR_n), utilizou-se o ajuste de função logística, ou curva sigmóide, de quatro parâmetros para representar cada curva de amplificação, utilizando a biblioteca de funções qpcR, para a linguagem estatística R (R Development Core Team, 2009) versão 2.9.22. O ciclo de quantificação, ou C_q , foi determinado pelo ciclo correspondente ao ponto de máxima da primeira derivada da curva sigmóide ajustada (C_p). A eficiência de cada reação de amplificação foi calculada como a razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo anterior a esse. A eficiência estimada de cada gene foi obtida pela eficiência média das eficiências calculadas para cada reação de amplificação daquele gene. Os genes empregados na normalização entre as diferentes amostras amplificadas foram selecionados pelos métodos geNorm e NormFinder. Para a comparação das médias dos valores de expressão normalizados entre os grupos foi utilizado one-way ANOVA não paramétrica via permutação irrestrita ($n=1000$), seguido da comparação das médias par-a-par por teste t não paramétrico via permutação ($n=1000$) com correção de Bonferoni (Basso et al., 2009). Os dados são apresentados pela média \pm erro padrão da média. Níveis de significância bicaudais menores ou iguais a 0,01, 0,05 e 0,1 foram considerados como altamente significantes, significantes e sugestivos, respectivamente.

MÉTODOS DO OBJETIVO 3:

V. 3. 5. Extração de DNA para avaliação da regulação epigenética:

Após separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos pacientes e isolamento de macrófagos, DNA foi obtido utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). A digestão do DNA foi realizada com o kit EpiTect Methyl II DNA Restriction Kit (QIAGEN). As reações foram preparadas aplicando as enzimas do kit (*Methylation-sensitive enzyme A* e *Methylation-dependent enzyme B*) conforme instruções do fabricante, e incubadas por 6 horas a 37°C. Após esta incubação, as enzimas foram inativadas a 65°C por 20 minutos e estocadas a -20°C até a realização da PCR. Seguindo a etapa da digestão, o grau de metilação foi avaliado com o kit EpiTect Methyl II PCR Assay (referência 335002 EPHS102855-1A QIAGEN), pela técnica de qRT-PCR com o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®), obedecendo a seguinte ciclagem (I) 10 minutos a 95°C, (II) 30 segundos a 99°C, (III) 1 minuto a 72°C, (IV) 15 segundos a 97° (V) 1 minuto a 72°C. A curva *Melting* foi utilizada de acordo com instruções do instrumento. Os passos (II) e (III) foram repetidos 3 vezes, e os passos (IV) e (V) repetidos 40 vezes. A análise dos dados foi feita utilizando o EpiTect Methyl II PCR Array Microsoft Excel, disponível em www.sabiosciences.com/dna_methylation_data_analysis.php, com os resultados indicando a quantidade de DNA totalmente metilada, parcialmente metilada e não metilada (DNA expresso).

VI. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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, e do qual temos uma versão local. Análises de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram realizadas, considerando indivíduos não relacionados e não afetados. 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 do estudo genético de caso-controle foi realizada através do programa STATATM 9.1 disponível em (<http://www.stata.com/>) com o pacote GenAssoc disponível em (<http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/software/stata/>). As frequências alélicas e genotípicas dos marcadores foram comparadas entre pacientes com as diferentes formas de hanseníase e controles. 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. Os testes foram considerados significantes quando a probabilidade do erro tipo I foi menor que 5%.

VII. RESULTADOS

Na Tabela 3 são mostradas as características clínico-epidemiológicas na amostra estudada. Verificou-se que a média de idade entre os grupos de pacientes foi de $\pm 42,32$ e $\pm 34,80$ para os controles, sendo a maioria de indivíduos do sexo masculino em ambos os grupos.

Entre os 362 casos, foram incluídos 168 com as formas polares da hanseníase, sendo 44 com a forma tuberculóide e 124 com a forma lepromatosa, o que corresponde a um total de 46,40% de toda a amostra de casos estudada. As formas intermediárias da doença, contribuíram com 34,80% dos casos, sendo 48 indivíduos com a forma *borderline* tuberculóide, 38 com a forma *borderline borderline* e 40 com a forma *borderline* lepromatosa. O restante da amostra foi composto por indivíduos com a forma indeterminada de doença, representados por 63 casos e indivíduos com neurite contribuindo com 5 casos, totalizando 18,80%.

Em relação indivíduos com reações hansênicas da hanseníase, foram incluídos 164 casos totais equivalendo a 45,30% de toda a amostra de casos, sendo 80 indivíduos com a reação reversa e 84 com o eritema nodoso hansênico.

Tabela 3. Características clínico-epidemiológicas da amostra populacional da Bahia, Brasil

A- Características da amostra			
	N indivíduos	Média - idade (anos) \pm DP*	H:M**(%)
Casos	362	42,32 \pm 12,88	199:163 (55:45)
Controles	368	34,80 \pm 10,24	258: 110 (70:30)
B- Características clínicas da coorte de casos			
Fenótipo clinic		<i>n</i>	(%)
Tuberculóide (TT)		44	(12,1)
Borderline tuberculóide (BT)		48	(13,3)
Borderline (BB)		38	(10,5)
Borderline lepromatoso (BL)		40	(11,1)
Lepromatoso (LL)		124	(34,2)
Hanseníase indeterminada (I)		63	(17,4)
Outras formas (Neurite ou não classificada)		5	(1,4)
#Total		362	(100)
C - Pacientes com reação hansênica			
RR		80	(48,8)
ENL		84	(51,21)
Total#		164	(100)

VII.1. RESULTADOS DO OBJETIVO 1

VII.1.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO EM GENES DO MHC DE CLASSE III: *TNFA*, *LTA* E *BATI* E A HANSENÍASE

rs1800629 A/G no gene de *TNFA*:

A análise do polimorfismo no SNP rs1800629 (-308 A/G) no gene *TNFA*, mostrou frequências alélicas de 0,90 e 0,10 para os alelos G e A respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$). 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 4.

Análises alélicas e genótípicas de associação por regressão logística para este polimorfismo de *TNFA* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 5. Não foram observadas associações significantes na análise genotípica entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Na análise alélica, não foram observadas associações entre os alelos G ou A e a Hanseníase ($p > 0,05$).

TABELA 4. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas observadas para o polimorfismo rs1800629 no gene *TNFA*.

<i>TNFA</i> rs1800629 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
G	581(49%)	597(51%)	1178(90%)
A	71(52%)	65(48%)	136(10%)
(N) Frequências Genótípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	258(49%)	270(51%)	528(80%)
GA	65(53%)	57(47%)	122(19%)
AA	3(43%)	4(57%)	7(1%)

TABELA 5. Comparação entre o polimorfismo no gene de *TNFA* rs1800629 A/G e a hanseníase: casos vs. controles.

<i>TNFA</i> rs_1800629 A/G	Odds	IC	P
Global 2df			0,636
<i>A/G X G/G</i>	1,193	0,80-1,77	0,380
<i>A/A X G/G</i>	0,784	0,17-3,54	0,753
Global 1df			0,523
<i>Alelo 1 - A</i>	1,122	0,78-1,60	0,524
<i>Alelo 2 - G</i>	0,890	0,62-1,27	0,524
likelihood-ratio test			p>0,05

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

rs1799964 C/T no gene de *TNFA*:

A análise do polimorfismo C/T no SNP rs1799964 no gene *TNFA*, mostrou frequências alélicas de 0,78 e 0,22 para os alelos T e C respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genóticas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador (p>0,05). 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 6.

Análises alélicas e genóticas de associação por regressão logística para este polimorfismo de *TNFA* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 7. Não foram observadas associações significantes na análise genotípica entre os grupos estudados (p >0,05). Na análise alélica, não foram observadas associações entre os alelos C ou T e a hanseníase (p >0,05).

TABELA 6. Distribuição das frequências alélicas e genóticas observadas para o polimorfismo rs1799964 no gene *TNFA*.

<i>TNFA</i> rs1799964 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
T	527 (53%)	476(47%)	1003(78%)
C	143(51%)	138(49%)	281(22%)
(N) Frequências Genóticas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
TT	210(63%)	183 (60%)	393(61%)
TC	107(32%)	110(36%)	217(34%)
CC	18(5%)	14(4%)	32(5%)

TABELA 7. Comparação entre o polimorfismo no gene de *TNFA* rs1799964 C/T e a hanseníase: casos vs. controles.

<i>TNFA</i> rs_1799964 C/T	Odds	IC	P
Global 2df			0,555
<i>C/T X T/T</i>	0,847	0,60-1,18	0,329
<i>C/C X T/T</i>	1,120	0,54-2,31	0,759
Global 1df			0,626
<i>Alelo 1 - C</i>	0,936	0,71-1,21	0,626
<i>Alelo 2 - T</i>	1,067	0,82-1,38	0,626
likelihood-ratio test			p>0,05

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

rs1800683 A/G no gene de *LTA*:

A análise do polimorfismo no SNP rs1800683 (-162 G/A) no gene *LTA*, mostrou frequências alélicas de 0,60 e 0,40 para os alelos G e A respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genóticas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador (p>0,05). As

frequências observadas dos alelos G e A, bem como dos genótipos GG, GCA e AA nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 8.

Análises alélicas e genotípicas de associação por regressão logística para este polimorfismo de *LTA* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 9. Não foram observadas associações significantes na análise genotípica entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Na análise alélica, não foram observadas associações entre os alelos G ou A e a Hanseníase ($p > 0,05$).

TABELA 8. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1800683 no gene *LTA*.

<i>LTA</i> rs1800683 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
G	387(48%)	411(52%)	798(60%)
A	267(51%)	259(49%)	526(40%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	113 (35%)	123(37%)	236(36%)
GA	161(49%)	165(49%)	326(49%)
AA	53(16%)	47(14%)	100(15%)

TABELA 9. Comparação entre o polimorfismo no gene de *LTA* rs1800683 A/G e a Hanseníase: casos vs. controles.

<i>LTA</i> rs_1800683 A/G	Odds	IC	P
Global 2df			0,692
<i>A/G</i> X <i>G/G</i>	1,062	0,75-1,48	0,725
<i>A/A</i> X <i>G/G</i>	1,227	0,76-1,96	0,391
Global 1df			0,191
<i>Alelo 1 – A</i>	1,097	0,87-1,37	0,414
<i>Alelo 2 – G</i>	0,910	0,72-1,14	0,414
likelihood-ratio test			$p > 0,05$

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

rs909253 A/G no gene de *LTA*:

A análise do polimorfismo no rs909253 (+252 G/A) no gene *LTA*, mostrou frequências alélicas de 0,35 e 0,65 para os alelos G e A respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genótípicas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$). 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 10.

Análises alélicas e genótípicas de associação por regressão logística para este polimorfismo de *LTA* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 11. Foi observada uma associação global significativa na análise genotípica entre os grupos estudados ($P_{\text{global}} = 0,007$). Entretanto, o valor de $p = 0,081$ é limítrofe em significância estatística, mostrando uma tendência a associação de genótipo (AG X GG) com a doença. Neste caso, uma limitação do tamanho amostral pode estar contribuindo para um menor poder estatístico do teste. A análise de dominância pelo teste *likelihood-ratio test* ($p = 0,0023$) revelou uma relação de dominância do alelo A sobre o G, justificando a significância *borderline* encontrada na avaliação genotípica (AG X GG; $p = 0,081$) e reforçando a hipótese do tamanho amostral. Na análise alélica, não foram observadas associações entre os alelos A ou G e a Hanseníase ($p > 0,05$).

TABELA 10. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs909253 no gene *LTA*.

<i>LTA</i> rs909253 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
G	227(46%)	262(54%)	489(35%)
A	453(51%)	440(49%)	893(65%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	51 (15%)	46(13%)	97(14%)
GA	125(37%)	170(48,5%)	295(43%)
AA	164(48%)	135(38,5%)	299(43%)

TABELA 11. Comparação entre o polimorfismo no gene de *LTA* rs909253 A/G e a hanseníase: casos vs. controles.

<i>LTA</i> rs_909253 A/G	Odds	IC	P
Global 2df			0,0075
<i>A/G X G/G</i>	0,663	0,41-1,05	0,081
<i>A/A X G/G</i>	1,095	0,69-1,73	0,696
Global 1df			0,137
<i>Alelo 1 - A</i>	1,175	0,94-1,45	0,139
<i>Alelo 2 - G</i>	0,850	0,68-1,05	0,139
likelihood-ratio test			0,002

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

rs2239527 C/G no gene de *BAT1*:

A análise do polimorfismo no SNP rs2239527 (-23 G/C) no gene *BAT1*, mostrou frequências alélicas de 0,38 e 0,62 para os alelos G e C respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas mostrou que a

amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$). As frequências observadas dos alelos G e C, bem como dos genótipos GG, GC e CC nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 12.

Análises alélicas e genótípicas de associação por regressão logística para este polimorfismo de *BATI* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 13. Não foram observadas associações significantes na análise genotípica entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Na análise alélica, não foram observadas associações entre os alelos G ou C e a hanseníase ($p > 0,05$).

TABELA 12. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas observadas para o polimorfismo rs1799964 no gene *BATI*.

<i>BATI</i> rs2239527 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
G	265(50,4%)	261(49,6%)	526(38%)
C	401(47%)	455(53%)	856(62%)
(N) Frequências Genótípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	46(14%)	47(13%)	93(13,5%)
CG	173(52%)	167(47%)	340(49%)
CC	114(34%)	144(40%)	258(37,5%)

TABELA 13. Comparação entre o polimorfismo no gene de *BATI* rs2239527 C/G e a hanseníase: casos vs. controles.

<i>BATI</i> rs_2239527 C/G	Odds	IC	P
Global 2df			0,258
<i>G/C X G/G</i>	1,058	0,66-1,67	0,808
<i>C/C X G/G</i>	2,596	0,46-14,54	0,278
Global 1df			0,191
<i>Alelo 1 - C</i>	0,862	0,69-1,07	0,192
<i>Alelo 2 - G</i>	1,159	0,92-1,44	0,192
likelihood-ratio test			p>0,05

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

Utilizando o programa Haploview 4.2, fizemos as análises do desequilíbrio de ligação (DL) entre os marcadores do locus do MHC de classe III avaliados. A Figura 3 mostra o DL em R^2 . Observa-se uma forte ligação entre os marcadores de *BATI*, *LTA* e *TNFA* rs 1799964, (de acordo com os valores expressos nos losangos) e uma ligação moderada entre este bloco e o SNP rs 1800629 de *TNFA*.

Figura 3. Padrão do desequilíbrio de ligação entre os marcadores do MHC de classe III: *BATI*, *LTA* e *TNFA*, avaliados no estudo.

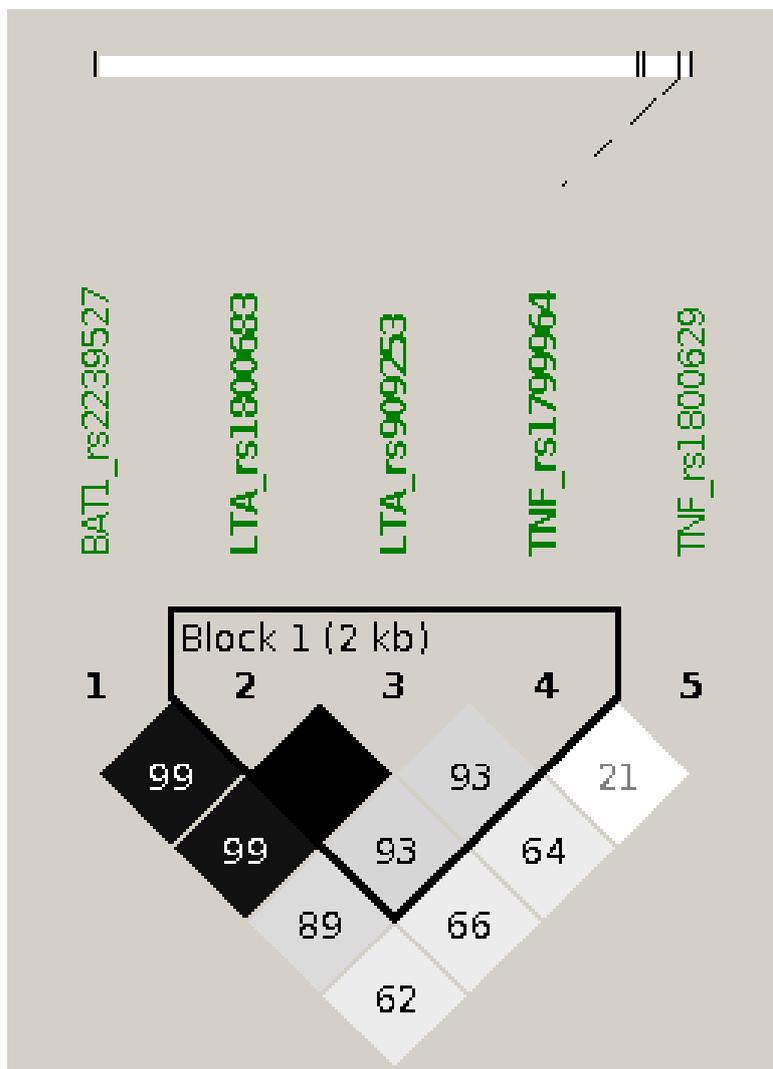


Figura. 3. O padrão de desequilíbrio de ligação em r^2 foi determinado pelo programa Haploview v4.2 (Barrett et al., 2005) para os 5 SNPs (*TNFA* rs1800629 e rs1799964, *LTA* rs1800683 e rs909253 e *BATI*2239527) usados nas análises de associação. Valores de r^2 são representados em branco para $r^2 = 0$, com valores intermediários para $0 < r^2 < 1$ indicados por sombreados de cinza. Os números dentro dos losangos representam os scores para o desequilíbrio de ligação pareado.

VII. 1. 2. ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS NO GENE DE IL10 E A HANSENÍASE

rs1800871 A/G:

A análise do polimorfismo no SNP rs1800871 (-819 A/G) no gene *IL10*, mostrou frequências alélicas de 0,70 e 0,30 para os alelos G e A respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$). 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 14.

Análises alélicas e genotípicas de associação por regressão logística para este polimorfismo de *IL10* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 15. Não foram observadas associações significantes na análise genotípica entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Na análise alélica, não foram observadas associações entre os alelos G ou A e a hanseníase ($p > 0,05$).

TABELA 14. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1800871 no gene *IL10*.

<i>IL10</i> rs1800871 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
G	338(32%)	391(38%)	1067(70%)
A	226(48%)	241(52%)	467(30%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	122(40%)	119(38%)	241(39%)
AG	144(47%)	153(48%)	297(47%)
AA	41(13%)	44(14%)	85(14%)

TABELA 15. Comparação entre o polimorfismo no gene de IL10 rs1800871 A/G e a Hanseníase: casos vs. controles.

IL10 rs_1800871 A/G	Odds	IC	P
Global 2df			0,866
A/G X G/G	0,918	0,65-1,28	0,622
A/A X G/G	0,908	0,55-1,49	0,705
Global 1df			0,626
Alelo 1 - A	0,944	0,74-1,19	0,626
Alelo 2 - G	1,059	0,84-1,33	0,626
likelihood-ratio test			p>0,05

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

rs1800896 T/C:

A análise do polimorfismo no SNP rs1800896 (-1082 T/C) no gene *IL10*, mostrou frequências alélicas de 0,37 e 0,63 para os alelos C e T respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$). 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 16.

Análises alélicas e genotípicas de associação por regressão logística para este polimorfismo de *IL10* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 17. Não foram observadas associações significantes na análise genotípica entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Na análise alélica, não foram observadas associações entre os alelos C ou T e a Hanseníase ($p > 0,05$).

TABELA 16. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs1800896 no gene *IL10*.

<i>IL10</i> rs1800896 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
C	251(51%)	240(49%)	491(37%)
T	421(50%)	420(50%)	841(63%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
CC	47(14%)	50(15%)	97(14,5%)
CT	157(47%)	140(42,5%)	297(44,5%)
TT	132(39%)	140(42,5%)	272(41%)

TABELA 17. Comparação entre o polimorfismo no gene de *IL10* rs1800896 C/T e a hanseníase: casos vs. controles.

IL10 rs_1800896 T/C	Odds	IC	P
Global 2df			0,535
<i>C/T X C/C</i>	1,193	0,75-1,88	0,451
<i>T/T X C/C</i>	1,003	0,63-1,59	0,990
Global 1df			0,714
<i>Alelo 1 - T</i>	0,960	0,77-1,19	0,714
<i>Alelo 2 - C</i>	1,041	0,83-1,29	0,714
likelihood-ratio test			p>0,05

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

rs3024496 A/G:

A análise do polimorfismo no SNP rs3024496 no gene *IL10*, mostrou frequências alélicas de 0,59 e 0,41 para os alelos A e G respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas mostrou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador ($p > 0,05$). As frequências observadas dos alelos A e G, bem como dos genótipos GG, GA e AA nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 18.

Análises alélicas e genotípicas de associação por regressão logística para este polimorfismo de *IL10* foram realizadas entre casos e controles, conforme mostrado na Tabela 19. Não foram observadas associações significantes na análise genotípica entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Na análise alélica, não foram observadas associações entre os alelos A ou G e a Hanseníase ($p > 0,05$).

TABELA 18. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs3024496 no gene *IL10*.

<i>IL10</i> rs3024496 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
G	277(52%)	252(48%)	529(41%)
A	395(51%)	378(49%)	773(59%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	57(17%)	47(15%)	104(16%)
GA	163(48,5%)	158(50%)	321(49%)
AA	116(34,5%)	110(35%)	226(35%)

TABELA 19. Comparação entre o polimorfismo no gene de *IL10* rs3024496 A/G e a hanseníase: casos vs. controles.

IL10 rs_3024496 A/G	Odds	IC	P
Global 2df			0,770
<i>A/G X G/G</i>	0,850	0,54-1,32	0,475
<i>A/A X G/G</i>	0,869	0,54-1,38	0,557
Global 1df			0,650
<i>Alelo 1 - A</i>	0,949	0,75-1,18	0,651
<i>Alelo 2 - G</i>	1,053	0,84-1,31	0,651
likelihood-ratio test			p>0,05

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

VII. 1. 3. ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NO GENE DE *FLII* E A HANSENÍASE

rs7930515 C/G:

O marcador rs7930515 está localizado no íntron 1 do gene de *FLII* e está em desequilíbrio de ligação com a região promotora proximal do gene a qual contém uma sequência de microssatélites GAn funcional, além de fazer parte de um haplótipo ligado a um elemento “enhancer” ETS/ETS/GATA (CASTELLUCCI *et al.*, 2011) A análise deste polimorfismo C/G, mostrou frequências alélicas de 0,72 e 0,28 para os alelos C e G respectivamente, na população avaliada. A comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas revelou que a amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador (p>0,05). As frequências observadas dos alelos C e G, bem como dos genótipos CC, GC e CC nos grupos de casos e controles são mostrados Tabela 20.

Análise geral do marcador no gene de *FLII* rs7930515 por regressão logística entre todos os casos e controles, mostrou uma associação apenas limítrofe entre o alelo C e risco aumentado para o desenvolvimento da hanseníase (P global = 0,0602), conforme mostrado na Tabela 21. Na análise genotípica, não foram observadas associações entre os alelos C ou G e a hanseníase ($p > 0,05$).

Como as reações hansênicas representam formas agudas de doença na hanseníase, caracterizadas por uma exagerada resposta inflamatória, que contribui para o dano tecidual observado, realizamos análises com as amostras estratificadas, comparando todos os pacientes com as reações do tipo I – RR ($n=68$) e tipo II – ENH ($n=73$) em relação a controles, conforme apresentado na Tabela 22. Observamos uma associação entre a presença do alelo C e o risco aumentado para o desenvolvimento de reação (OR= 1,53; IC: 1,09- 2,15; $P= 0,012$). Entretanto, ao separar os grupos de RR e ENH, observamos que a associação se sustentou apenas para o desenvolvimento de ENH em carreadores do alelo C (OR= 1,89; IC = 1,25-2,85; $P=0,002$), não tendo sido observada associação para RR, cujos resultados não foram estatisticamente significantes ($P>0,05$). A análise da comparação com indivíduos ENH em termos de genótipos, conforme apresentado na Tabela 23. Foi observada significância estatística $p=0,0022$ no teste global (2df), evidenciada pela comparação dos genótipos CG x GG (OR=2,68; IC: 1,50-4,81; $p=0,001$) e limítrofe para CC vs GG (OR=2,47; IC: 0,94-6,46; $p=0,065$). Adicionalmente, a análise de associação entre pacientes sem evidência de surto reacional e o marcador não foram significantes ($P>0,05$, dados não mostrados).

TABELA 20. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas observadas para o polimorfismo rs7930515 no gene *FLII*.

<i>FLII</i> rs7930515 (N) Frequências Alélicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
C	448(70%)	301(75%)	749(72%)
G	194(30%)	99(25%)	293(28%)
(N) Frequências Genotípicas			
	CASOS	CONTROLES	TOTAL
GG	158 (49%)	116(58%)	274(53%)
CG	132(41%)	69(35%)	201(38%)
CC	31(10%)	15(7%)	46(9%)

TABELA 21. Comparação entre o polimorfismo no gene de *FLII* rs7930515 C/G e a hanseníase: casos vs. controles.

FLII rs_7930515 C/G	Odds	IC	P
Global 2df			0,144
<i>C/G X G/G</i>	1,404	0,96-2,04	0,077
<i>C/C X G/G</i>	1,517	0,78-2,93	0,217
Global 1df			0,060
<i>Alelo 1 - C</i>	1,302	0,98-1,71	0,063
<i>Alelo 2 - G</i>	0,767	0,58-1,01	0,063
likelihood-ratio test			0,560

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

TABELA 22. Comparação entre o polimorfismo no gene de *FLII* rs7930515 C/G e a hanseníase: Pacientes com reações do tipo I (RR) e II (ENH) vs. controles.

FLII rs_7930515 C/G	Odds	IC	P
Global 2df			0,018
<i>C/G X G/G</i>	1,877	1,18-2,96	0,007
<i>C/C X G/G</i>	1,804	0,81-3,98	0,144
Global 1df			0,011
<i>Alelo 1 - C</i>	1,537	1,09-2,15	0,012
<i>Alelo 2 - G</i>	0,650	0,46-0,91	0,012
likelihood-ratio test			0,206

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

TABELA 23. Comparação entre o polimorfismo no gene de *FLII* rs7930515 C/G e a hanseníase: ENH vs. controles.

FLII rs_7930515 C/G	Odds	IC	P
Global 2df			0,002
<i>C/G X G/G</i>	2,689	1,50-4,81	0,001
<i>C/C X G/G</i>	2,474	0,94-6,46	0,065
Global 1df			0,002
<i>Alelo 1 - C</i>	1,891	1,25-2,85	0,002
<i>Alelo 2 - G</i>	0,528	0,35-0,79	0,002
likelihood-ratio test			0,086

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

VII.2. RESULTADOS DO OBJETIVO 2:

VII. 2.1. EXPRESSÃO DO GENE DE *TNFA* em relação a genótipos do polimorfismo rs1800629 (-308 A/G):

Foram realizadas comparações entre pacientes expressando *TNFA* em relação a controles sem a doença avaliados. Observou-se uma diferença significativa ($p=0,03$), com os casos apresentando uma maior expressão do gene em relação aos controles, conforme mostrado na Figura 4. Na comparação entre os três grupos definidos de acordo com os diferentes fenótipos clínicos: Hansen *per se*, reação hansênica tipo I (RR), reação hansênica tipo 2 (ENH), não foram encontradas diferenças significantes na expressão do gene de *TNFA*. Essas comparações aparecem na Figura 5(A), com os pacientes do grupo Hansen *per se* (não reacionais) representados como PB + MB e os pacientes com reação do tipo I e II representados como RR + ENL.; Na Figura 5 (B) que compara apenas pacientes paucibacilares e multibacilares sem reação; E na Figura 5(C), que compara apenas os pacientes reacionais, RR e ENH.

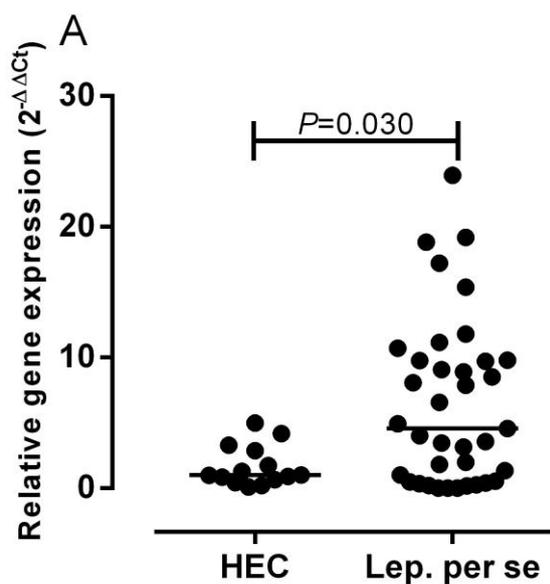
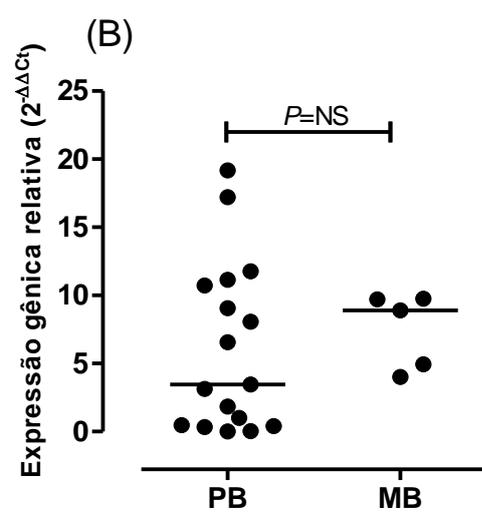
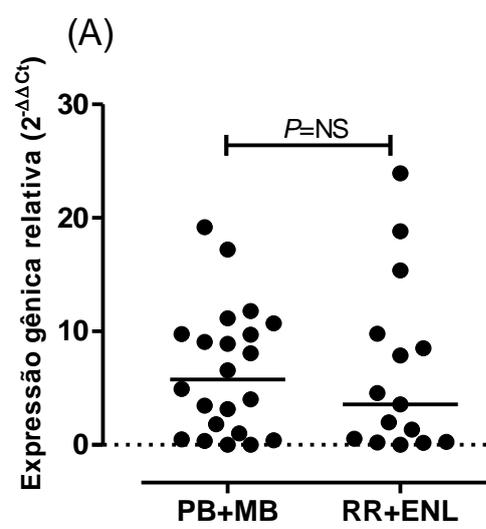


Figura 4: Expressão gênica relativa dos pacientes para o gene de *TNFA* na comparação entre casos (*Lep. per se*) e controles (*HEC*). PCR em tempo real realizado de cDNA obtido de RNA extraído *ex vivo* de leucócitos totais de controles sem a doença e pacientes (com e sem reação). Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo controle sem a doença após normalização da expressão gênica da β -actina. 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 é maior no grupo de indivíduos com hanseníase quando comparados com os controles sem a doença ($p < 0,05$).



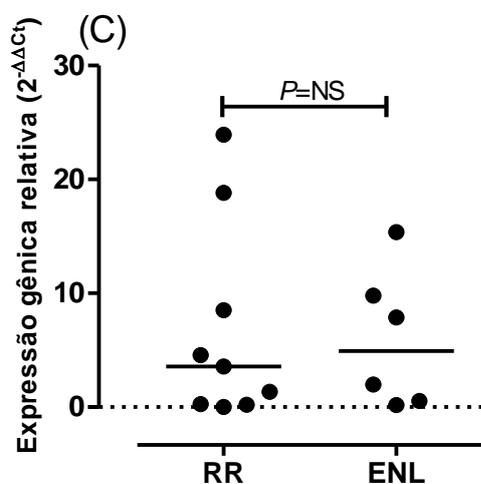


Figura 5: Expressão gênica relativa dos pacientes para o gene de *TNFA* na comparação entre diferentes fenótipos clínicos da hanseníase: PCR em tempo real realizado de cDNA obtido de RNA extraído *ex vivo* de leucócitos totais de pacientes. (A) Comparação entre os pacientes do grupo Hansen *per se* (não reacionais) representados como PB + MB *versus* pacientes reacionais, representados como RR + ENL; (B), pacientes pauci e multibacilares sem reação; (C) comparação entre os pacientes reacionais, RR e ENL. Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney. Não se observa diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

Adicionalmente, fizemos a avaliação da expressão gênica relativa do gene de *TNFA* estratificando os indivíduos pelo polimorfismo na posição -308 A/G (rs1800629). Observamos expressão diferencial do gene na comparação entre os genótipos de portadores do alelo A (GA+AA) e homocigotos para o alelo G (GG). Neste caso, observou-se uma maior expressão do gene *TNFA* em indivíduos com hanseníase portadores do genótipo GG ($p=0,003$) em comparação com indivíduos GA e AA, conforme mostrado na Figura 6.

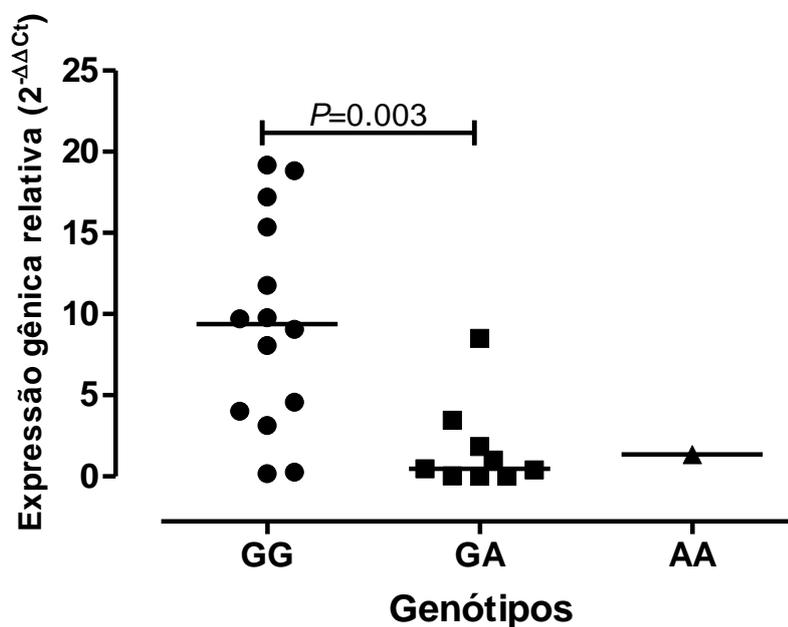


Figura 6: Expressão gênica relativa dos pacientes para o gene de *TNFA* na comparação entre diferentes genótipos do polimorfismo: GG vs GA+AA. PCR em tempo real realizado de cDNA obtido de RNA extraído *ex vivo* de leucócitos totais de pacientes (com e sem reação). Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo controle sem a doença após normalização da expressão gênica da β -actina. Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo. Mann Whitney ($p=0,03$). A expressão gênica é maior no grupo de indivíduos GG quando comparados com aqueles com o genótipo AA ($p<0,05$).

VII. 2.2. EXPRESSÃO DO GENE DE *IL10*:

A avaliação da expressão gênica relativa do gene de *IL10*, revelou expressões diferenciais do gene na comparação entre os grupos definidos de acordo com os diferentes fenótipos clínicos: Hansen *per se* (HAN), reação hansênica tipo I (RR), reação hansênica tipo 2 (ENL) e controles sem a doença (HEALTHY). Indivíduos com a

reação do tipo I (RR), expressam mais o gene de *IL10* em relação a controles sadios, conforme mostrado na Figura 7 ($p=0,01$).

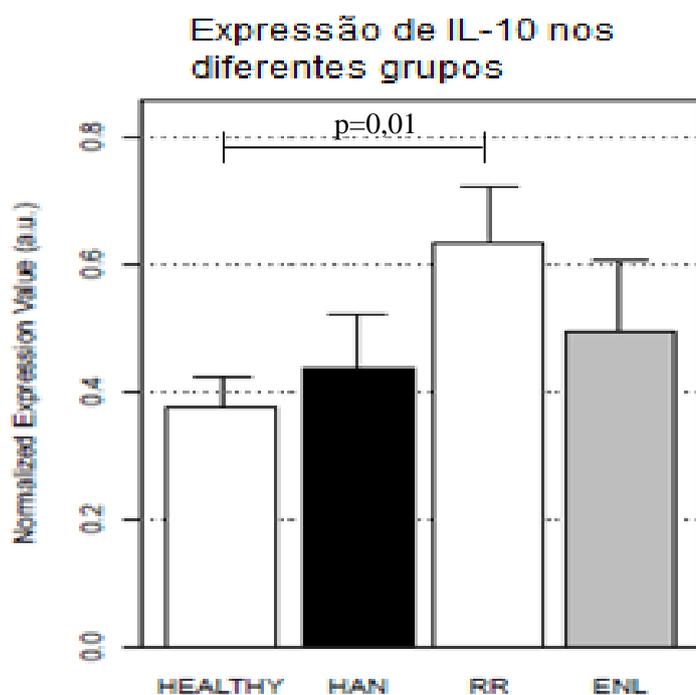


Figura 7: Expressão gênica relativa dos pacientes e controles para o gene de *IL10* na comparação entre diferentes fenótipos clínicos da hanseníase: hansen *per se* (HAN), RR, ENL e controles sem a doença (HEALTHY). PCR em tempo real realizado com cDNA obtido de RNA extraído *ex vivo* de leucócitos totais de pacientes (com e sem reação). Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao grupo controle sem a doença após normalização da expressão gênica da β -actina. Cada barra representa a mediana do grupo. A expressão gênica é maior no grupo de indivíduos RR quando comparados com HEALTHY ($p<0,05$), Mann Whitney.

VII.3.RESULTADOS DO OBJETIVO 3:

VII. 3.1. EXPRESSÃO DO GENE DE *FLII* na posição rs7930515 C/G:

Foram realizadas comparações na expressão gênica de *FLII* em macrófagos isolados de indivíduos com hanseníase estimulados com antígeno sonicado de *M. leprae* em diferentes tempos – 0h, 3h, 24h, 48h e 72h. Não foram encontradas diferenças significantes na expressão do gene de *FLII*, entretanto, na comparação entres as medianas dos grupos, pode-se observar uma tendência de maior expressão do gene no tempo de 24h na amostra estudada, conforme mostrado na Figura 8.

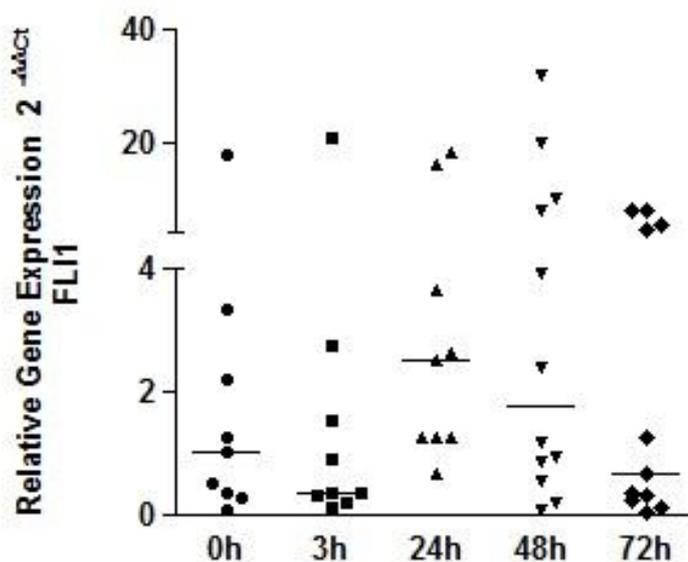


Figura 8: Expressão gênica relativa de *FLI* em macrófagos de pacientes estimulados com antígeno sonicado de *M. leprae* em diferentes tempos. PCR em tempo real realizado com macrófagos de pacientes virgens de tratamento e sem evidência de reação hansênica Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa em relação ao tempo 0h após normalização da expressão gênica da β -actina. Cada ponto representa um paciente diferente e cada barra representa a mediana do grupo. A expressão gênica é maior no tempo de 24 horas. ($p > 0,05$), Mann Whitney.

VII. 3.2. METILAÇÃO DO GENE DE *FLII* na posição rs7930515 C/G:

Foram realizadas avaliações do padrão de metilação no gene de *FLII* a partir de DNA extraído de macrófagos provenientes de indivíduos com hanseníase, estimulados com antígeno sonicado de *M. leprae* em diferentes tempos – 0h, 3h, 24h, 48h e 72h.

O percentual de metilação do gene aparece com um padrão aumentado no tempo de 24 horas, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa ($p=0,176$), conforme mostrado na Figura 9.

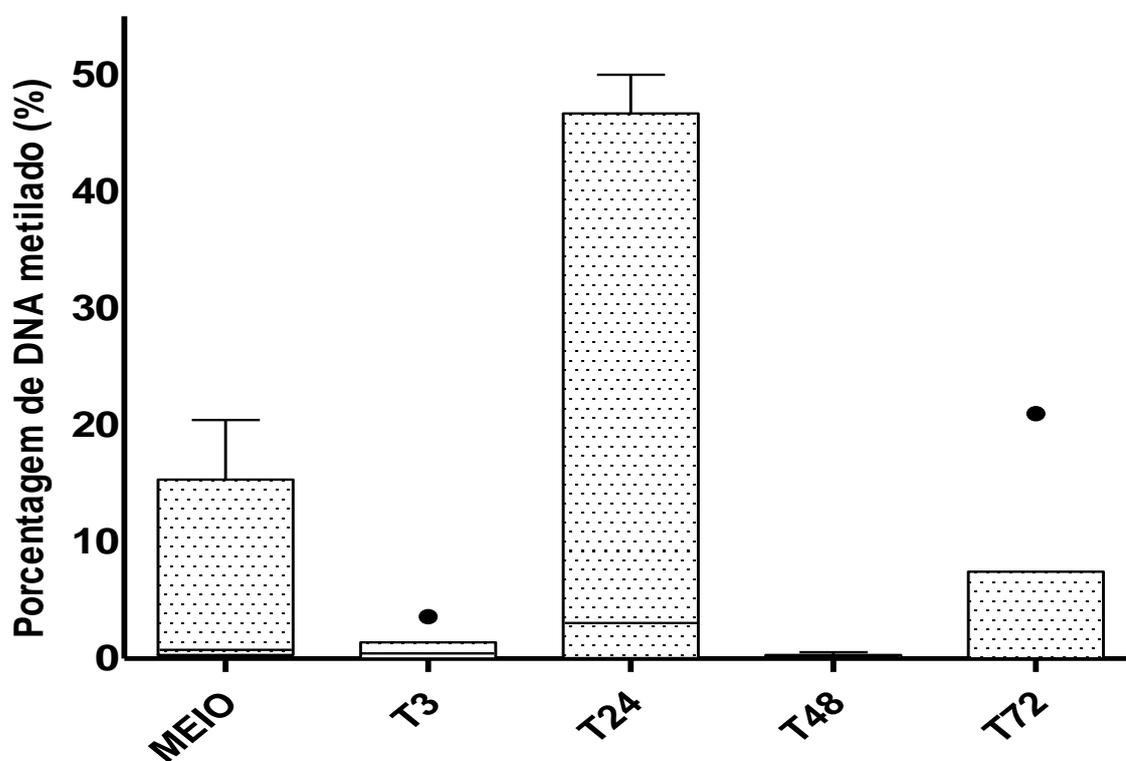


Figura 9: Metilação do gene de *FLI* em macrófagos de pacientes estimulados com antígeno de *M. leprae* em diferentes tempos. PCR em tempo real realizado de DNA extraído *ex vivo* de macrófagos de pacientes virgens de tratamento e sem evidência de reação hanseníase. A metilação do gene é maior no tempo de 24 horas, entretanto esta diferença não é estatisticamente significativa. ($p<0,05$), Mann Whitney.

VIII. DISCUSSÃO

A espécie *Homo sapiens* é composta por diversas populações humanas, apresentando uma uniformidade genética relativa que consiste em premissa para inclusão nesta espécie. Entretanto, a descoberta de polimorfismos genéticos, os quais consistem em pequenas variações na estrutura dos genes, que ocorrem em mais de 1% das populações, proporcionam aos indivíduos diferentes formas alélicas para um mesmo gene, conferindo à população uma grande diversidade genética.

Os polimorfismos podem consistir de variações na seqüência de DNA envolvendo um único nucleotídeo ou uma seqüência de nucleotídeos como, por exemplo, de DNA repetitivo, representado pelos números variáveis de repetições consecutivas (FORD, 1945). Os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) são a variação genética mais comum e ocorrem numa freqüência de aproximadamente 1 a cada 1000 pares de bases (bp) através de todo o genoma humano (Aguillon, Cruzat *et al.*, 2006). Estes polimorfismos podem localizar-se nas regiões codificadoras dos genes ou em regiões intergênicas, podendo afetar ou não a seqüência da proteína (Silva, 2003).

A análise das bases genéticas da susceptibilidade às doenças infecciosas é potencialmente a área mais complexa entre as doenças genéticas complexas (Hill, 2001). A observação da existência de polimorfismos genéticos em regiões reguladoras dos genes de citocinas sugere que as diferenças individuais na expressão fenotípica destas citocinas *in vitro*, ao menos em parte, poderiam ser devido a estes polimorfismos funcionais. Além das variações da resposta imune determinada por estes polimorfismos genéticos, deve ser também considerada a influência da poligenia e multifatores causais (ambientais e dos agentes infecciosos) que impactam a variabilidade clínica destas doenças. Os achados de estudos epidemiológicos acerca das diferenças dentro e entre populações expostas ao

mesmo agente infeccioso, e na prevalência ou severidade da doença, reforçam a relevância do componente genético.

Neste estudo, a análise do marcador no gene de *TNFA* na posição -308 G/A (rs1800629) não mostrou risco aumentado para o desenvolvimento da doença ou de manifestações agudas da doença na população estudada. A literatura é conflitante no que se refere a associação genética com o gene de *TNFA* na posição -308 G/A (rs1800629) e a hanseníase. Foram previamente reportadas associações do genótipo GG com hanseníase, mais especificamente com as formas polar tuberculóide e intermediária *borderline borderline*, em uma população brasileira (FRANCESCHI *et al*, 2009), e este mesmo genótipo foi associado com a doença independente de forma clínica, em estudo com uma população indiana (TARIQUE *et al*, 2012). Cardoso e colaboradores, 2011, conduziram estudo de associação em população brasileira e mostraram efeito protetor do alelo A do polimorfismo na posição -308 AG de *TNFA* na hanseníase e este achado foi reforçado pela metanálise realizada subsequentemente. Esses resultados são opostos à nossa falta de associação por razões que podem ser diversas: 1- As formas clínicas, incluindo a presença e o número de pacientes com reação do tipo I ou II é variada entre as coortes estudadas; 2- Nessa população outros SNP do gene *TNFA* ou mesmo outras combinações haplotípicas dentro dos *loci* MHC seriam mais relevantes do ponto de vista genético na susceptibilidade à hanseníase; 3- Contribuições étnicas diferenciais poderiam influenciar nos resultados. Reforçando essa hipótese, estudo caso-controle de Velarde e colaboradores, 2012, sobre o mesmo polimorfismo no gene de *TNFA* em uma população mestiça mexicana, não encontrou associações significantes com a doença, formas clínicas ou reações hanseníase avaliadas. Neste contexto, é importante destacar que a despeito da importância de se detectar marcadores genéticos para doenças de herança complexa não se pode perder o foco de que a maioria destes polimorfismos contribuem apenas com um efeito de pequeno

a moderado, sendo necessário levar em conta a interação com outros fatores genéticos e, adicionalmente, a contribuição de fatores epigenéticos, que moldam o efeito que esses marcadores podem ter de acordo com diferentes estímulos ou ambientes.

Adicionalmente, analisamos a forma como o gene de *TNFA* é expresso nos diferentes grupos de acordo com os genótipos GG, GA e AA para o polimorfismo na posição -308 GA (rs1800629) e a hanseníase, polimorfismo que foi previamente associado com diferenças funcionais nas concentrações desta citocina (McGARRY *et al.*, 1999; WILSON *et al.*, 1997; FERNANDEZ-MESTRE, GENDZEKHADZE *et al.*, 2004). Verificamos que a expressão do gene de *TNFA ex vivo* foi significativamente maior em pacientes quando comparados a controles sem a doença avaliados e, estratificando a amostra em grupos de acordo com os diferentes genótipos para o polimorfismo na posição -308 G/A, a expressão do gene foi significativamente menor no grupo de indivíduos carreadores do alelo A (GA + AA) quando comparados com o grupo de homozigotos para o alelo G. Baseando-se na literatura, seria esperado que os pacientes com o genótipo AA expressassem mais o gene de *TNFA* uma vez que estão sob forte resposta inflamatória respondendo ao desafio do *M. leprae*, conformação fundamental para o controle e eliminação do patógeno. De fato, na comparação entre casos e controles sem a doença avaliados, observamos que os pacientes expressam significativamente mais o gene de *TNFA*, traduzindo assim uma resposta ao desafio antigênico a que estão submetidos e que não é observada em indivíduos sem a doença não primados. Entretanto, nosso estudo mostrou na análise estratificada por genótipos, que os indivíduos com o genótipo AA expressam menos o gene de *TNFA*. Desta forma, uma possibilidade é a de que indivíduos com o genótipo AA, ao expressarem menos o gene de *TNFA*, apresentam quantidades insuficientes desta citocina chave na resposta inflamatória requerida frente a patógenos, o que poderia facilitar a disseminação do *Mycobacterium leprae*, deixando os indivíduos

expostos mais vulneráveis à hanseníase e as reações hansênicas da doença, explicando a associação de risco com o alelo A, documentada na literatura. Associações entre doenças infecciosas e autoimunes e o polimorfismo na região promotora do gene de TNFA -308bp G/A (rs1800629) (revisado (BAYLEY *et al.*, 2004; QIDWAI & KHAN, 2011)), tem levado muitos pesquisadores a se questionarem se o SNP é funcional na determinação de níveis diferenciais de TNF. Alguns pesquisadores documentaram altos níveis de TNF induzido por estímulo de lipopolissacarídeo ou antígeno de *M. Leprae* em sangue total ou leucócitos periféricos de indivíduos carreadores do alelo raro A, quando comparados com aqueles homozigotos para G (CARDOSO *et al.*, 2011; LOUIS *et al.*, 1998). O racional é que altos níveis de TNF pró-inflamatório associado a carreadores do alelo A pode ser maléfico no contexto de doenças autoimunes e aumentar respostas pró-inflamatórias em infecções como malária, hanseníase e leishmaniose cutânea (BAYLEY *et al.*, 2004). O balanceamento de TNF é requerido na ativação de macrófagos para matar micobactérias, como evidenciado pela reativação de infecções micobacteriais, incluindo hanseníase (LLUCH *et al.*, 2012), após o tratamento de pacientes com doenças autoimunes com anticorpos anti-TNF. Assim, a hipótese alternativa de proteção contra a hanseníase associada ao alelo A, deve ser devido ao requerimento de TNF para controlar a infecção na hanseníase. Uma série de estudos de gene repórter realizados durante os anos 90 para determinar diretamente se o polimorfismo na região promotora de TNFA -308bp G/A (rs1800629) estava envolvido na regulação do gene, foram equivocados (BRAUN *et al.*, 1996; BRINKMAN *et al.*, 1995; KROEGER *et al.*, 1997; STUBER *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1997; WU & MCCLAIN, 1997), levando Bayley e colaboradores (BAYLEY *et al.*, 2004) a concluir que o polimorfismo -308bp G/A não era funcional. Um estudo mais recente usando um novo sistema reporter se propôs a promover provas mais robustas de que o polimorfismo -308bp G/A é funcional, confirmando que o alelo -308A expressa

níveis mais elevados quando comparado com o alelo -308G (KARIMI *et al.*, 2009). Isto promoveu um sistema demonstrando a melhora na eficácia dos novos análogos da talidomida especificamente na regulação da expressão de *TNFA* (STEWART *et al.*, 2010).

Em uma população geográfica distinta no estado da Bahia, Brasil, no presente estudo, encontramos que a expressão de mRNA de *TNFA* é significativamente maior em pacientes com hanseníase comparados com controles endêmicos, mas não difere de forma significante entre os subgrupos clínicos. Pacientes com hanseníase, carreadores do alelo A são associados com baixa expressão de mRNA de *TNFA*. Entretanto, não encontramos nenhuma evidência de qualquer alelo deste SNP como fator de risco para a hanseníase *per se* ou para qualquer um dos subgrupos clínicos de hanseníase, quando comparados com controles endêmicos.

Conjuntamente, a ocorrência de desequilíbrio de ligação do gene de *TNFA* com outros genes vizinhos não avaliados, como genes HLA de classes I e II, podem impactar nesta expressão encontrada; bem como outras vias antagonistas com efeito modulador negativo de *TNFA* podem influenciar na diferença de expressão do gene, entre carreadores do alelo A. Adicionalmente, nossa avaliação foi realizada a partir da extração de linfócitos totais *ex vivo*, sendo um modelo totalmente distinto de outros estudos funcionais que utilizam células estimuladas com antígeno de *M.leprae* ou ensaios com gene repórter, os quais utilizam transcritos variados.

Embora os resultados da avaliação genética realizada no gene de *TNFA* não tenham revelado associação de susceptibilidade com a hanseníase na nossa população, não replicando achados positivos anteriores da literatura para a posição rs1800629, a análise da expressão do gene mostra expressão diferencial significante entre indivíduos com diferentes genótipos, sugerindo que o papel deste polimorfismo pode ser indireto, sendo

influenciado na sua condição genômica por outros polimorfismos ou por efeitos epigenéticos.

Na análise realizada no polimorfismo na posição +252 no gene de *LTA* (rs909253) observou-se uma associação global significativa, na análise genotípica entre os grupos estudados. Entretanto, foi limítrofe em significância estatística, mostrando uma tendência a associação de genótipo (AG vs. GG) com a doença. Neste caso, uma limitação do tamanho amostral pode estar contribuindo para um menor poder estatístico do teste. Deste modo, considerando o papel da *LTA* na resposta inflamatória e sua proximidade com genes determinantes deste tipo de resposta, a extensão das análises por meio da avaliação de haplótipos sempre deve ser realizada, aumentando-se a amostra, a cobertura e, conseqüentemente, o poder do estudo.

Análise dos marcadores no gene de *IL10* (rs1800871, rs1800896 e rs3024496) foi realizada tomando como base a descrição da associação destes genes com hanseníase na literatura. Entretanto, estes marcadores parecem não ter um papel na doença nesta população. Isso não invalida o fato de que outros SNPs neste gene estejam associados à hanseníase na população. Assim, sabendo-se da importância de IL-10 como citocina moduladora da resposta imune, a investigação de outros polimorfismos, pode contribuir na identificação de marcadores e sua influência na patogênese.

Neste estudo, que apresenta o primeiro resultado da análise do marcador no gene de *FLII*(rs7930515 G\C) na hanseníase, foi encontrado um risco aumentado para o desenvolvimento de reações hansênicas entre carreadores do alelo C, que subsequentemente observamos ser devido à presença da reação do tipo II (ENH) com associação negativa para a reação do tipo I. A ideia de estudar o polimorfismo no gene de *FLII* ocorreu devido ao seu papel impactante no caminho de cura de lesões, conforme descrito pelo nosso grupo com a leishmaniose cutânea em humanos, entre carreadores do

alelo C (CASTELLUCCI *et al.*, 2011). Uma vez que ambas as doenças – leishmaniose e hanseníase se expressam clinicamente com comprometimento cutâneo, e nenhuma investigação no gene de *FLII* havia sido previamente publicada na hanseníase, buscou-se avaliar sua possível associação.

O racional da avaliação epigenética do *FLII*, consiste no fato de que este é um gene membro da família Ets de fatores de transcrição, identificado em camundongos, e que em humanos, quando regulado negativamente, resulta no aumento da expressão dos genes de colágeno *COL1A1* e *COL1A2* e na redução da expressão do gene da metaloproteinase de matriz *MMP1* em fibroblastos *in vitro*, sugerindo que a supressão de *FLII* está envolvida na ativação da resposta profibrótica (NAKERAKANTI *et al.*, 2006). A literatura mostra que os níveis de expressão de *FLII* estão sujeitos a regulações epigenéticas, que são modificações na expressão gênica desencadeadas por um estímulo devido a processos independentes de alterações na sequência de DNA. Alguns destes mecanismos incluem a metilação do DNA (SUZUKI & BIRD, 2008), modificações no dobramento de histonas (BANNISTER & KOUZARIDES, 2011), e silenciamento do DNA por RNA não codificante (STORZ, 2002).

Eventos epigenéticos representam o maior mecanismo de interação entre genes e ambiente que afetam a expressão gênica através da metilação do DNA e remodelamento da cromatina pela modificação de histonas (WOLFF *et al.*, 1998; SINCLAIR *et al.*, 2007; BERNAL & JIRTLE, 2010), e o estado de infecção em si é um potente engatilhador de mudanças epigenéticas. Existem evidências de que interações gene-específicas causam eventos epigenéticos responsáveis por efeitos de longo prazo em algumas infecções e inflamação crônica (SINCLAIR *et al.*, 2007). Durante o processo metabólico são liberados radicais metila que podem se acoplar na cadeia do DNA no momento da tradução, ocupando o sítio de ligação da enzima DNA polimerase, bloqueando a tradução do gene, o

que leva ao silenciamento ou a ativação dos genes. Este processo é denominado metilação gênica e é o mecanismo epigenético mais bem explorado cientificamente. De fato, níveis elevados de metilação do DNA em regiões promotoras estão associados com a diminuição da expressão gênica, mas esta relação não é obrigatória (JONES *et al.*, 2013).

Neste contexto, Wang e colaboradores, 2006, demonstraram que as ilhas CpG do promotor de *FLII* permanecem não metiladas em fibroblastos normais, resultando em um gene de *FLII* transcricionalmente ativo, enquanto em pacientes com escleroderma a metilação nas mesmas ilhas CpG é significativamente aumentada, resultando em repressão da transcrição de *FLII* e aumento da expressão de colágeno tipo I. Conforme comentado acima, foi demonstrado que polimorfismos em *FLII* estão associados com a leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* em humanos (CASTELLUCCI *et al.*, 2011), replicando resultados prévios documentados no modelo murino infectado por *L. major* (SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2010).

Neste estudo com a hanseníase, na análise de expressão gênica associada à avaliação epigenética no gene de *FLII*, mostramos que ocorre um aumento de sua expressão gênica em macrófagos estimulados por 24 horas, concomitante com um aumento da metilação do gene no mesmo período. Estes resultados reforçam o papel de *FLII* como potencial biomarcador de doença e desenvolvimento de ENH na hanseníase.

Avaliamos nesta tese o papel de polimorfismos em genes importantes na resposta imune ao *M. leprae* e suas formas clínicas. Apesar de não termos obtido associação significativa para os marcadores testados na população, mostramos que ocorre expressão diferencial do gene *TNFA* de pacientes em relação a controles e, interessante, em pacientes com diferentes genótipos no polimorfismo -308G/A, indicando um possível papel funcional deste SNP na regulação da produção da citocina TNF- α . Em adição, ocorreu uma associação genotípica entre o gene de *FLII*, previamente associado ao

processo de dano tecidual em doenças como a leishmaniose (humana e murina) e a esclerose múltipla, inspirando o estudo de vias relacionadas ao processo de cura de lesão na hanseníase, pela avaliação de outros genes que fazem parte de sua via de ativação. Estudos genéticos contribuem para o entendimento da susceptibilidade e patogênese das doenças, identificando mecanismos pelos quais esses marcadores agem em diferentes populações, podendo trazer impacto no desenvolvimento de novos candidatos a vacinas ou novos alvos terapêuticos.

IX. CONCLUSÃO

- Embora existam diferenças no padrão de expressão gênica, os marcadores genéticos de *TNFA* e *IL10* testados, não identificam um biomarcador para a hanseníase ligado a essas citocinas na amostra estudada;
- Houve associação entre o marcador genético rs7930515 (alelo C) do gene *FLII* com a hanseníase, para o desenvolvimento de ENH, entre carreadores do alelo de risco;
- Embora não tenham sido verificadas diferenças na expressão gênica do gene de *FLII* e mais investigações se façam necessárias, foi constatado um aumento na metilação do gene no tempo de 24 horas, reforçando a associação genética encontrada, e sugerindo o gene como potencial biomarcador tanto para o desenvolvimento da doença quanto para o desenvolvimento do ENH na hanseníase.

X. SUMMARY

Leprosy is a neglected disease that remains an important public health problem, maintaining detection rates above the recommended by WHO to control the disease. In order to better understand the molecular mechanisms of pathogenesis and contribute to the future control of the disease, this study aim to evaluate the role of genes of the MHC class III locus: *TNFA*, *LTA* and *BATI* and gene *IL10* and *FLII* in leprosy in a population of Bahia. A case-control study was designed with a sample of 362 leprosy patients and 368 control subjects without the disease. In this cohort were genotyped nine genetic markers (SNPs) and evaluated the gene expression of the major cytokines, TNF- α and IL-10. Epigenetic regulation mechanisms of *FLII* gene in leprosy *per se* were evaluated by gene methylation pattern in patient cells, cultured unstimulated and stimulated with the antigen of sonicated *M. leprae* at different times. There were no significant associations between the disease and polymorphisms of MHC class III evaluated in *TNFA*, *LTA* and *BATI*, and also with the markers evaluated in the *IL10* gene ($p > 0.05$). Gene expression of *TNFA ex vivo* was significantly higher in patients compared to controls without the disease ($p = 0.002$). In the analysis of this gene considering the SNP rs1800629 (-308 A / G), a previously marker associated with leprosy in different populations, we found that individuals homozygous for the G genotype express significantly higher the gene than individuals carriers of the A allele (GA + AA) ($p = 0.002$). These results reinforce that even if not directly associated with leprosy in this population, this marker may have an indirect role in the regulation of TNF- α production in *M. leprae* infection. The expression of *IL10 ex vivo* gene was higher in individuals with type I leprosy reaction phenotype (reverse reaction - RR) than patients without acute manifestations of the disease and significant compared to controls ($p = 0.01$). Analysis *FLII* gene marker (rs7930515 G \ C) revealed an increased risk for the development of leprosy reactions between carriers of the C allele (OR = 1.53; 1.09 - 2.15 $p = 0.001$) compared with allele G. In the following analysis we observed that this combination occurs in the presence of type II reaction (ENL) with 1.89 times higher risk for development of carriers of the C allele (OR = 1.89 , CI : 1.25-2.85 ; $p = 0.001$) and negative association for the reaction type I ($P > 0.05$). Polymorphism evaluated in *FLII* gene, which affects the healing lesions path in leishmaniasis in humans appears reinforced as potential disease marker in leprosy and for the development of Type II leprosy reaction. Leprosy being a complex disease this result can contribute to a better understanding of the pathogenesis, and inspire the research of important new pathways in tissue damage observed in this disease process.

Key-words: 1. Polymorphism; 2. Epigenetic; 3. *FLII*; 4. Leprosy.

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.
- AGGARWAL & PETERS, P. *et al.* NATURAL KILLER-SENSITIVE TARGETS STIMULATE PRODUCTION OF TNF-ALPHA BUT NOT TNF-BETA (LYMPHOTOXIN) BY HIGHLY PURIFIED HUMAN PERIPHERAL-BLOOD LARGE ANTIGRANULOCYTES LYMPHOCYTES.**Journal of Immunology**, v. 137, n. 8, p. 2592-2598, OCT 15 1986 1986. ISSN 0022-1767.
- AGUILLON, J. C., A. CRUZAT, *et al.* Could single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the tumour necrosis factor promoter be considered as part of rheumatoid arthritis evolution? **Immunobiology**, v.211, n.1-2, p.75-84. 2006.
- ALCAIS, A. *et al.* Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. **Nature Genetics**, v. 39, n. 4, p. 517-522, APR 2007 2007. ISSN 1061-4036.
- ALCAIS, A., M. MIRA, *et al.* Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v.17, n.1, Feb, p.44-48. 2005.
- ALLCOCK, R.; WILLIAMS, J.; PRICE, P. The central MHC gene, BAT1, may encode a protein that down-regulates cytokine production. **Genes To Cells**, v. 6, n. 5, p. 487-494, MAY 2001 2001. ISSN 1356-9597.
- BANNISTER, A.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381-395, MAR 2011 2011. ISSN 1001-0602.
- BARRETT, J. *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-265, JAN 15 2005 2005. ISSN 1367-4803.
- BASSO, C.; FERREIRA, J.; DA SILVA, S. An Unsupervised Approach for the Emergence of Ontologies from Personomies in Tagging-Based Systems. **La-Web: 2009 Latin American Web Congress**, p. 193-200, 2009 2009.
- BAYLEY, J.; OTTENHOFF, T.; VERWEIJ, C. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? **Genes and Immunity**, v. 5, n. 5, p. 315-329, JUL 2004 2004. ISSN 1466-4879.
- BEIGUELMAN, B. Genética e hanseníase. **Ciênc. saúde coletiva**, São Paulo, v. 7, n. 1, 2002 .
- BEIGUELMAN, B. Lepromin reaction: genetic studies including twin pair analysis. **Acta Leprologica**, 44:5-65, 1971.
- BERNAL, A.; JIRTLE, R. Epigenomic Disruption: The Effects of Early Developmental Exposures. **Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology**, v. 88, n. 10, p. 938-944, OCT 2010 2010. ISSN 1542-0752.

- 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.
- BOEVA, V. *et al.* An Adaptive Approach for Integration Analysis of Multiple Gene Expression Datasets. **Artificial Intelligence: Methodology, Systems, and Applications, Aimsa 2010**, v. 6304, p. 221-230, 2010. ISSN 0302-9743.
- 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.
- _____. Guia de Vigilância Epidemiológica. In: _____ Editora MS. **Ministério da Saúde**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília/DF: Catalogação na fonte –p.816, 2005.
- _____. Hanseníase: situação epidemiológica: **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2013a.
- _____. Relatório de Situação Bahia. Editora MS. **Ministério da Saúde**, Brasília/DF, 35 p. 2011.
- _____. 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.
- _____. 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
- CARDOSO, B. *et al.* Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 6, p. 803-806, MAR 28 2010. ISSN 0007-1145.
- CARDOSO, C. C., A. C. PEREIRA, *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.

- 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.
- CARDOSO, C. *et al.* IFNG +874 T > A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. **Human Genetics**, v. 128, n. 5, p. 481-490, NOV 2010 2010. ISSN 0340-6717.
- CASTELLUCCI, L. C. C. JAMIESON, S. E. *et al.* FLI1 polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Genes and immunity**. v.12. 2011
- CASTELLUCCI, L. *et al.* Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infection Genetics and Evolution**, v. 12, n. 5, p. 1102-1110, JUL 2012 2012. ISSN 1567-1348.
- CASTELLUCCI, L., S. E. JAMIESON, *et al.* CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. **Bmc Medical Genetics**, v.11, Jan 20. 2010.
- 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.
- EICHELMANN & GARCIA, M. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia mimicking leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 4, p. AB157-AB157, APR 2013 2013. ISSN 0190-9622.
- ERDEI, E. *et al.* Cytokines and Tumor Metastasis Gene Variants in Oral Cancer and Precancer in Puerto Rico. **Plos One**, v. 8, n. 11, NOV 20 2013 2013. ISSN 1932-6203.
- 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.
- FERNANDEZ-MESTRE, M. T., K. GENDZEKHADZE, *et al.* TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. **Tissue Antigens**, v.64, n.4, Oct, p.469-72. 2004.
- FINE, P. E. Leprosy: what is being "eliminated"? **Bull World Health Organ**, v.85, n.1, jan, p.2, 2007.
- FINIASZ, M. R., M. C. FRANCO, *et al.* IL-9 promotes anti-Mycobacterium leprae cytotoxicity: involvement of IFN gamma. **Clinical and Experimental Immunology**, v.147, n.1, Jan, p.139-147. 2006.
- FISHMAN, M. A. E A. S. PERELSON. Th1/Th2 Cross Regulation. **Journal of Theoretical Biology**, v.170, n.1, p.25-56. 1994.
- Ford, E. B., Polymorphism. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**. V.20, p.73-88. 1945
- 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.
- FRANCESCHI, D. S., P. S. MAZINI, *et al.* Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **Int J Infect Dis**, v.13, n.4, Jul, p.493-8. 2009.
- GNJEC, A. *et al.* Association of alleles carried at TNFA-850 and BAT1-22 with Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 5, AUG 20 2008 2008. ISSN 1742-2094.
- GOULART, I. M. B., J. R. MINEO, *et al.* Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. **Clinical and Experimental Immunology**, v.122, n.3, Dec, p.330-334. 2000.
- HAGGE, D. *et al.* Lymphotoxin-alpha and TNF Have Essential but Independent Roles in the Evolution of the Granulomatous Response in Experimental Leprosy. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 4, p. 1379-1389, APR 2009 2009. ISSN 0002-9440.
- 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. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.2, p.373-400. 2001.
- HSIEH, N. K., C. C. CHU, *et al.* Association of HLA-DRB1*0405 with resistance to multibacillary leprosy in Taiwanese. **Human Immunology**, v.71, n.7, Jul, p.712-716. 2010.
- 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.
- JONES, M.; FEJES, A.; KOBOR, M. DNA methylation, genotype and gene expression: who is driving and who is along for the ride? **Genome Biology**, v. 14, n. 7, 2013 2013. ISSN 1465-6906.
- JOPLING, W. PHYSIOTHERAPY IN LEPROSY. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 3, p. 73-&, 1966 1966. ISSN 0022-5304.
- KAHAWITA, I. P., S. L. WALKER, *et al.* Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v.83, n.1, Jan-Feb, p.75-82. 2008.
- KARIMI, M. *et al.* A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of-308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 11, p. 1454-1462, NOV 2009 2009. ISSN 1018-4813
- KARPLUS, T. M., S. M. JERONIMO, *et al.* Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of *Leishmania chagasi* infection. **Infect Immun**, v.70, n.12, p.6919-25. 2002.

- KORODA, G.; TABUS, I. A universal algorithm for random-access compression and applications for annotated DNA sequences. **2007 Ieee International Workshop on Genomic Signal Processing and Statistics**, p. 114-117, 2007 2007.
- KROEGER, K.; CARVILLE, K.; ABRAHAM, L. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **Molecular Immunology**, v. 34, n. 5, p. 391-399, APR 1997 1997. ISSN 0161-5890.
- LASTORIA, J.; DE ABREU, M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205-218, MAR-APR 2014 2014. ISSN 0365-0596.
- LLUCH, P. et al. Development of Leprosy in a Patient with Rheumatoid Arthritis During Treatment with Etanercept: A Case Report. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 2, p. 127-130, OCT 2012 2012. ISSN 0049-0172
- LOCKWOOD, D. L., SB; DESIKAN, KV; EBENEZER, G; SUNEETHA, S; NICHOLLS, P. The histological diagnosis of leprosy type 1 reactions: identification of key variables and an analysis of the process of histological diagnosis. **Journal of Clinical Pathology**, v.61, n.5, p.595-600. 2008.
- LOUIS, F. et al. LAST OFFENSIVE OF LEPROSY IN THE SOUTH OF THE PACIFIC-OCEAN - THE OUTBREAK OF RAPA (1922-1950). **Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique**, v. 80, n. 3, p. 306-319, 1987 1987. ISSN 0037-9085.
- 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.
- 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.
- MCGARRY & FIELD, M. et al. Tumor necrosis factor locus polymorphisms in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 50, n. 3, p. 303-307, SEP 1997 1997. ISSN 0001-2815.
- 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.
- METLAPALLY & YANOVITCH, T. et al. Hepatocyte growth factor and myopia: Genetic association analyses in a caucasian population. **Molecular Vision**, v. 15, n. 108, p. 1028-1035, MAY 20 2009 2009. ISSN 1090-0535.
- MHAWECH-FAUCEGLIA, P. et al. Diagnostic utility of FLI-1 monoclonal antibody and dual-colour, break-apart probe fluorescence in situ (FISH) analysis in Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour (EWS/PNET). A comparative study with CD99 and FLI-1 polyclonal antibodies. **Histopathology**, v. 49, n. 6, p. 569-575, DEC 2006 2006. ISSN 0309-0167.
- MinistériodaSaúdeBrasil(MSBrasil).2008;2011http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profi sional/area.cfm?id_area=1466. Acesso em 02/10/2011 as 17:40hs

- 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.
- MIRA, M. T.; ALCAIS, A. *et al.*, Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population, **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p. 412–415, 2003.
- MIRA, M. T.; ALCAIS, A. *et al.*, 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.
- MODLIN RL. The innate immune response in leprosy. **Curr Opin Immunol**;22:48-54. 2011.
- MORAES, M. *et al.* Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes and Immunity**, v. 5, n. 7, p. 592-595, NOV 2004 2004. ISSN 1466-4879.
- 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. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 51, n. 3, p. 417-426, SEP 2004 2004. ISSN 0190-9622.
- 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.
- MOSMANN, T. R. E R. L. COFFMAN. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, v.7, p.145-73. 1989.
- NAKERAKANTI, S. *et al.* Fli1 and Ets1 have distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 35, p. 25259-25269, SEP 1 2006 2006. ISSN 0021-9258.
- NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 90-98, JAN-FEB 2015 2015. ISSN 0738-081X.
- NEDWIN, G. *et al.* STRUCTURE AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF THE HUMAN LYMPHOTOXIN GENE. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 171-181, 1985 1985. ISSN 0730-2312.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- PACHECO, A.; CARDOSO, C.; MORAES, M. IFNG+874T/A, IL10-1082G/A and TNF-308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Human Genetics**, v. 123, n. 5, p. 477-484, JUN 2008 2008. ISSN 0340-6717.
- 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
- PEELMAN, L. J., P. CHARDON, *et al.* The Bat1 Gene in the Mhc Encodes an Evolutionarily Conserved Putative Nuclear-Rna Helicase of the Dead Family. **Genomics**, v.26, n.2, Mar 20, p.210-218. 1995.
- PIRIS A, LOBO AZ, MOSCHELLA SL. Global dermatopathology: Hansen's disease--current concepts and challenges. **J Cutan Pathol**;37 Suppl 1:125-36. 2010.
- PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v.82, p.451-459, 2007.
- PRICE, P., A. M. L. WONG, *et al.* Polymorphisms at positions-22 and-348 in the promoter of the BAT1 gene affect transcription and the binding of nuclear factors. **Human Molecular Genetics**, v.13, n.9, May 1, p.967-974. 2004.
- QIDWAI, T.; KHAN, F. Tumour Necrosis Factor Gene Polymorphism and Disease Prevalence. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 6, p. 522-547, DEC 2011 2011. ISSN 0300-9475.
- QUINONES-LOMBRANA, A. *et al.* BAT1 promoter polymorphism is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 5, p. 741-744, MAY 2008 2008. ISSN 0315-162X.
- 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.
- RAMASAWMY, R., E. CUNHA-NETO, *et al.* BAT1, a putative anti-inflammatory gene, is associated with chronic chagas cardiomyopathy. **Journal of Infectious Diseases**, v.193, n.10, May 15, p.1394-1399. 2006.
- 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.

- RUDDLE *et al.* CYTOTOXICITY MEDIATED BY SOLUBLE ANTIGEN AND LYMPHOCYTES IN DELAYED HYPERSENSITIVITY .3. ANALYSIS OF MECHANISM. **Journal of Experimental Medicine**, v. 128, n. 6, p. 1267-&, 1968 1968. ISSN 0022-1007.
- SAKTHIANANDERWAREN *et al.* The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15551-15556, OCT 25 2005 2005. ISSN 0027-8424.
- SAKTHIANANDESWAREN, A. *et al.* Fine Mapping of Leishmania major Susceptibility Locus *Imr2* and Evidence of a Role for *Fli1* in Disease and Wound Healing. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2734-2744, JUN 2010 2010. ISSN 0019-9567
- SALGAME P, ABRAMS JS, CLAYBERGER C, *et al.* Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science**; 254:279-82. 1991.
- SAMBROOK, J.; GETHING, M. PROTEIN-STRUCTURE - CHAPERONES, PAPERONES. **Nature**, v. 342, n. 6247, p. 224-225, NOV 16 1989 1989. ISSN 0028-0836.
- SANTOS, A. *et al.* Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 11, p. 1687-1691, DEC 1 2002 2002. ISSN 0022-1899.
- 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.
- SCHURR, E.; ALCAIS, A. *et al.* Genetic predisposition to leprosy: a major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. **Seminars in Immunology**, v.18, n.6, p.404-410, 2006.
- SCOLLARD D. M.; ADAMS L. B. *et al.*, "The continuing challenges of leprosy," **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p.338-381, 2006.
- SCOLLARD DM, ADAMS LB, GILLIS TP, KRAHENBUHL JL, TRUMAN RW, WILLIAMS DL. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**; 19:338-81. 2006.
- SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.2, apr, p.338-81, 2006.
- 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.
- SIDDIQUI, M. *et al.* A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13. **Nature Genetics**, v. 27, n. 4, p. 439-441, APR 2001 2001. ISSN 1061-4036.

- 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.
- SILVA, N. N. P. Estudo do polimorfismo de genes nas citocinas (TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-10 e TGF-beta) em uma amostra da população de Salvador. Salvador. 2003. (Dissertação de Mestrado)
- 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
- SINCLAIR, K. *et al.* DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19351-19356, DEC 4 2007 2007. ISSN 0027-8424.
- SINSIMER, D., D. FALLOWS, *et al.* Mycobacterium leprae Actively Modulates the Cytokine Response in Naive Human Monocytes. **Infection and Immunity**, v.78, n.1, Jan, p.293-300. 2010.
- SPIES, B., BRESNAHAN, SANDS, AND STROMINGER A. New cluster of genes within the human major histocompatibility complex. **Science**, v.243, n.4888, p.214-217. 1989.
- STEWART, S. *et al.* New thalidomide analogues derived through Sonogashira or Suzuki reactions and their TNF expression inhibition profiles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 650-662, JAN 15 2010 2010. ISSN 0968-0896.
- STORZ, J.; BEAUMONT, M. Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: An empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. **Evolution**, v. 56, n. 1, p. 154-166, JAN 2002 2002. ISSN 0014-3820.
- STUBER, F. *et al.* Unusual allele frequencies of a genomic TNF-alpha polymorphism in patients with severe sepsis. **24th Central European Congress on Anesthesiology, Vols 1 and 2**, p. B257-B260, 1995 1995.
- SUZUKI, M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 465-476, JUN 2008 2008. ISSN 1471-0056.
- TARIQUE, M. *et al.* Association of TNF-alpha-(308(GG)), IL-10(-819(TT)), IL-10(-1082(GG)) and IL-1R1(+1970(CC)) genotypes with the susceptibility and progression of leprosy in North Indian population. **Cytokine**, v. 73, n. 1, p. 61-65, MAY 2015 2015. ISSN 1043-4666.
- 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.
- WHO(WorldHealthOrganization),2011.<http://www.niaid.nih.gov/topics/leprosy/Understanding/Pages/whatis.aspx>. Acesso em 02/10/2011 as 18:05hs.
- WILLIAMS, D. LEPROMATOUS LEPROSY. **Proceedings of the Royal Society of Medicine-London**, v. 61, n. 6, p. 594-&, 1968 1968. ISSN 0035-9157.

- WILSON, A. et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 3195-3199, APR 1 1997 1997. ISSN 0027-8424.
- WOLFF, D.; WHITE, W.; WILLARD, H. X inactivation spread into autosomal material: evidence for a difference between autosomal and X chromosomal DNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 82, n. 1-2, p. 143-143, 1998 1998. ISSN 0301-0171.
- 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.
- WU, W.; MCCLAIN, K. DNA polymorphisms and mutations of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH). **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 17, n. 10, p. 631-635, OCT 1997 1997. ISSN 1079-9907.
- 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, UYEMURA K, DEANS RJ, *et al.* Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**; 254:277-9.1991.
- YAMAMURA M. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**; 255:12.1992.
- 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. ARTIGO PUBLICADO



The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Brief communication

The role of ERBB2 gene polymorphisms in leprosy susceptibility[☆]



Jamile Leão Rêgo^{b,*}, Joyce Moura Oliveira^b, Nadja de Lima Santana^b,
Paulo Roberto Lima Machado^{a,b}, Léa Cristina Castellucci^{a,b}

^a Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, Brazil

^b Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2014

Accepted 1 December 2014

Available online 27 January 2015

Keywords:

ERBB2

Gene analysis

Leprosy

ABSTRACT

Mycobacterium leprae infects skin and peripheral nerves causing deformities and disability. The *M. leprae* bacterium binds to ErbB2 on the Schwann cell surface causing demyelination and favoring spread of the bacilli and causing nerve injury. Polymorphisms at the ERBB2 gene were previously investigated as genetic risk factors for leprosy in two Brazilian populations but with inconsistent results. Herein we extend the analysis of ERBB2 variants to a third geographically distinct population in Brazil. Our results show that there is no association between the genotyped SNPs and the disease ($p > 0.05$) in this population. A gene set or pathway analysis under the genomic region of ERBB2 will be necessary to clarify its regulation under *M. leprae* stimulus.

© 2015 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, and influenced by genetic and environmental factors. This infection has a broad clinical and immunological spectrum that causes high morbidity rates, with a major impact on public health. Although leprosy prevalence has been extensively reduced after the introduction of multidrug therapy and vaccination with BCG¹ more than 200,000 new cases are reported annually according to World Health Organization.² The spectrum of clinical manifestations is illustrated by two polar forms, tuberculoid and lepromatous leprosy, and various intermediate or borderline forms.³ Peripheral nerve damage, the most serious complication of leprosy, is associated with immunological and inflammatory

events which evolve through time and have consequences that can extend for years after cure of the infection. The ERBB2 gene lies on chromosome 17q11-q21, and encodes an important class of receptor tyrosine kinases involved in transmission of biochemical signals.⁴ The binding of *M. leprae* to myelinated Schwann cells through ligation to the ErbB2 receptor results in Schwann cell demyelination and increases the population of de-differentiated Schwann cells through the Erk1/2 signaling pathway.⁵ This creates an environment that favors *M. leprae* proliferation and leads to nerve damage. Recent data have shown that polymorphisms in the ERBB2 gene were associated with leprosy development in families from Pará State, but not in a population from the state of

[☆] This work was conducted with the effort and contribution of the following persons: Jamile Leão Rêgo, Joyce Moura Oliveira, Nadja de Lima Santana, Thaís Lamêgo Magalhães, Thaillamar Silva Vieira, Mayume Shibuya, Lídia Maria Machado, Paulo Roberto Lima Machado and Léa Cristina Castellucci.

* Corresponding author.

E-mail address: jamileao@hotmail.com (J.L. Rêgo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.12.008>

1413-8670/© 2015 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Table 1 – Characteristics of case–control sample from the population of Bahia, Brazil.

(A) Patients characteristics			
	n Individuals	Mean age (years) ± SD ^a	Male:female
Cases	362	42.32 ± 12.88	199:163
Controls	368	34.80 ± 10.24	258:110
(B) Clinical characteristics of the cases cohort			
Clinical phenotype	n		
Tuberculoid (TT)	44		
Borderline TT (BT)	48		
Borderline (BB)	38		
Borderline lepromatous (BL)	40		
Lepromatous (LL)	124		
Unclassified leprosy	63		
Other leprosy clinical forms	5		
RR	80		
ENL	84		
Total ^b	362		
Note.			
^a SD, standard deviation; RR reversal reactions; ENL, erythema nodosum leprosum.			
^b RR and ENL patients are also classified under leprosy clinical spectrum.			

Rio Grande do Norte in Brazil.⁶ Herein we investigate a geographically distinct population from Northeastern Brazil to further evaluate the role of this gene in leprosy susceptibility. The state of Bahia is considered of medium endemicity, according to the parameter of prevalence.⁷ Three hundred and sixty-two leprosy cases were selected at the Hospitals Edgard Santos and Dom Rodrigo de Menezes. Both are considered reference centers for treatment of the disease with patients diagnosed according to the guidelines of the Brazilian Ministry of Health. Additionally, 368 local blood bank donors were recruited as controls. Informed consent was obtained from all participants. Approval for the use of the samples in this study was obtained from the Federal University of Bahia (CEP-50/2010) and the Brazilian National Ethical Committee (CONEP 11019). Detailed complementary data about cases and controls are described in Table 1. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs2517955, rs2517956, rs1810132, rs2952156, rs1136201) were genotyped by TaqMan RT-PCR technology (Applied Biosystems®) using Pre-designed genotyping assays.

Table 3 – Results of logistic regression analyses for the genotyped ERBB2 polymorphisms.

ERBB2 alleles	Global test		OR (95% CI)	p-Value
	2 df	1 df		
rs2517955 (T vs. C)	0.239	0.227	1.14 (0.92–1.41)	0.228
rs2517956 (A vs. G)	0.051	0.364	1.10 (0.88–1.37)	0.365
rs1810132 (T vs. C)	0.179	0.406	1.10 (0.87–1.40)	0.407
rs2952156 (G vs. A)	0.098	0.368	1.10 (0.88–1.38)	0.369
rs1136201 (A vs. G)	0.660	0.550	1.10 (0.79–1.54)	0.550
Note. The 2 df test represents the genotype-wise test, and the 1 df test represents the allele-wise test. CI, confidence interval; OR, odds ratio. The OR and p-values refer to 1 df tests.				

Table 2 describes characteristics of the SNPs used in this study and compares the minor allele frequencies between the three Northeastern populations. Tests for Hardy-Weinberg equilibrium and unconditional logistic regression analysis were done using STATA 8.2 with the freely available GenAssoc package (<http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/software/stata/>) to determine allele-wise (1 df test) and genotype-wise (2 df test) associations between ERBB2 SNPs and leprosy. Our analysis did not show any significant association between the five genotyped markers and leprosy per se ($p > 0.05$), as presented in Table 3. Nor were there any associations between ERBB2 polymorphisms and either lepromatous or tuberculoid forms of disease (data not shown).

The data showed here support previous observations of a lack of association between ERBB2 genetic variants and susceptibility to leprosy per se in a similar population-based case-control data set from Rio Grande do Norte.⁶ Our population-based study in Bahia and that in Rio Grande do Norte had larger sample sizes than the smaller family-based study in Pará, suggesting that the association observed in the latter population may represent a false positive result. However, Araújo et al.⁶ draw attention to the fact that ERBB2 lies under a linkage peak^{8,9} for leprosy observed in the same large pedigrees employed for the study in Pará State. The region of the linkage peak at chromosome 17q11-q22 is a gene dense region of potential immunological candidate genes contributing to leprosy susceptibility.^{8,9} This raises the possibility that variants at ERBB2 might contribute to larger chromosome haplotypes transmitted to affected individuals in these Pará families. Further investigation is necessary to clarify if ERBB2 contributes genetically and/or functionally to leprosy

Table 2 – Details of ERBB2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) genotyped in the three populations.

SNP rs#	Location (Build Hg19)	Cohorts genotyped	Minor allele	Minor allele frequency (Pará/RN/Bahia)	Position/function
rs2517955	37843931	RN/Bahia	C	0.49/0.41	Upstream region
rs2517956 ^a	37844109	Pará/RN/Bahia	G	0.38/0.38/0.42	Upstream region
rs1810132	37866255	RN/Bahia	C	0.39/0.40	Intronic
rs2952156 ^a	37877085	Pará/RN/Bahia	A	0.38/0.38/0.38	Intronic
rs1136201 ^a	37879838	RN/Bahia	G	0.15/0.12	Coding, non-syn (I655V)

Adapted from Araújo et al.⁶

Note. Cohorts are from Pará, RN and Bahia states in northeastern Brazil.

^a SNPs associated with leprosy in Pará.

susceptibility in these families. Recent data shows that *M. leprae* hijacks the plasticity of adult Schwann cells, to reprogram infected cells to a progenitor/stem cell-like cells as a bacterial strategy to spread infection to other tissues.¹⁰ In addition, reprogrammed cells can attract macrophages, providing evidence for a functional role of innate immune response genes during reprogramming.¹¹ Finally, although gene analyses based on a single data type, such as gene expression data or SNP data, have successfully revealed altered cellular processes associated with different complex diseases¹²⁻¹⁵ it is also known that single variant or single gene analyses generally account for only a small proportion of the phenotypic variation in complex traits. In this sense, we have to consider that ERBB2 is located within a genetic locus that contains a number of genes directly involved in the immune response and pathogenesis of infectious diseases. A well-powered genome-wide association study would be needed to determine a role for ERBB2 relative to other genes that have been shown to achieve genome-wide significance in other populations.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Financial support

CNPq, INCT (<http://www.cnpq.br>).

Acknowledgements

We thank the staff of Magalhães Neto Leprosy Service, Hospital Dom Rodrigo de Menezes and HEMOBA for the logistical support in the sample collection. We also thank Dr. Selma Jeronimo for the scientific support. We thank Prof. Jenefer Blackwell for helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Karonga PTG. Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis in Malawi. *Lancet*. 1996;348:17-24.
2. Global leprosy: update on the 2012 situation – World Health Organization, WHO. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013;88:365-80.
3. Montoya D, Modlin RL. Learning from Leprosy: Insight into the human innate immune response. *Adv Immunol*. 2010;10:1-24.
4. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103:211-25.
5. Tapinos N, Ohnishi M, Rambukkana A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nat Med*. 2006;12:961-6.
6. Araújo SRF, Jamieson SE, Dupnik KM, et al. Examining ERBB2 as a candidate gene for susceptibility to leprosy (Hansen's disease) in Brazil. 2014 *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:182-8.
7. Oliveira VM, Assis CRD, Silva KCC. Levantamento epidemiológico da hanseníase no nordeste brasileiro durante o período de 2001-2010. *Scire Salutis*. 2013;3:16-27.
8. Jamieson SE, Miller EN, Black GF, et al. Evidence for a cluster of genes on chromosome 17q11-q21 controlling susceptibility to tuberculosis and leprosy in Brazilians. *Genes Immun*. 2004;5:46-57.
9. Miller EN, Jamieson SE, Joberty C, et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun*. 2004;5:63-7.
10. Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raaum R, Rambukkana A. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell*. 2013;152:51-67.
11. Masaki T, McGlinchey A, Cholewa-Waclaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambukkana A. Innate immune response precedes *Mycobacterium leprae*-induced reprogramming of adult Schwann Cells. *Cell Reprogram*. 2014;16:9-17.
12. Baranzini SE, Galwey NW, Wang J, et al. Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2009;18:2078-90.
13. Ooi CH, Ivanova T, Wu J, et al. Oncogenic pathway combinations predict clinical prognosis in gastric cancer. *PLoS Genet*. 2009;5:e1000676.
14. Liu YJ, Guo YF, Zhang LS, et al. Biological pathway-based genome-wide association analysis identified the vasoactive intestinal peptide (VIP) pathway important for obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18:2339-46.
15. Zhang L, Guo YF, Liu YZ, et al. Pathway-based genome-wide association analysis identified the importance of regulation-of-autophagy pathway for ultradistal radius BMD. *J Bone Miner Res*. 2010;25:1572-80.

XIII. ARTIGO SUBMETIDO

Manuscript Number:

Title: The -308bp TNF gene polymorphism influences tumour necrosis factor expression in leprosy patients in Bahia State, Brazil

Article Type: Research paper

Keywords: leprosy, genetic association, tumour necrosis factor, mRNA expression, serum levels

Corresponding Author: Prof. Jenefer M. Blackwell, D.Sc.

Corresponding Author's Institution: Telethon Kids Institute

First Author: Joyce M Oliveira

Order of Authors: Joyce M Oliveira; Jamile L Rego; Nadja de Lima Santana; Marcos Braz; Sarra E Jamieson; Thailamar S Vieira; Thais L Magalhaes; Paulo R Machado; Jenefer M. Blackwell, D.Sc.; Lea C Castellucci

Abstract: Leprosy or Hansen's disease is a debilitating chronic granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*, with high incidence and prevalence in Brazil. The -308bp G/A single nucleotide polymorphism (SNP rs1800629) in the tumour necrosis factor (TNF) gene promoter is a proposed risk factor for leprosy. In Brazil, Northern India, Egypt and Nepal, the common G allele was associated with leprosy. In Eastern India, Thailand and Malawi the minor A allele was the risk factor. Allele A was previously associated with high TNF. We genotyped rs1800629 in 326 leprosy cases from Bahia State, Brazil, including 72 paucibacillary (PB) and 47 multibacillary (MB) without reactions, and 69 reversal reaction (RR) and 78 erythema nodosum leprosum (ENL) with reactions. Logistic regression was used to compare patient groups with 331 healthy controls. Relative TNF mRNA was determined in peripheral blood leukocytes by QRT-PCR, and serum TNF levels measured by ELISA. We found that TNF mRNA expression was higher ($P=0.03$) in leprosy patients compared to endemic controls, but did not differ significantly between clinical subgroups. Carriage of the minor A allele was associated ($P=0.003$) with low TNF mRNA across leprosy patients. Nevertheless, we found no evidence for either allele at this SNP as a risk factor for leprosy per se (OR=1.12, 95% CI 0.79-1.60, $P=0.52$), PB (OR=0.99, 95% CI 0.54-1.81, $P=0.97$), MB (OR=0.86, 95% CI 0.40-1.83, $P=0.70$), RR (OR=1.37, 95% CI 0.79-2.38, $P=0.27$) or ENL (OR=0.76, 95% CI 0.40-1.45, $P=0.42$) when compared to endemic controls. Further studies are required to determine whether the influence of the minor A allele on TNF mRNA levels determines response to treatment, particularly in the context of ENL reactions treatment with anti-TNF therapies and RR reactions where treatment with prednisolone is known to reduce TNF levels. Our findings contribute to understanding TNF as an important determinant of leprosy immunopathology in Brazil.

Suggested Reviewers: Marie-Anne Shaw
M.Shaw@leeds.ac.uk

Marie-Anne carried out the first association study of leprosy and TNF in Brazil. Although she was in my lab at the time, I believe sufficient time has passed that she can provide an independent view of the paper.

Melanie Newport

m.j.newport@bsms.ac.uk

Melanie has extensive experience of undertaking this kind of study in the tropics, in addition to having studied the TNF locus in relation to TB in The Gambia

Lavanya Suneetha

drlavanyasuneetha@gmail.com

Dr Suneetha has looked extensively at the role of TNF in leprosy reactions in India

Milton Moraes

mmoraes@fiocruz.br

Dr Moraes has led other studies on the role of TNF polymorphisms in leprosy in Brazil

Dear Editors

Re: Oliveira et al. The -308bp *TNF* gene polymorphism influences tumour necrosis factor expression in leprosy patients in Bahia State, Brazil

We would like you to consider the above paper for publication in *Infection, Genetics and Evolution*. The paper revisits the story around the -308bp polymorphism at the *TNF* gene as a possible risk factor for leprosy in Brazil. Whilst we did not replicate genetic associations between leprosy and this SNP, we did find evidence that the variant influences expression of *TNF* at the mRNA in leprosy patients. Of interest, our results were at variance with previous reporter gene studies which concluded that the minor variant allele A at this position in the *TNF* promoter drives higher levels of expression of *TNF*. However, our study demonstrates that when this variant is studied in the context of its genomic environment, and in leprosy patients, the minor variant allele A is associated with low expression of *TNF* at the mRNA level. Overall we believe that our study provides novel and interesting insight into the possible role of *TNF* polymorphisms in determining pathogenesis of disease. We hope that you will consider this paper worthy of review for publication in *Infection, Genetics and Evolution*.

The authors declare no conflict of interest.

With thanks

Léa Castellucci
Corresponding author

Highlights

1. Previous studies have found association between TNF polymorphisms and leprosy
2. Here no association was observed at the -308bp TNF polymorphism and leprosy per se, or leprosy sub-types, in Brazil
3. Association was observed between TNF mRNA expression in peripheral blood from leprosy patients and TNF -308bp genotypes
4. A similar trend was observed for serum levels of TNF by genotype

1
2
3
4 The -308bp *TNF* gene polymorphism influences tumour necrosis factor
5 expression in leprosy patients in Bahia State, Brazil
6
7
8
9

10
11
12 Joyce Moura Oliveira^{1,2}, Jamile Leão Rêgo^{1,2}, Nadja de Lima Santana^{1,2}, Marcos Braz^{1,2}, Sarra E

13 Jamieson³, Thaillamar Silva Vieira¹, Thaís Lamêgo Magalhães¹, Paulo Roberto Lima Machado^{1,2},

14
15
16
17 Jenefer M Blackwell³, Léa C Castellucci^{1,2,5}
18
19
20
21

22 ¹National Institute of Science and Technology in Tropical Diseases, Brazil and Federal University of
23 Bahia, Salvador, Brazil
24

25
26 ²Program of Post-graduation in Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil
27

28
29 ³Telethon Kids Institute, The University of Western Australia, Subiaco, Western Australia, Australia
30

31 ⁵Corresponding author
32

33
34 Email addresses:
35

36 JMO: joycemouraoliveira@yahoo.com.br
37

38
39 JLR: jamileao@hotmail.com
40

41
42 NLS: nlimas@hotmail.com
43

44
45 MB: mbrazuefs@gmail.com
46

47
48 SEJ: sarra.jamieson@telethonkids.org.au
49

50
51 TSV: thaymiss@hotmail.com
52

53
54 TLM: thaislamegomagalhaes@gmail.com
55

56
57 PRLM: prlmachado@uol.com.br
58

59
60 JMB: jblackwell@ichr.uws.edu.au, jmb37@cam.ac.uk
61

62
63 LCC: leacastel@hotmail.com
64
65

ABSTRACT

1
2 Leprosy or Hansen's disease is a debilitating chronic granulomatous disease caused by
3
4 *Mycobacterium leprae*, with high incidence and prevalence in Brazil. The -308bp G/A single
5
6 nucleotide polymorphism (SNP rs1800629) in the tumour necrosis factor (*TNF*) gene
7
8 promoter is a proposed risk factor for leprosy. In Brazil, Northern India, Egypt and Nepal, the
9
10 common G allele was associated with leprosy. In Eastern India, Thailand and Malawi the
11
12 minor A allele was the risk factor. Allele A was previously associated with high TNF. We
13
14 genotyped rs1800629 in 326 leprosy cases from Bahia State, Brazil, including 72
15
16 paucibacillary (PB) and 47 multibacillary (MB) without reactions, and 69 reversal reaction
17
18 (RR) and 78 erythema nodosum leprosum (ENL) with reactions. Logistic regression was
19
20 used to compare patient groups with 331 healthy controls. Relative TNF mRNA was
21
22 determined in peripheral blood leukocytes by QRT-PCR, and serum TNF levels measured by
23
24 ELISA. We found that TNF mRNA expression was higher ($P=0.03$) in leprosy patients
25
26 compared to endemic controls, but did not differ significantly between clinical subgroups.
27
28 Carriage of the minor A allele was associated ($P=0.003$) with low TNF mRNA across leprosy
29
30 patients. Nevertheless, we found no evidence for either allele at this SNP as a risk factor for
31
32 leprosy *per se* (OR=1.12, 95% CI 0.79-1.60, $P=0.52$), PB (OR=0.99, 95% CI 0.54-1.81,
33
34 $P=0.97$), MB (OR=0.86, 95% CI 0.40-1.83, $P=0.70$), RR (OR=1.37, 95% CI 0.79-2.38,
35
36 $P=0.27$) or ENL (OR=0.76, 95% CI 0.40-1.45, $P=0.42$) when compared to endemic controls.
37
38 Further studies are required to determine whether the influence of the minor A allele on TNF
39
40 mRNA levels determines response to treatment, particularly in the context of ENL reactions
41
42 treatment with anti-TNF therapies and RR reactions where treatment with prednisolone is
43
44 known to reduce TNF levels. Our findings contribute to understanding TNF as an important
45
46 determinant of leprosy immunopathology in Brazil. (300 words; 300 words allowed)
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Introduction

Human leprosy (or Hansen's disease) is a chronic granulomatous infectious disease caused by the obligate intracellular organism *Mycobacterium leprae*. Although its prevalence was extensively reduced after the introduction of multidrug therapy (WHO, 2002) and BCG vaccination (Fine, 1996), leprosy is still considered a neglected disease and constitutes a major public health problem with 232,857 new cases reported globally in 2012 (WHO, 2013), 33,303 of which occurred in Brazil. Hence, leprosy remains a major concern in Brazil.

Our knowledge about the mechanisms underlying the variable clinical and immunological spectrum in leprosy remains limited, but genetic epidemiological studies have continued to contribute to our knowledge of immunopathology of disease. This genetic research is founded on the demonstration of high heritability for leprosy susceptibility and the conclusion that leprosy is largely a genetic disease (Alter et al., 2008; Alter et al., 2011). Indeed, genetic studies of leprosy have been particularly successful in identifying genetic risk factors in both genome-wide linkage (Mira et al., 2004; Mira et al., 2003) and association (Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2009) studies, with the human leukocyte antigen (HLA) region being the most significant association in the latter. This builds on a history of studies demonstrating associations at HLA for leprosy (reviewed (Blackwell et al., 2009)), a number of which have specifically focused on the role of polymorphisms at the HLA Class III region tumour necrosis factor (*TNF*) gene in Brazil (Cardoso et al., 2011; Franceschi et al., 2009; Santos et al., 2000; Santos et al., 2002; Shaw et al., 2001) and elsewhere (Fitness et al., 2004; Roy et al., 1997; Sapkota et al., 2010; Settin et al., 2007; Tarique et al., 2015), in particular on the role of a -308bp G/A single nucleotide polymorphism (SNP rs1800629). In Brazil (Cardoso et al., 2011; Franceschi et al., 2009; Santos et al., 2000; Santos et al., 2002), Northern India (Tarique et al., 2015), Egypt (Settin et al., 2007) and Nepal (Sapkota et al., 2010), the

1 common G allele at this -308bp SNP has been associated with leprosy *per se*, and in stratified
2 analysis of paucibacillary (PB) tuberculoid (Franceschi et al., 2009; Shaw et al., 2001) and
3
4 multibacillary (MB) lepromatous leprosy (Franceschi et al., 2009; Santos et al., 2002; Settin
5
6 et al., 2007; Shaw et al., 2001), while the minor A allele appears to be protective. Conversely,
7
8 in Eastern India (Roy et al., 1997) and Thailand (Vejbaesya et al., 2007) the minor A allele
9
10 was the risk factor for MB leprosy, while in Malawi (Cardoso et al., 2011; Fitness et al.,
11
12 2004) the trend was also in this direction for leprosy *per se* and PB leprosy. The minor A
13
14 allele has also been associated with a stronger delayed-type hypersensitivity skin-test
15
16 response to *Mycobacterium leprae* antigen in borderline tuberculoid leprosy patients (Moraes
17
18 et al., 2001).
19
20
21
22
23

24 The *TNF* gene is located adjacent to *LTA* encoding lymphotoxin-alpha within the class III
25 region of HLA. Both have essential but independent roles in the evolution of the
26
27 granulomatous response in experimental leprosy (Hagge et al., 2009). In humans, circulating
28
29 TNF is elevated in both PB and MB leprosy (Madan et al., 2011), and is found in
30
31 granulomatous lesions (Lockwood et al., 2011). TNF also plays a part in acute inflammatory
32
33 leprosy reactions, with higher circulating levels of TNF observed in erythema nodosum
34
35 leprosum (ENL) type II reactions and in type I reversal reactions (RR) compared to cases not
36
37 in reaction (Chaitanya et al., 2013; Madan et al., 2011). Down-regulation of TNF mRNA
38
39 accompanies improved outcomes for type II reactional leprosy following administration of the
40
41 TNF-specific drugs thalidomide and pentoxifylline (Moraes et al., 2000). Reduction in TNF
42
43 mRNA (Moraes et al., 2000) and circulating TNF (Raju et al., 2014) is also observed
44
45 following treatment of type I reversal reactions (RR) with the corticosteroid prednisolone.
46
47
48
49
50
51
52
53

54 Associations between infectious and autoimmune diseases and the -308bp G/A
55
56 (rs1800629) SNP in the *TNF* promoter (reviewed (Bayley et al., 2004; Qidwai and Khan,
57
58 2011)) has led to many investigations questioning whether the SNP is functional in
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

determining TNF levels. A number of investigators have reported higher levels of induced (e.g. lipopolysaccharide or *M. leprae* antigen) levels of TNF in whole blood or peripheral leukocytes in individuals carrying the minor A allele compared to GG homozygotes (Cardoso et al., 2011; Louis et al., 1998). The resulting rationale is that high levels of proinflammatory TNF associated with carriage of the A allele would be detrimental in the context of autoimmune diseases and enhanced pro-inflammatory responses in infections like malaria, leprosy and cutaneous leishmaniasis (Bayley et al., 2004). Balancing this is the requirement for TNF in the activation of macrophages to kill mycobacteria, as evidenced by reactivation of mycobacterial infections, including leprosy (Lluch et al., 2012), following treatment of autoimmune disease patients with anti-TNF antibodies. Hence, the alternative hypothesis that protection from leprosy associated with the minor A allele could be due to the requirement for TNF to control leprosy infection. A series of reporter gene studies undertaken during the 1990s to determine directly whether the -308bp G/A (rs1800629) SNP in the *TNF* promoter region was involved in gene regulation were equivocal (Braun et al., 1996; Brinkman et al., 1995; Kroeger et al., 1997; Stuber et al., 1995; Wilson et al., 1997; Wu and McClain, 1997), leading Bayley and colleagues (Bayley et al., 2004) to conclude that the -308bp G/A polymorphism was not functional. A more recent study using a novel reporter system purports to provide more robust evidence that the -308bp G/A polymorphism is functional, confirming that the -308A allele expresses at a higher level compared with the -308G allele (Karimi et al., 2009). This has provided a system in which to demonstrate improved efficacy of new thalidomide analogues in specifically regulating TNF expression (Stewart et al., 2010).

In a geographically distinct population in Bahia State, Brazil, we now find that TNF mRNA expression is higher in leprosy patients compared to endemic controls, but does not differ significantly between clinical subgroups. Across leprosy patients, carriage of the minor

1 A allele is associated with low TNF mRNA. Nevertheless, we find no evidence for either
2 allele at this SNP as a risk factor for leprosy *per se*, or for any of the clinical subgroups of
3 leprosy, when compared to endemic controls.
4
5
6
7
8
9

10 **2. Materials and methods**

11 12 13 14 15 *2.1 Case patients, control subjects, and study design*

16
17
18 The study participants were enrolled from two different hospitals in the city of Salvador,
19 Bahia (Hospital Universitário Professor Edgard Santos and Hospital Especializado Dom
20 Rodrigo de Menezes). Both are reference centers for the treatment of leprosy, absorbing the
21 majority of cases from the state of Bahia. Leprosy patients were recruited after diagnostic
22 confirmation in accordance with the guidelines of the Ministry of Health of Brazil. This
23 included dermatological and neurological evaluation, skin-test sensitivity to leprosy antigen,
24 bacilloscopy of lymph smears (Cavalcanti et al., 2012), and biopsy of one or more lesions.
25 Individuals were classified within the leprosy clinical spectrum as having either
26 paucibacillary (PB: TT/BT or tuberculoid/bordeline tuberculoid) or multibacillary (MB:
27 BB/BL/LL or borderline, borderline lepromatous, or lepromatous) clinical forms of the
28 disease, with subsets of patients also being recorded clinically as having type I RR or type II
29 ENL reactions. A total of 326 leprosy cases of both sexes, aged between 16 to 68 years, were
30 included in the genetic association study (Table 1). The control group consisted of 331
31 individuals, aged between 16 and 67 years, recruited as volunteer blood bank donors in the
32 city of Salvador. Hence, our maximum power to detect allelic association at $P=0.05$ for a
33 variant at minor allele frequency (MAF) of 0.1 with effect size (genotype relative risk) of 1.5
34 was 76%. Informed consent was obtained from all participants. The study was approved by
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 the institutional review board of the Federal University of Bahia (CEP-50/2010) and the
2 Brazilian National Ethical Committee (CONEP 11019).
3
4
5
6
7

8 *2.2 DNA extraction and genotyping*

9

10 Blood was obtained by venipuncture and collected into dodecyl citrate acid- containing
11 Vacutainers (Becton Dickinson). Genomic DNA was prepared using the proteinase K and
12 salting-out method as described (Sambrook et al., 1989). Validated predesigned Taqman®
13 qPCR assays for the marker rs1800629, containing PCR primers and probes, were purchased
14 from Life Technologies® (Thermo Fisher, Inc), and reactions carried out according to the
15 manufacturer's protocols. This SNP corresponds to the position -308G/A in the promoter
16 region of the *TNF* gene. To ensure the accuracy of genotyping results, three positive controls
17 and a negative control were included in each 96-well plate. Taqman assays were performed
18 using the 7500 standard (Life Technologies), and the ABI software v 2.0.6 was used to
19 analyse the data.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 *2.3 RNA isolation, cDNA conversion and TaqMan real-time polymerase chain reaction*

41

42 Total leukocytes from patients that were not under treatment with immunosuppressive
43 drugs such as prednisone and thalidomide (in the case of type II reactions) were homogenized
44 in TRIzol reagent (Life Technologies). RNA was extracted using the PureLink™ RNA Mini
45 Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Total RNA concentration
46 was determined from spectrophotometric optical density measurement (260 and 280 nm). For
47 each sample tested, the ratio between the spectrophotometric readings at 260 nm and 280 nm
48 (OD₂₆₀/OD₂₈₀) was used to provide an estimate of the purity of the nucleic acid, and the
49 ratio in all samples ranged between 1.7 and 2.0. Reverse transcriptase reactions were then
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 carried out using the High Capacity cDNA Reversion Transcription Kit (Applied
2 Biosystems®) following manufacturer's instructions. The cDNA was then stored at -70°C
3
4 until use. Assays containing specific primers and probes for the TNF gene (Hs01038318_ml)
5
6 were purchased from Applied Biosystems®. The mRNA levels were normalized against the
7
8 house-keeping gene beta-actin within each sample. For this analysis we selected 37 patients
9
10 with leprosy, 22 without reaction (17 with confirmed PB leprosy, and 5 with confirmed MB
11
12 leprosy) and 15 with leprosy reactions (9 with type I reaction/ RR, and 5 with type II
13
14 reaction/ENL). In addition, 14 healthy donors from a local blood bank were selected as
15
16 controls. Real-time PCR was performed according to the manufacturer's protocols using the
17
18 ABI 7500 Standard (Applied Biosystems®). The data were analyzed by comparing the
19
20 threshold cycle (Ct), according to the equation $2^{-\Delta\Delta CT}$ where ΔCT is the Ct value of the target
21
22 gene subtracted from the Ct of the endogenous house-keeping gene, and $\Delta\Delta CT$ is the ΔCT
23
24 value of each individual, minus the median ΔCT of the control group.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 *2.4 TNF- α serum levels by ELISA*

36
37 Whole blood was obtained by venipuncture from patients that were not under treatment
38
39 with immunosuppressive drugs such as prednisone and thalidomide (in case of type II
40
41 reactions). The blood was centrifuged at 20,000g for ten minutes and the serum obtained
42
43 stored at -70°C until use. To measure the TNF levels, a high sensitivity enzyme-linked
44
45 immunosorbent assay (ELISA) sandwich technique was used (Invitrogen®, Life Tech, Inc),
46
47 according to manufacturer's protocols. Optical density was measured in the
48
49 spectrophotometer at 450 nm. The results were expressed in pg/ml by interpolation of optical
50
51 densities obtained from the standard curve generated against recombinant TNF included in the
52
53 kit. For this analysis we obtained data for 49 patients with leprosy *per se*, providing a sample
54
55 of 14 without reaction (9 PB; 5 MB) and 35 with reactions (22 with type I reaction/RR; 13
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

with type II reaction/ENL). In addition, 30 healthy blood bank donors were selected as controls.

2.5 Data analysis.

Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was determined in unrelated and unaffected control individuals using the GenAssoc package (available at: <http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/software/stata/>) within STATA (version 8.2; available at: <http://www.stata.com/>). Unconditional logistic regression analysis was performed using STATA to determine allele-wise (1 *df* test) and genotype-wise (2 *df* test) associations comparing cases and controls. Global test statistics were generated for both the 1 *df* test and the 2 *df* test, and odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) were calculated. A likelihood ratio test was used to compare 1 *df* and 2 *df* tests to determine whether there was any evidence for dominance. The gene expression and serum TNF data were analyzed by nonparametric Mann-Whitney test with a confidence level of 95% using the Prism5 program.

3. Results

3.1. Characteristics of the case and control groups

Table 1 presents the breakdown of numbers of males and females in each study group, together with information on average age (mean±SD) and age range for each group. Age ranges were well matched between all cases (leprosy *per se*), leprosy subgroups, and healthy blood bank controls.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3.2. Examining the TNF -308 G/A bp polymorphism (rs1800629) as a genetic risk factor for leprosy

There was no evidence of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for the rs1800629 SNP in the control sample. Table 2 presents the frequency distribution for genotypes in the different case groups and in the control group. The allele frequency for the minor A allele in the control group was 0.098, consistent with predominant admixture between Caucasian (e.g. HapMap-CEU: MAF=0.17) and African (e.g. HapMap-YRI; MAF=0.061) ethnicities in Brazil (Santos et al., 2015), and data from the 2010 Demographic Census in Brazil (IBGE, 2010) showing that the percent of self-reported African-descent in Bahia is 76.3%.

In our study in Bahia State, Brazil, we found no evidence for allelic association (Table 2) between the minor A allele and susceptibility to leprosy *per se*, i.e. in the total sample of all leprosy patients, when compared to the healthy blood bank controls (OR=1.12, 95% CI 0.79-1.60, $P=0.52$). Conversely, there was no evidence for the common G allele as a risk factor for leprosy *per se* (OR=0.89, 95% CI 0.61-1.27, $P=0.52$) in this population sample in Bahia State, Brazil. Since this was contrary to previous studies looking at allelic association between rs1800629 and susceptibility to leprosy *per se* in other population samples in Brazil (Cardoso et al., 2011; Franceschi et al., 2009; Santos et al., 2000; Santos et al., 2002), we investigated further whether associations might be observed for specific patient subgroups in our study (Table 2). All associations for patient groups are presented relative to the healthy blood bank controls. Likelihood ratio tests comparing allele-wise and genotype-wise tests (not shown) were not significant, suggesting that an additive model was sufficient to explain the data in all leprosy versus control group comparisons. Therefore, only data for allele-wise tests are presented in Table 2.

In a previous study in India (Roy et al., 1997), susceptibility to leprosy was also associated with the minor A allele, but only for MB and not PB disease. Therefore, our first

1 consideration was whether patients that fall within these traditionally identified PB versus MB
2 clinical subgroups differ in their association with alleles at rs1800629. For this analysis we
3
4 used only those patients where the clinical diagnosis was not confounded by subsequent
5
6 clinical diagnosis of reactions. In our analysis (Table 2) we found no evidence for
7
8 associations between the minor A allele (or conversely the common G allele) and
9
10 susceptibility to PB (OR=0.99, 95% CI 0.54-1.81, $P=0.97$) or to MB (OR=0.86, 95% CI 0.40-
11
12 1.83, $P=0.70$) leprosy when compared to healthy controls. This is supported by data (Table 2)
13
14 comparing all leprosy patients without reactions (PB+MB) with healthy controls (OR=0.94,
15
16 95% CI 0.57-1.55, $P=0.80$).

17
18
19
20
21
22 In previous studies specific down-regulation of TNF mRNA following administration of
23
24 the anti-inflammatory drugs thalidomide and pentoxifylline has been associated with
25
26 improved outcomes for reactional leprosy (Moraes et al., 2000). Since the minor A allele at
27
28 the *TNF* -308bp polymorphism had previously been associated with high TNF (Cardoso et al.,
29
30 2011; Louis et al., 1998), we next considered whether patient subgroups with or without
31
32 reactions differed in their association with alleles at rs1800629. Neither RR (OR=1.37, 95%
33
34 CI 0.79-2.38, $P=0.27$) nor ENL (OR=0.76, 95% 0.40-1.45, $P=0.42$) groups showed
35
36 statistically significant evidence for the A allele (or conversely the common G allele) as a risk
37
38 factor for disease compared to the control group. Although we did observe a difference in the
39
40 direction of the OR relative to the control group in RR (risk OR=1.37) compared to ENL
41
42 (protection OR=0.76) disease (Table 2), this was not statistically significant in a direct
43
44 comparison between these two clinical subgroups (data not shown).

54 55 *3.3. TNF mRNA expression by leprosy type and by genotype at the TNF-308 G/A bp SNP*

56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Given the previous reports of elevated TNF associated with the minor allele A at the *TNF* - 308bp polymorphism (Cardoso et al., 2011; Louis et al., 1998), and the suggestion in our genetic analysis for opposing effects of this allele for ENL leprosy (protective OR=0.76) compared to RR leprosy (increased risk OR=1.37) in our population, we next examined expression of TNF mRNA in total blood leukocytes in leprosy patients and controls. Elevated TNF mRNA in circulating leukocytes is observed in all leprosy patients compared to healthy controls (Fig. 1A; $P=0.03$). No significant differences were observed when all patients without reaction were compared with all patients with reaction (Fig. 1B), when PB was compared with MB in patients without reaction (Fig. 1C), or RR compared with ENL in the reaction group (Fig. 1D). Therefore, when looking for differences in TNF mRNA by *TNF* - 308bp genotype, we did so across all patient groups (Fig. 2). Contrary to previous findings, carriage of the A allele (GA heterozygote and AA homozygote individuals) by leprosy cases was associated with lower TNF mRNA ($P=0.003$) compared to the group of GG leprosy cases.

3.4. Serum TNF levels by leprosy type and by genotype at *TNF*-308 A/G bp SNP

To complement our data on TNF expression at the mRNA level, we looked at circulating TNF in the sera of untreated leprosy cases and controls (Fig. 3). Although higher median levels of TNF were observed in all leprosy patients compared to controls (Fig. 3A), this was not statistically significant. However, within the leprosy patient group, significantly higher circulating TNF levels were observed when all patients with reaction (RR+ENL) were compared with all patients without reaction (PB+MB) (Fig. 1B; $P=0.010$), with borderline significance for higher serum TNF in MB compared to PB without reaction (Fig. 1C; $P=0.058$). No significant difference was observed when comparing RR with ENL in the reaction group (Fig. 1D). When we looked for differences in circulating TNF levels in all

1 untreated leprosy patients by *TNF* -308bp genotype (Fig. 4), we observed a downward trend
2 in median levels of circulating TNF in GG compared to GA compared to AA genotypes
3
4 reminiscent of findings at the mRNA level, but these did not achieve statistical significance.
5
6
7
8
9

10 **4. Discussion**

11
12
13
14
15 In our study population we find no evidence for either the common G allele or the minor A
16 allele at the *TNF* -308bp polymorphism as genetic risk factors for leprosy *per se* or any
17 clinical subtypes of leprosy (PB or MB without reaction; type I RR or type II ENL leprosy
18 reactions) when compared to endemic healthy controls. However, there was a suggestion for
19 opposing effects of allele A as a risk factor for RR reactions (OR=1.37) while being
20 protective for ENL disease (OR=0.76), which may achieve statistical significance in a larger
21 study. Of further interest in relation to this finding, we found that the minor A allele is
22 associated with low levels of TNF mRNA in peripheral blood total leukocytes of leprosy
23 patients, with a similar downward trend in median levels of circulating TNF by genotype
24 (GG>GA>AA).
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 For several reasons our results were unexpected. Firstly, all previous studies in Brazil have
41 shown association between the common G allele at the *TNF* -308bp polymorphism and
42 susceptibility to leprosy *per se* (Cardoso et al., 2011; Franceschi et al., 2009; Santos et al.,
43 2000; Santos et al., 2002; Shaw et al., 2001), whereas here we show no association between
44 either allele and risk of all forms of leprosy in our population relative to healthy endemic
45 controls. We do note, however, that each of the 4 independent studies contributing to the
46 analysis undertaken by Cardoso and colleagues (Cardoso et al., 2011) did not themselves
47 provide significant evidence for allelic association between the rs1800629 and leprosy, but
48 rather the power of a pooled meta-analysis was required. Hence, our failure to demonstrate an
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 association may simply reflect low statistical power in our study. Secondly, contrary to our
2 findings, a number of previous studies that have looked for evidence that the -308bp
3 polymorphism is functional have found that the minor A allele drives higher expression of
4 TNF in reporter gene systems (Braun et al., 1996; Karimi et al., 2009; Wilson et al., 1997; Wu
5 and McClain, 1997) or is associated with higher induced (e.g. lipopolysaccharide or *M. leprae*
6 antigen) levels of TNF in whole blood or peripheral leukocytes (Cardoso et al., 2011; Louis et
7 al., 1998).

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17 In relation to the former it is of interest that, contrary to previous studies in Brazil (Cardoso
18 et al., 2011; Franceschi et al., 2009; Santos et al., 2000; Santos et al., 2002; Shaw et al.,
19 2001), studies in Eastern India (Roy et al., 1997) and Thailand (Vejbaesya et al., 2007)
20 showed that the minor A allele was the risk factor at least for MB leprosy, while in Malawi
21 (Cardoso et al., 2011; Fitness et al., 2004) the trend was also in this direction for leprosy *per*
22 *se* and PB leprosy. One possibility for differences in associations between the G versus the A
23 allele and leprosy in different populations could relate to the proportion of patients with
24 reactions in the different leprosy *per se* datasets. Whilst there is a suggestion from our study
25 that this might also be influenced by the balance between patients with different types of
26 reaction disease, none of the previous studies has adequately addressed the contribution of
27 reaction leprosy to their cohort. Clearly larger studies with more accurate clinical
28 phenotyping of leprosy subgroups will be required to determine the potential role of the TNF
29 -308bp rs1800629 polymorphism as a genetic risk factor for leprosy, particularly in relation to
30 its influence on the different clinical forms of leprosy reaction and response to anti-TNF
31 therapies.

32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54 In attempting to understand our failure to find genetic associations between rs1800629 and
55 leprosy phenotypes in our population, we also looked at the relationship between genotype
56 and TNF expression in RNA from whole blood and TNF in serum. Consistent with previous
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 studies (Chaitanya et al., 2013; Madan et al., 2011) we observed higher TNF levels in serum
2 of patients with reactions compared with those without reactions. We did not, however,
3
4 observe statistically significant difference in serum TNF levels in ENL compared to RR
5
6 disease. Given the previous suggestions that the A allele was associated with high TNF
7
8 (Braun et al., 1996; Cardoso et al., 2011; Karimi et al., 2009; Kroeger et al., 1997; Louis et
9
10 al., 1998; Wilson et al., 1997; Wu and McClain, 1997), we might have expected to see this
11
12 allele associated more strongly with ENL leprosy reactions, for which anti-TNF treatment is
13
14 the current therapy of choice. In fact, the A allele erred on the side of being protective in the
15
16 ENL reaction group, perhaps consistent with our observation in this study that the A allele is
17
18 associated with low TNF mRNA expression. Conversely, the G allele associated with high
19
20 TNF mRNA would confer genetic risk for ENL disease. Overall, our observation that the A
21
22 allele is associated with low TNF expression at the mRNA level across leprosy patients
23
24 provides some potential for intrigue. Does the -308bp variant act differently to regulate
25
26 mRNA expression when in its genomic context, compared to when isolated in reporter gene
27
28 constructs? Is the difference between our findings and those of previous studies an effect of
29
30 the leprosy infection itself? Could epigenetic mechanisms be at play to alter the role of the -
31
32 308bp variant, and others in close linkage disequilibrium with it, in regulating TNF
33
34 expression during leprosy infection?
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 In summary, the relationship between TNF and clinical phenotypes in leprosy is complex.
45
46 On the one hand, there is a requirement for some level of TNF production to maintain
47
48 antimicrobial activity against the leprosy bacillus, but too much proinflammatory TNF can be
49
50 deleterious particularly in relation to clinical phenotypes of leprosy reaction. Whilst anti-TNF
51
52 therapy is the treatment of choice for ENL disease, we know that reduction in TNF levels is
53
54 also associated with treatment of disease with the corticosteroid prednisolone (Moraes et al.,
55
56 2000; Raju et al., 2014). Is this just a collateral effect of corticosteroid treatment, or is TNF
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

playing a significant role in immunopathology of both types of reaction disease? Clearly further work is required to dissect out what functional genetic variants are involved in regulating TNF during leprosy infection, and whether epigenetic mechanisms might also lead to changes in the functional roles of variants in the promoter regions of the *TNF* gene. Overall, our findings add to an as yet confused understanding of TNF as a determinant of the immunopathology associated with leprosy reactions in Brazil.

Author contributions

JO, JR, NS, MB carried out the preparation of the samples, genotyping, expression studies and serum analysis in the lab. LC supervised the laboratory work, collection of clinical data and samples, and managed the project. TV, TM, PM participated in clinical phenotyping and sample collection. JO, LC, SJ and JB undertook the statistical analyses, interpretation of the data, and preparation of the draft manuscript. JB finalized preparation of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We acknowledge the support of NIH Grant AI 30639. JO was also supported by NIH/FIC 1 D43 TW007127-01 in Brazil.

Legends to figures

Fig. 1. Relative TNF expression in mRNA prepared from peripheral blood leukocytes from untreated leprosy cases and healthy endemic controls (HEC) from Bahia, Brazil. A: compares leprosy *per se* to HEC; B: compares patients without reactions (PB+MB) to those with reactions (RR+ENL); C: compares PB and MB patients; and D: compares RR with ENL patients. Dots indicate individual values; bars represent the group median values. *P*-values are shown for nonparametric Mann-Whitney tests.

Fig. 2. TNF mRNA expression by TNF rs1800629 (-308 A/G) genotype across all leprosy patients. Relative amounts of TNF mRNA are expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$, as described in the methods. *P*-values are shown for nonparametric Mann-Whitney tests.

Fig. 3. Serum TNF levels measured in untreated leprosy cases and healthy endemic controls (HEC) from Bahia, Brazil. A: compares leprosy *per se* to HEC; B: compares patients without reactions (PB+MB) to those with reactions (RR+ENL); C: compares PB and MB patients; and D: compares RR with ENL patients. Serum TNF was measured by ELISA, as described in the methods. Data are plotted as \log_{10} serum TNF (pg/ml), dots indicate individual values, bars represent the group median values. *P*-values are shown for nonparametric Mann-Whitney tests.

Fig. 4. Serum TNF levels by TNF rs1800629 (-308 G/A) genotype in untreated leprosy patients. The data are for leprosy *per se*, i.e. including PB (N=7), MB (N=4) without reactions, RR (N=16) and ENL (N=7) cases with reactions. Serum TNF was measured as pg/ml by ELISA, as described in the methods. Data are plotted as \log_{10} serum TNF (pg/ml), with individual and median (bars) measurements shown for each genotype. No significant differences between genotypes were observed using nonparametric Mann-Whitney tests.

References

- 1
2 Alter, A., Alcais, A., Abel, L., Schurr, E., 2008. Leprosy as a genetic model for susceptibility
3 to common infectious diseases. *Hum Genet* 123, 227-235.
- 4 Alter, A., Grant, A., Abel, L., Alcais, A., Schurr, E., 2011. Leprosy as a genetic disease.
5 *Mamm Genome* 22, 19-31.
- 6
7 Bayley, J.P., Ottenhoff, T.H., Verweij, C.L., 2004. Is there a future for TNF promoter
8 polymorphisms? *Genes Immun* 5, 315-329.
- 9
10 Blackwell, J.M., Jamieson, S.E., Burgner, D., 2009. HLA and infectious diseases. *Clin*
11 *Microbiol Rev* 22, 370-385.
- 12 Braun, N., Michel, U., Ernst, B.P., Metzner, R., Bitsch, A., Weber, F., Rieckmann, P., 1996.
13 Gene polymorphism at position -308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in
14 multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production.
15 *Neuroscience Lett* 215, 75-78.
- 16
17 Brinkman, B.M., Zuijdeest, D., Kaijzel, E.L., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., 1995.
18 Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in
19 TNF alpha gene regulation. *J Inflamm* 46, 32-41.
- 20
21 Cardoso, C.C., Pereira, A.C., Brito-de-Souza, V.N., Duraes, S.M., Ribeiro-Alves, M., Nery,
22 J.A., Francio, A.S., Vanderborght, P.R., Parelli, F.P., Alter, A., Salgado, J.L., Sampaio,
23 E.P., Santos, A.R., Oliveira, M.L., Sarno, E.N., Schurr, E., Mira, M.T., Pacheco, A.G.,
24 Moraes, M.O., 2011. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with
25 leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and
26 functional study. *J Infect Dis* 204, 1256-1263.
- 27
28 Cavalcanti, A.A., Lucena-Silva, N., Montarroyos, U.R., Albuquerque, P.M., 2012.
29 Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of
30 leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras*
31 *Med Trop* 45, 616-619.
- 32
33 Chaitanya, V.S., Lavania, M., Nigam, A., Turankar, R.P., Singh, I., Horo, I., Sengupta, U.,
34 Jadhav, R.S., 2013. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal)
35 reactions of leprosy. *Immunol Lett* 156, 159-167.
- 36
37 Fine, P.E.M., 1996. Randomised controlled trial of single BCG, repeated BCG, or combined
38 BCG and killed *Mycobacterium leprae* vaccine for prevention of leprosy and tuberculosis
39 in Malawi. *The Lancet* 348, 17-24.
- 40
41 Fitness, J., Floyd, S., Warndorff, D.K., Sichali, L., Mwaungulu, L., Crampin, A.C., Fine,
42 P.E.M., Hill, A.V.S., 2004. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in
43 the Karonga District of Northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg* 71, 330-340.
- 44
45 Franceschi, D.S., Mazini, P.S., Rudnick, C.C., Sell, A.M., Tsuneto, L.T., Ribas, M.L.,
46 Peixoto, P.R., Visentainer, J.E., 2009. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in
47 the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis* 13, 493-498.
- 48
49 Hagge, D.A., Saunders, B.M., Ebenezer, G.J., Ray, N.A., Marks, V.T., Britton, W.J.,
50 Krahenbuhl, J.L., Adams, L.B., 2009. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but
51 independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy.
52 *Am J Pathol* 174, 1379-1389.
- 53
54 IBGE, 2010. Censo Demografico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatistica ISSN
55 0104-3145.
- 56
57 Karimi, M., Goldie, L.C., Cruickshank, M.N., Moses, E.K., Abraham, L.J., 2009. A critical
58 assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a
59 reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter
60 system. *Eur J Hum Genet* 17, 1454-1462.
- 61
62
63
64
65

- 1 Kroeger, K.M., Carville, K.S., Abraham, L.J., 1997. The -308 tumor necrosis factor-alpha
2 promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 34, 391-399.
- 3 Lluch, P., Urruticoechea, A., Lluch, J., Moll, M.C., Matos, M., Benet, J.M., Ene, L., Canete,
4 J.D., 2012. Development of leprosy in a patient with rheumatoid arthritis during treatment
5 with etanercept: a case report. *Semin Arthritis Rheum* 42, 127-130.
- 6 Lockwood, D.N., Suneetha, L., Sagili, K.D., Chaduvula, M.V., Mohammed, I., van Brakel,
7 W., Smith, W.C., Nicholls, P., Suneetha, S., 2011. Cytokine and protein markers of leprosy
8 reactions in skin and nerves: baseline results for the North Indian INFIR cohort. *PLoS*
9 *Negl Trop Dis* 5, e1327.
- 10 Louis, E., Franchimont, D., Piron, A., Gevaert, Y., Schaaf-Lafontaine, N., Roland, S.,
11 Mahieu, P., Malaise, M., De Groote, D., Louis, R., Belaiche, J., 1998. Tumour necrosis
12 factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide
13 (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 113, 401-
14 406.
- 15 Madan, N.K., Agarwal, K., Chander, R., 2011. Serum cytokine profile in leprosy and its
16 correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev* 82, 371-382.
- 17 Mira, M.T., Alcasis, A., Nguyen, V.T., Moraes, M.O., Di Flumeri, C., Vu, H.T., Mai, C.P.,
18 Nguyen, T.H., Nguyen, N.B., Pham, X.K., Sarno, E.N., Alter, A., Montpetit, A., Moraes,
19 M.E., Moraes, J.R., Dore, C., Gallant, C.J., Lepage, P., Verner, A., Van De Vosse, E.,
20 Hudson, T.J., Abel, L., Schurr, E., 2004. Susceptibility to leprosy is associated with
21 PARK2 and PACRG. *Nature* 427, 636-640.
- 22 Mira, M.T., Alcasis, A., Van Thuc, N., Thai, V.H., Huong, N.T., Ba, N.N., Verner, A.,
23 Hudson, T.J., Abel, L., Schurr, E., 2003. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to
24 leprosy in a Vietnamese population. *Nat Genet* 33, 412-415.
- 25 Moraes, M.O., Duppre, N.C., Suffys, P.N., Santos, A.R., Almeida, A.S., Nery, J.A., Sampaio,
26 E.P., Sarno, E.N., 2001. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is
27 associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline
28 tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics* 53, 45-47.
- 29 Moraes, M.O., Sarno, E.N., Teles, R.M., Almeida, A.S., Saraiva, B.C., Nery, J.A., Sampaio,
30 E.P., 2000. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and
31 improve the clinical condition of reactional leprosy patients. *J Invest Dermatol* 115, 935-
32 941.
- 33 Qidwai, T., Khan, F., 2011. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease
34 prevalence. *Scand J Immunol* 74, 522-547.
- 35 Raju, R., Suneetha, S., Jadhav, R.S., Chaduvula, M., Atkinson, S., Jain, S., Visser, L.H., Das,
36 L., Panhalkar, R., Shinde, V., Reddy, P.P., Barkataki, P., Lockwood, D., Van Brakel,
37 W.H., Suneetha, L.M., 2014. Serological responses to prednisolone treatment in leprosy
38 reactions: study of TNF-alpha, antibodies to phenolic glycolipid-1, lipoarabinomanan,
39 ceramide and S100-B. *Lipids Health Dis* 13, 119.
- 40 Roy, S., McGuire, W., Mascie-Taylor, C.G.N., Saha, B., Hazra, S.K., Hill, A.V.S.,
41 Kwiatkowski, D., 1997. TNF promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous
42 leprosy. *J Infect Dis* 176, 530-532.
- 43 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
44 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 45 Santos, A.R., Almeida, A.S., Suffys, P.N., Moraes, M.O., Filho, V.F., Mattos, H.J., Nery,
46 J.A., Cabello, P.H., Sampaio, E.P., Sarno, E.N., 2000. Tumor necrosis factor promoter
47 polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in
48 a pilot study in Brazilian patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 68, 325-327.
- 49 Santos, A.R., Suffys, P.N., Vanderborght, P.R., Moraes, M.O., Vieira, L.M., Cabello, P.H.,
50 Bakker, A.M., Matos, H.J., Huizinga, T.W., Ottenhoff, T.H., Sampaio, E.P., Sarno, E.N.,
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2002. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* 186, 1687-1691.
- Santos, H.C., Horimoto, A.V., Tarazona-Santos, E., Rodrigues-Soares, F., Barreto, M.L., Horta, B.L., Lima-Costa, M.F., Gouveia, M.H., Machado, M., Silva, T.M., Sanches, J.M., Esteban, N., Magalhaes, W.C., Rodrigues, M.R., Kehdy, F.S., Pereira, A.C., 2015. A minimum set of ancestry informative markers for determining admixture proportions in a mixed American population: the Brazilian set. *Eur J Hum Genet* doi: 10.1038/ejhg.2015.187.
- Sapkota, B.R., Macdonald, M., Berrington, W.R., Misch, E.A., Ranjit, C., Siddiqui, M.R., Kaplan, G., Hawn, T.R., 2010. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum Immunol* 71, 992-998.
- Settin, A., Nassar, S., Abdel-Latif, A., Elbaz, R., El-Mongy, S., Hassan, A., Hassan, A., 2007. Association of cytokine gene polymorphism with susceptibility and clinical types of leprosy. *Int J Health Sci* 1, 25-33.
- Shaw, M.A., Donaldson, I.J., Collins, A., Peacock, C.S., Lins-Lainson, Z., Shaw, J.J., Ramos, F., Silveira, F., Blackwell, J.M., 2001. Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes. *Genes Immun* 2, 196-204.
- Stewart, S.G., Braun, C.J., Ng, S.L., Polomska, M.E., Karimi, M., Abraham, L.J., 2010. New thalidomide analogues derived through Sonogashira or Suzuki reactions and their TNF expression inhibition profiles. *Bioorg Med Chem* 18, 650-662.
- Stuber, F., Udalova, I.A., Book, M., Drutskaya, L.N., Kuprash, D.V., Turetskaya, R.L., Schade, F.U., Nedospasov, S.A., 1995. -308 tumor necrosis factor (TNF) polymorphism is not associated with survival in severe sepsis and is unrelated to lipopolysaccharide inducibility of the human TNF promoter. *J Inflamm* 46, 42-50.
- Tarique, M., Naqvi, R.A., Santosh, K.V., Kamal, V.K., Khanna, N., Rao, D.N., 2015. Association of TNF-alpha-(308(GG)), IL-10(-819(TT)), IL-10(-1082(GG)) and IL-1R1(+1970(CC)) genotypes with the susceptibility and progression of leprosy in North Indian population. *Cytokine* 73, 61-65.
- Vejbaesya, S., Mahaisavariya, P., Luangtrakool, P., Sermduangprateep, C., 2007. TNF alpha and NRAMP1 polymorphisms in leprosy. *J Med Assoc Thailand = Chotmaihet thangphaet* 90, 1188-1192.
- WHO, 2002. Leprosy. Global situation. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 77, 1-8.
- WHO, 2013. Global leprosy: update on the 2012 situation. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 88, 365-379.
- Wilson, A.G., Symons, J.A., McDowell, T.L., McDevitt, H.O., Duff, G.W., 1997. Effects of a polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc NY Acad Sci USA* 94, 3195-3199.
- Wu, W.S., McClain, K.L., 1997. DNA polymorphisms and mutations of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH). *J Interferon Cytokine Res* 17, 631-635.
- Zhang, F., Liu, H., Chen, S., Low, H., Sun, L., Cui, Y., Chu, T., Li, Y., Fu, X., Yu, Y., Yu, G., Shi, B., Tian, H., Liu, D., Yu, X., Li, J., Lu, N., Bao, F., Yuan, C., Liu, J., Zhang, L., Sun, Y., Chen, M., Yang, Q., Yang, H., Yang, R., Wang, Q., Zuo, F., Zhang, H., Khor, C.C., Hibberd, M.L., Yang, S., Zhang, X., 2011. Identification of two new loci at IL23R and RAB32 that influence susceptibility to leprosy. *Nat Genet* 43, 1247-1251.

Zhang, F.R., Huang, W., Chen, S.M., Sun, L.D., Liu, H., Li, Y., Cui, Y., Yan, X.X., Yang, H.T., Yang, R.D., Chu, T.S., Zhang, C., Zhang, L., Han, J.W., Yu, G.Q., Quan, C., Yu, Y.X., Zhang, Z., Shi, B.Q., Zhang, L.H., Cheng, H., Wang, C.Y., Lin, Y., Zheng, H.F., Fu, X.A., Zuo, X.B., Wang, Q., Long, H., Sun, Y.P., Cheng, Y.L., Tian, H.Q., Zhou, F.S., Liu, H.X., Lu, W.S., He, S.M., Du, W.L., Shen, M., Jin, Q.Y., Wang, Y., Low, H.Q., Erwin, T., Yang, N.H., Li, J.Y., Zhao, X., Jiao, Y.L., Mao, L.G., Yin, G., Jiang, Z.X., Wang, X.D., Yu, J.P., Hu, Z.H., Gong, C.H., Liu, Y.Q., Liu, R.Y., Wang, D.M., Wei, D., Liu, J.X., Cao, W.K., Cao, H.Z., Li, Y.P., Yan, W.G., Wei, S.Y., Wang, K.J., Hibberd, M.L., Yang, S., Zhang, X.J., Liu, J.J., 2009. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* 361, 2609-2618.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1

Characteristics of the study samples.

Sample size	Without Reactions		With Reactions			Unclassified leprosy	Healthy Blood Bank Controls
	Leprosy <i>per se</i>	PB	MB	RR	ENL		
Males	191	25	34	38	59	11	233
Females	135	47	13	31	19	10	98
Total	326	72	47	69	78	21	331
Age at collection							
Males							
Mean±SD	42.1±12.9	39.4±15.6	44.3±11.6	45.0±14.9	40.6±11.6	37.2±9.3	35.5±10.4
Range	18-66	18-65	19-64	21-65	21-66	26-58	16-67
Females							
Mean±SD	43.1±13.1	46.1±13.4	44.2±11.4	44.1±13.5	34.3±11.3	38.2±14.0	33.4±9.9
Range	17-68	18-65	26-65	22-68	17-53	18-65	17-65
Total							
Mean±SD	42.5±13.0	43.8±14.4	44.3±11.4	44.6±14.2	39.0±11.7	37.7±11.5	34.8±10.4
Range	17-68	18-65	19-65	21-68	17-66	18-65	16-67

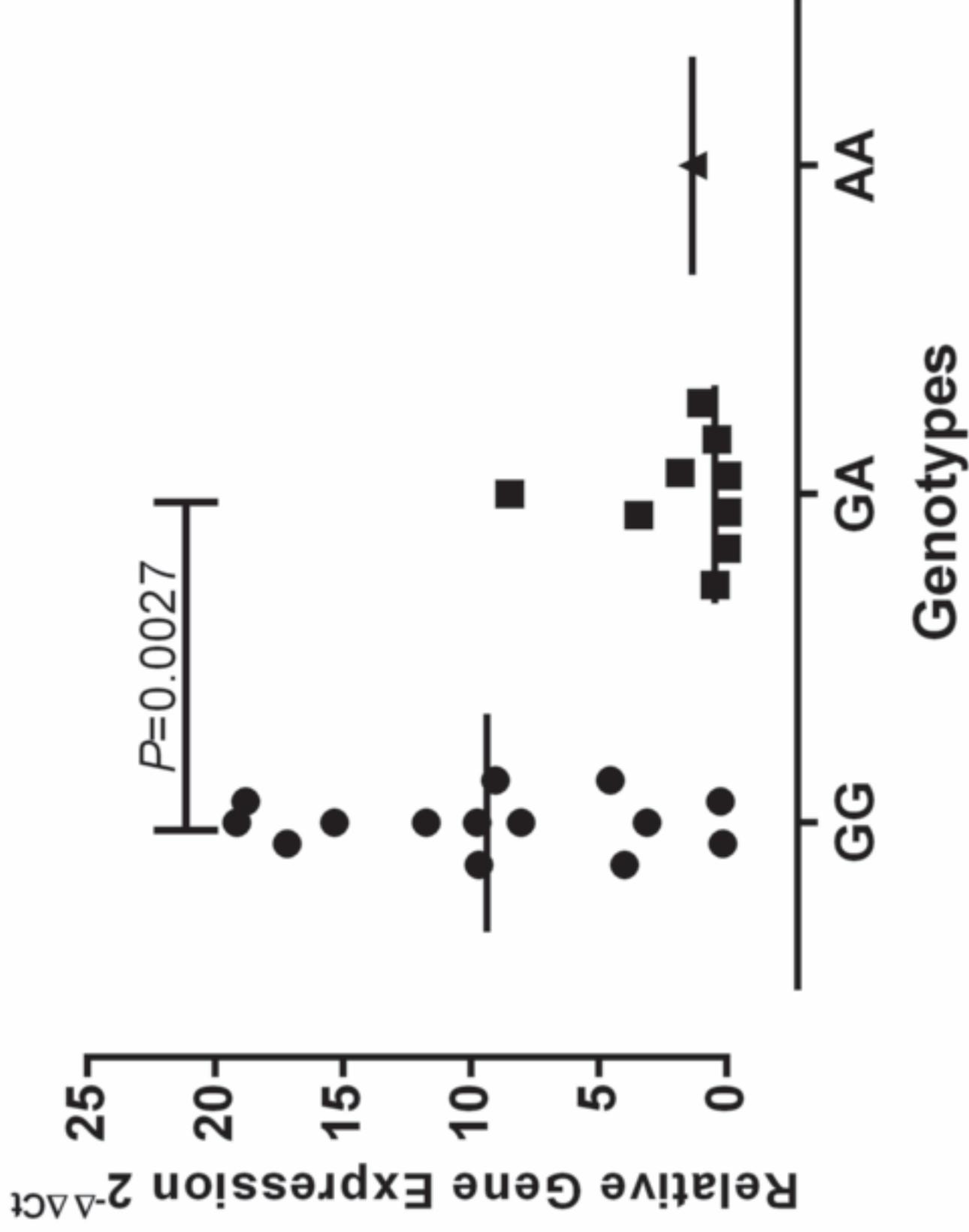
PB = paucibacillary; MB = multibacillary; RR = reversal reactions; ENL = erythema nodosum leprosum; SD = standard deviation

Table 2

Genotype distributions, minor allele frequencies (MAF), and tests for allelic association between clinical forms of leprosy and SNP rs1800629 (*TNF*-308bp). Logistic regression allelic association tests under an additive model were used to compare each case group relative to healthy blood bank controls (=reference). Results are given as odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) and associated *P*-values for disease associated with the minor A allele relative to the common G allele.

Leprosy* <i>per se</i>	← Without Reactions →			All	← With Reactions →			Healthy Blood Bank Controls
	PB	MB	without reactions	RR	ENL	ENL		
Genotype distribution (%)								
GG	58 (81)	40 (85)	98 (82)	52 (75)	66 (85)	270 (82)		
GA	14 (19)	6 (13)	20 (17)	16 (23)	12 (15)	57 (17)		
AA	0 (0)	1 (2)	1 (1)	1 (2)	0 (0)	4 (1)		
Total N	72	47	119	69	78	331		
MAF	0.097	0.085	0.092	0.130	0.077	0.098		
Allelic association tests:								
Unadjusted								
OR	0.99	0.86	0.94	1.37	0.76	Reference		
95% CI	0.54-1.81	0.40-1.83	0.57-1.55	0.79-2.38	0.40-1.45			
P-value	0.97	0.70	0.80	0.27	0.42			

* Includes leprosy patients (see Table 1) who have been diagnosed successively with RR and ENL disease, and unclassified leprosy patients for whom follow-up to determine leprosy sub-type or reactional status was incomplete.



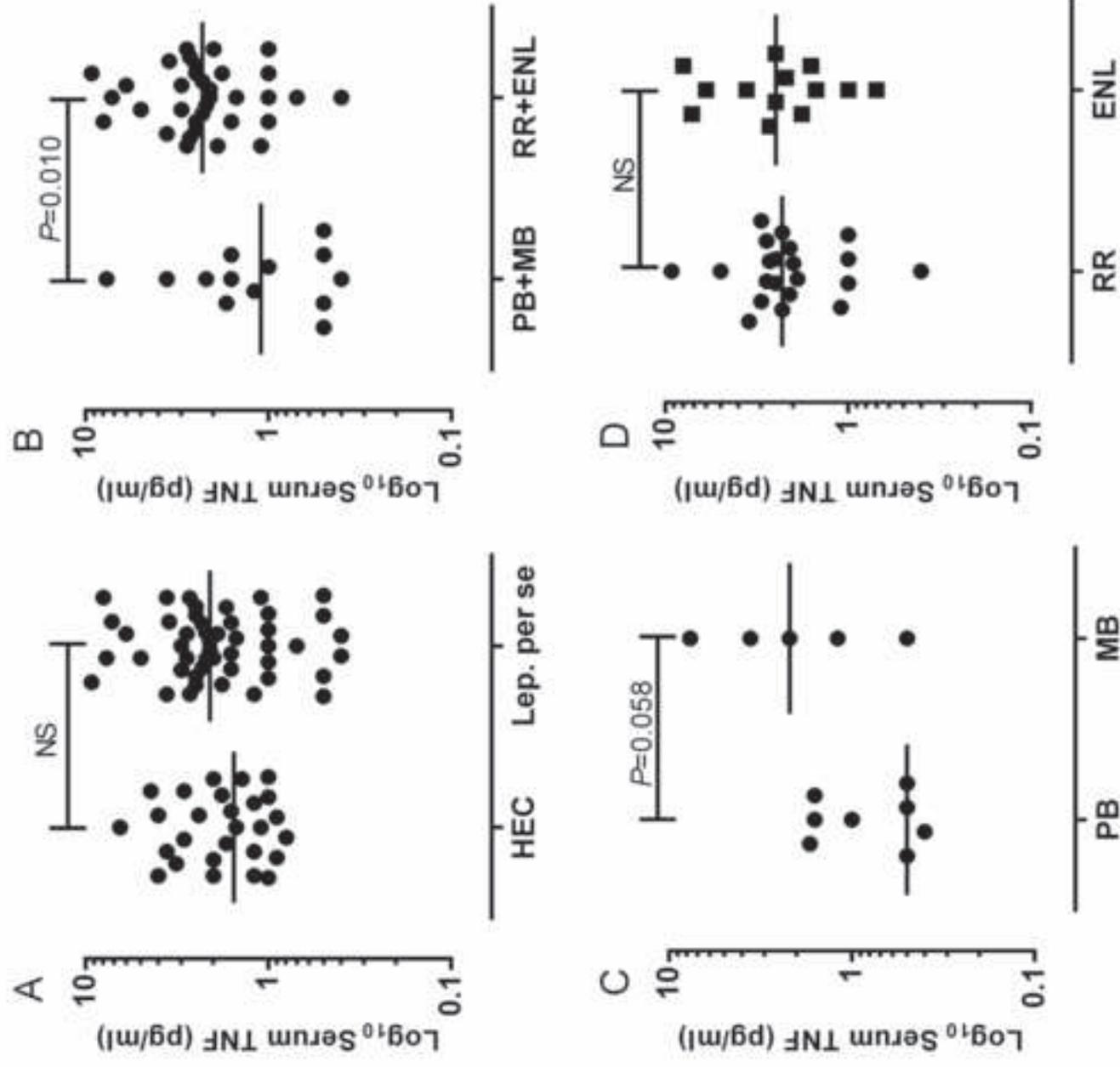
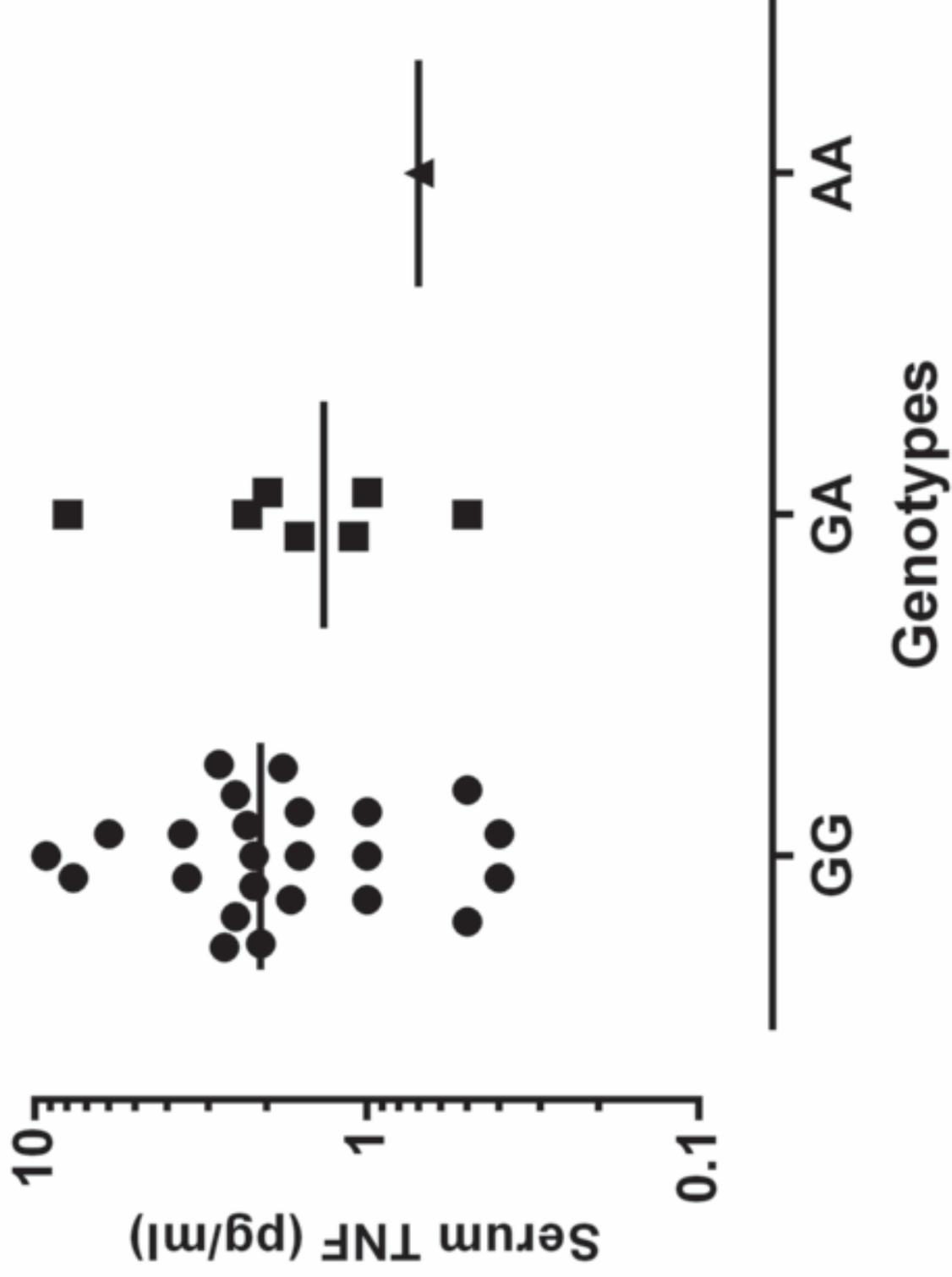


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)



XIV. APÊNDICE

Anexo I

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 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 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 e genética 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 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 da Maternidade Climério de Oliveira, na pessoa do Dr. Antônio Barata, no endereço Rua Padre Feijó, 240 – Canela, telefone (071) 3203-2740.

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: _____

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 sadios.

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 eqüitativa 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
<u>Adequação às Normas e Diretrizes</u>	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