

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

EYLEEN NABYLA ALVARENGA NIITSUMA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMO DO GENE TLR1 NA
SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE *PER SE*:
UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

Belo Horizonte

2016

EYLEEN NABYLA ALVARENGA NIITSUMA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMO DO GENE TLR1 NA
SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE *PER SE*:
UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Área de concentração: Enfermagem e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana.

Belo Horizonte
Escola de Enfermagem da UFMG
2016

N691a Niitsuma, Eyleen Nabyla Alvarenga.
Análise da influência de polimorfismo do gene TLR1 na suscetibilidade à hanseníase per se [manuscrito]: um estudo de caso-controlado. / Eyleen Nabyla Alvarenga Niitsuma. - - Belo Horizonte: 2016. 93f.: il.
Orientador: Francisco Carlos Félix Lana.
Área de concentração: Saúde e Enfermagem.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Hanseníase/epidemiologia. 2. Hanseníase/imunologia. 3. Polimorfismo Genético. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Lana, Francisco Carlos Félix. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. III. Título.

NLM: WC 335

ATA DE NÚMERO 487 (QUATROCENTOS E OITENTA E SETE) DA SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA DISSERTAÇÃO APRESENTADA PELA CANDIDATA EYLEEN NABYLA ALVARENGA NIITSUMA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM ENFERMAGEM.

Aos 26 (vinte e seis) dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 09:00 horas, realizou-se no Anfiteatro Roseni da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, a sessão pública para apresentação e defesa da dissertação "ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMO DO GENE TLR1 NA SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE PER SE: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE", da aluna *Eyleen Nabyla Alvarenga Niitsuma*, candidata ao título de "Mestra em Enfermagem", linha de pesquisa "Promoção da Saúde, Prevenção e Controle de Agravos". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: Francisco Carlos Félix Lana (orientador), Gabriel da Rocha Fernandes e Evaldo Pinheiro Amaral, sob a presidência do primeiro. Abrindo a sessão, o Senhor Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

APROVADA;

APROVADA COM AS MODIFICAÇÕES CONTIDAS NA FOLHA EM ANEXO;

REPROVADA.

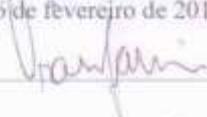
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Senhor Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Andréia Nogueira Delfino, Secretária do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana
Orientador (Esc.Enf/UFMG)

Prof. Dr. Gabriel da Rocha Fernandes
(Fiocruz/René Rachou)

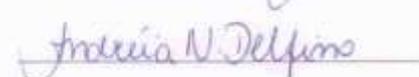
Prof. Dr. Evaldo Pinheiro Amaral
(Izabela Hendrix)

Andréia Nogueira Delfino
Secretária do Colegiado de Pós-Graduação

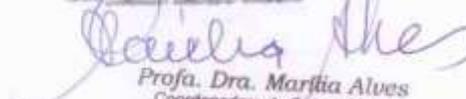








HOMOLOGADO em reunião do CPG
Em 07/03/2016


Prof. Dra. Marília Alves
Coordenadora do Colegiado de
Pós-Graduação em Enfermagem
Escola de Enfermagem/UFMG

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de vida, inspiração, coragem, perseverança e força para superar as dificuldades.

A minha mãe Eldaronice, meu exemplo de vida, e meu esposo Yutaka por serem meus maiores incentivadores.

A minha grande família, aos Queiroz, aos Alvarengas e aos Niitsumas, por todo o carinho, acolhida e apoio nesta jornada.

Ao Professor Francisco pelas oportunidades, orientação, amizade, confiança e por acreditar que eu seria capaz.

Ao Instituto Federal de Educação do Norte de Minas Gerais (IFNMG) pelo auxílio que permitiu que eu iniciasse e finalizasse esta trajetória e superasse os 722 quilômetros de distância que me separavam de Belo Horizonte.

Ao Professor Guilherme Oliveira que mesmo distante me auxiliou no que foi necessário.

Ao Professor Gabriel da Rocha Fernandes pelo apoio e disponibilidade em orientar e contribuir.

A Ana Paula e Evaldo que foram sempre solícitos em me ajudar, contribuindo com suas experiências e conhecimentos.

À Rayssa, Cristal, Isabella e Edson por dividir comigo o trabalho, as histórias, as experiências, os bons e maus momentos das coletas em campo.

Às bolsistas de iniciação científica Isabella e Alice pela disposição em compartilhar o trabalho, sendo sempre agradáveis companhias.

À Equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do CPqRR/FIOCRUZ, em especial ao Dr. Rodrigo Oliveira, ao Dr. Carlos Eduardo, a Clari Gandra e Luciana Lisboa, por todo o apoio que possibilitou o preparo das amostras.

À Equipe do Laboratório de Virologia – ICB/UFMG pela acolhida, em especial ao Professor Flávio Guimarães da Fonseca.

À Equipe do Laboratório de Parasitologia – ICB/UFMG, em especial ao Professor Ricardo Toshio Fujiwara, à Michelle, Mariana e Luiza por compreenderem o valor de novas parcerias e por todo o apoio que precisei para realizar a genotipagem.

À equipe da Coordenadoria Estadual de Dermatologia Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais por dar suporte à pesquisa em hanseníase, disponibilizando dados que foram fundamentais para este estudo.

Aos meus professores do Mestrado em Enfermagem que me direcionaram o caminho para o aprendizado.

Aos funcionários da Escola de Enfermagem, em especial ao André e ao Helvécio, pela
companhia sempre agradável no trajeto das coletas.

Ao Ministério da Saúde e FAPEMIG por disponibilizarem recursos financeiros para a
realização deste estudo

Por último, mas não menos importante, pelo contrário...

À Microrregião de Almenara e seus filhos, terra que a cada dia aprendo a amar e valorizar.

...se a imunologia é a raiz da árvore, seu fruto é o conhecimento da infectividade, prognóstico e manejo do paciente. Isto é tudo o que poderíamos esperar, mas permanece importante não confundir o resultado final com a base primária, que é a imunidade.

Ridley & Jopling (tradução nossa)

RESUMO

Desde a década de 1960, há evidências da influência da arquitetura genética individual na suscetibilidade à hanseníase. Polimorfismos em genes que codificam citocinas e receptores envolvidos na resposta imune, como o receptor TLR1, capaz de reconhecer o patógeno, podem associar-se ao risco à doença. O objetivo deste trabalho foi analisar a influência do polimorfismo G743A no gene TLR1 com a suscetibilidade à hanseníase em um estudo caso-controle na Microrregião de Almenara, Minas Gerais. O cenário envolveu os municípios de Almenara, Felizburgo, Jacinto, Jordânia, Palmópolis e Rubim. A amostra de casos foi selecionada por consulta aos indivíduos diagnosticados com hanseníase registrados no SINAN entre 2001 e 2014. Controles foram selecionados a partir dos contatos domiciliares desses casos, incluídos os que residiam nos municípios selecionados, com idade igual ou superior a sete anos e aceite na coleta de material biológico. Contatos com histórico ou suspeita de hanseníase e parentesco consanguíneo com casos foram excluídos. A coleta de dados envolveu visitas domiciliares com aplicação de questionário estruturado e coleta de sangue, realizadas em 2011 e 2014. A extração do DNA utilizou o *kit Qiagen Flexigene* e a genotipagem realizada por PCR em tempo real. O *software* Epi Info foi utilizado para a construção do banco de dados, sendo as análises feitas nos *softwares* SPSS e R com o pacote estatístico *SNPassoc*. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Minas Gerais. A amostra, composta por 234 casos e 233 controles, totalizou 467 indivíduos, com a maioria de adultos do sexo feminino. Apenas entre os casos predominaram indivíduos do sexo masculino e uma maior proporção de jovens. Nas variáveis epidemiológicas, houve um número expressivo de indivíduos vivendo em domicílios de até quatro cômodos e com histórico de helmintoses, principalmente entre os casos da doença. A forma multibacilar foi frequente nos casos, bem como as incapacidades físicas, os episódios reacionais e a ausência de cicatriz vacinal de BCG. Entre controles, muitos conviveram com mais de um caso de hanseníase em ambiente intradomiciliar e por longos períodos. Na análise da associação do polimorfismo G743A com a hanseníase, foi observada maior frequência do alelo 743A entre os casos da doença. Porém, a análise dos genótipos não encontrou resultado estatisticamente significativo do 743AA com a suscetibilidade à hanseníase *per se*. Entretanto, o genótipo heterozigoto 743GA esteve associado à proteção à hanseníase em mulheres, sugerindo que o polimorfismo G743A é um fator de proteção gênero-específico. Novos estudos de epidemiologia genética, utilizando outros genes envolvidos na resposta imune e um maior número de polimorfismos, são necessários para que se possa esclarecer o perfil genético de suscetibilidade à hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase/epidemiologia; Hanseníase/imunologia; Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Since the 60s, there is evidence of the genetic architecture influence in susceptibility to leprosy. Polymorphisms in genes encoding cytokines and receptors involved in immune response, such as TLR1 receptor that can recognize the pathogen, may be associated with the risk of disease. The objective of this study was to analyze the influence of the G743A polymorphism in the TLR1 gene with susceptibility to leprosy in a case-control study in the micro-region of Almenara, Minas Gerais. The scenario involved the cities of Almenara, Felisburgo, Jacinto, Jordânia, Palmópolis and Rubim. The case sample was selected in consultation with individuals diagnosed with leprosy registered in SINAN between 2001 and 2014. Controls were selected from the household contacts of these cases. Including those who lived in the selected cities, age greater than or equal seven years old and who accepted the biological material collection. Contacts with a history or suspected leprosy and consanguinity with cases were excluded. Data collection involved home visits with a structured questionnaire and blood collection, carried out in 2011 and 2014. The DNA extraction used the Qiagen kit Flexigene and genotyping performed by Real-Time PCR. The Epi Info software was used to build the database and the analysis done in SPSS software and R with the SNPAssoc statistical package. This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais. A sample of 234 cases and 233 controls amounted to 467 individuals, most adult females. Only between cases predominated males and a higher proportion of young people. In epidemiological variables, there was a significant number of individuals living in houses with up to 4 rooms and helminths history, especially among the cases. The multibacillary form was common in the case group as well as physical disabilities, leprosy reactions and the absence of BCG vaccination scar. Among controls, many lived with more than one case of leprosy in intradomiciliary environments and for long periods. The association analysis of G743A polymorphism with leprosy revealed higher frequency of the 743A allele between cases, but the genotypes analysis did not found statistically significant result of 743AA with susceptibility to leprosy *per se*, however, the heterozygous genotype 743GA was associated with protection in women, suggesting that the G743A polymorphism is a gender-specific protection factor for leprosy. New genetic epidemiology studies using other genes involved in the immune response and a greater number of polymorphisms are needed so that one can clarify the genetic profile of susceptibility to leprosy.

Keywords: Leprosy/epidemiology; Leprosy/immunology; Genetic polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Modelo da Suscetibilidade Genética à Hanseníase em dois estágios | 35 |
| Figura 2 | Receptores do tipo Toll e vias de sinalização mediadas pelo TLR | 37 |
| Figura 3 | Delineamento Caso-controle | 40 |
| Figura 4 | Exemplo de gráfico de discriminação alélica | 46 |
| Gráfico 1 | Razão de <i>odds</i> para hanseníase em contatos, por idade e sexo | 50 |
| Mapa 1 | Taxa de detecção de casos novos de hanseníase, dados reportados à Organização Mundial de Saúde em janeiro de 2014 | 27 |
| Mapa 2 | Análise de <i>cluster</i> da taxa de detecção geral da hanseníase no Brasil no triênio 2011-2013 | 29 |
| Mapa 3 | Mapa das Microrregiões de Minas Gerais com destaque para a Microrregião de Almenara | 39 |
| Quadro 1 | Critérios de seleção de Casos e Controles | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Análise descritiva das variáveis sociodemográficas | 48 |
| Tabela 2 | Análise descritiva das condições de moradia | 52 |
| Tabela 3 | Histórico de helmintoses | 53 |
| Tabela 4 | Histórico vacinal de BCG | 54 |
| Tabela 5 | Formas clínicas e baciloscopia | 55 |
| Tabela 6 | Incapacidades físicas e episódios reacionais | 58 |
| Tabela 7 | Características de convivência com casos da doença | 61 |
| Tabela 8 | Frequência alélica e genotípica na amostra estudada | 63 |
| Tabela 9 | Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> | 64 |
| Tabela 10 | Perfil alélico e genotípico em casos e controles | 65 |
| Tabela 11 | Frequência do alelo polimórfico do SNP G743A (rs4833095) | 66 |
| Tabela 12 | Análise da associação do SNP G743A estratificada por sexo | 66 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|-------------------------------------------------------------|
| ACS - | Agente comunitário de saúde |
| BB - | <i>Borderline-Borderline</i> |
| BCG - | Bacilo Calmette-Guérin |
| BL - | <i>Borderline-Lepromatoso</i> |
| BT - | <i>Borderline-Tuberculoide</i> |
| Capes - | Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior |
| CD8+ - | CD8 positiva |
| CD4+ - | CD4 positiva |
| COEP - | Comitê de Ética em Pesquisa |
| DAMP - | Padrão molecular associado a dano celular |
| FAPEMIG - | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais |
| FIOCRUZ - | Fundação Oswaldo Cruz |
| GM-CSF - | Fator estimulador de colônia granulócitos-macrófagos |
| IBGE - | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IC 95% - | Intervalo de Confiança de 95% |
| IFN- β - | Interferon Beta |
| IFN- γ - | Interferon Gama |
| IgE - | Imunoglobulina E |
| IL-1 β - | Interleucina 1 beta |
| IL-2 - | Interleucina 2 |
| IL-4 - | Interleucina 4 |
| IL-5 - | Interleucina 5 |
| IL-10 - | Interleucina 10 |
| IL-12 - | Interleucina 12 |
| IL-18 - | Interleucina 18 |
| IL-2 - | Interleucina 2 |
| IL-4 - | Interleucina 4 |
| LL - | Lepromatoso-Lepromatoso |
| LPS - | Lipopolissacarídeo |
| <i>M. leprae</i> - | <i>Mycobacterium leprae</i> |
| MB - | Multibacilar |
| MHC - | Complexo maior de histocompatibilidade |

| | |
|-----------------|------------------------------------------------------------|
| MS - | Ministério da Saúde |
| NDO-HSA - | Dissacarídeo natural-octil-HSA |
| NEPHANS - | Núcleo de Estudos e Pesquisas em Hanseníase |
| NF-kB - | Fator de transcrição nuclear kappa-B |
| NK - | Natural killer |
| NOD2 - | Nucleotide-binding and oligomerization domain containing 2 |
| OMS - | Organização Mundial da Saúde |
| OR - | Razão de chances/ <i>Odds ratio</i> |
| PACRG - | Gene corre regulatório da Parkina |
| PAMP - | Padrão molecular associado a patógeno |
| PB - | Paucibacilar |
| PCR - | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PGL-1 - | Glicolípido Fenólico-1 |
| PGN - | Peptideoglicano |
| PQT - | Poli quimioterapia |
| PRR - | Receptor de reconhecimento de padrão |
| RNA - | Ácido ribonucleico |
| ROM - | Rifampicina, Ofloxacina e Minociclina |
| RPM - | Rotações por minuto |
| SES/MG - | Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais |
| SINAN - | Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação |
| SPSS - | Statistical Package for Social Sciences |
| SNP - | Polimorfismo de base única |
| TAP - | Transportador associado ao processamento de antígeno |
| TCLE - | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TcR - | Receptor de célula T |
| TDT - | Teste de desequilíbrio de transmissão |
| Th1 - | T helper 1 |
| Th2 - | T helper 2 |
| TGF- β - | Fator de Crescimento e Transformação Beta |
| TLR - | Toll-like receptor |
| TLR1 - | Toll-like receptor 1 |
| TNF- α - | Fator de Necrose Tumoral-alfa |
| TT - | Tuberculoide-Tuberculoide |

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

WHO/OMS - World Health Organization / Organização Mundial de Saúde

χ^2 - Qui-quadrado

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 | Objetivo geral | 21 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 21 |
| 3 | RECORTES TEÓRICOS | 22 |
| 3.1 | Hanseníase - aspectos clínicos | 22 |
| 3.2 | Hanseníase - aspectos epidemiológicos e operacionais | 26 |
| 3.3 | Hanseníase - aspectos imunológicos | 30 |
| 3.4 | Hanseníase - aspectos genéticos | 33 |
| 3.5 | A influência do TLR na suscetibilidade à Hanseníase e seu papel nas vias imunológicas | 35 |
| 4. | MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 4.1 | A Microrregião de Almenara como cenário de estudo | 38 |
| 4.2 | Delineamento Caso-controle | 40 |
| 4.3 | Os sujeitos de pesquisa: seleção, recrutamento e coleta de dados | 41 |
| 4.4 | Variáveis de estudo | 44 |
| 4.5 | Extração do DNA | 45 |
| 4.6 | Método de genotipagem | 45 |
| 4.7 | Análise dos dados | 46 |
| 4.8 | Aspectos éticos e financiamento | 47 |

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------|----|
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 5.1 | Análise descritiva de Casos e Controles | 48 |
| 5.1.1 | Variáveis demográficas | 48 |
| 5.1.2 | Características domiciliares | 51 |
| 5.1.3 | Variáveis epidemiológicas: helmintoses e histórico vacinal de BCG | 53 |
| 5.2 | Análise descritiva dos casos | 55 |
| 5.2.1 | Incapacidades físicas e episódios reacionais | 58 |
| 5.3 | Análise descritiva de variáveis epidemiológicas para controles | 60 |
| 5.4 | Associação do SNP G743A com a hanseníase <i>per se</i> | 62 |
| 5.4.1 | Equilíbrio de Hardy-Weinberg | 64 |
| 5.4.2 | Análise do SNP G743A | 65 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 70 |
| | REFERÊNCIAS | 72 |
| | APÊNDICES | 81 |
| | ANEXOS | 94 |

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é considerada uma doença infectocontagiosa desde 1875, quando se lhe atribuiu caráter patológico a partir da descoberta do agente etiológico *Mycobacterium leprae* por microscopia de nódulos realizada por Gerhard Henrik Armauer Hansen. Contudo, longe de ser uma doença de etiologia puramente infecciosa, a hanseníase vem mostrando, através de sua alta infectividade, baixa patogenicidade e ausência de detecção do bacilo *M. leprae* em algumas formas clínicas, que outros aspectos, além dos microbiológicos, devem ser considerados (ALTER *et al.*, 2011).

Durante a década de 1960, estudos de associação familiar mostraram que a hanseníase apresentava alta concordância em parentes consanguíneos, sendo a concordância ainda maior em gêmeos, sobretudo os monozigóticos. Essas primeiras evidências apontaram para a influência da composição genética dos indivíduos na determinação da suscetibilidade à doença (ALTER *et al.*, 2011). A hipótese da composição genética surge para melhorar a compreensão das respostas imunológicas precipitadas pela infecção, mas, ainda hoje, os mecanismos fisiológicos que determinam o espectro clínico da doença não são plenamente conhecidos.

Sabe-se que a doença, de acordo com a Classificação de Ridley e Jopling, se distingue em cinco formas espectrais, de acordo com critérios clínicos, histopatológicos e imunológicos, sendo elas: tuberculoide (TT), *borderline*-tuberculoide (BT), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-lepromatoso (BL) e lepromatoso (LL) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Para simplificar e operacionalizar o diagnóstico e tratamento, a Organização Mundial de Saúde (OMS), baseada em critérios clínicos e na carga bacilar, sugeriu o agrupamento dos casos em dois grupos principais: os subtipos tuberculoide e *borderline*-tuberculoide foram agrupados em paucibacilares (PB); os *borderline-borderline*, *borderline*-lepromatoso e lepromatoso agrupados como multibacilares (MB) (TEIXEIRA *et al.*, 2008). As diferentes formas clínicas refletem diferentes tipos de resposta imune do hospedeiro ao bacilo *M. leprae*, sendo os padrões de resposta Th1 e Th2 evidenciados nas formas polares tuberculoide e lepromatosa, respectivamente.

A resposta Th1 é mediada por células que promovem a formação de granulomas repletos de macrófagos e células T e a produção de citocinas que incluem, por exemplo, interferon gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2). Esses mecanismos são capazes de controlar a replicação do bacilo, evidenciado pelo menor número de lesões, dano neuronal limitado e

ausência de detecção do bacilo na pele e nos nervos. A resposta Th2 é, principalmente, humoral, com liberação de anticorpos e de citocinas do tipo interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) que, por não induzirem a formação de granulomas, possibilitam maior replicação do *M. leprae* em macrófagos e células de Schwann com infiltrados inflamatórios na pele e nos nervos e um grande número de lesões que podem rapidamente evoluir para incapacidades físicas (ALCAÏS *et al.*, 2005). As formas *borderlines* apresentam respostas imunes instáveis que variam entre Th1 e Th2 com características clínicas intermediárias, podendo evoluir para formas polares quando não há o diagnóstico precoce da doença (ALTER *et al.*, 2011).

A instabilidade das respostas imunes do hospedeiro frente ao *M. leprae* também determina a ocorrência de episódios reacionais agudos que podem contribuir para o aumento da disfunção neuronal. Essas reações são classificadas em reação do tipo 1, ou Reação Reversa, e reação do tipo 2, também denominada Eritema Nodoso Hansênico. Elas ocorrem, comumente, no curso da doença e mesmo durante ou após o tratamento. Ambas representam o desbalanço entre a resposta Th1, característica da Reação Reversa, e a Th2, própria do Eritema Nodoso Hansênico (LOKWOOD *et al.*, 2011).

Por trás de toda a complexidade de respostas do sistema imune do indivíduo existem os genes relacionados às vias imunológicas. A definição de gene diz respeito a uma sequência ordenada de nucleotídeos em uma posição particular do cromossomo que, em grande parte, codifica produtos funcionais específicos (US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2016). No caso do sistema imune, tais produtos funcionais podem ser citocinas, receptores, quimiocinas, entre outros. Mutações¹ em genes essenciais para a função imune podem resultar em uma sequência de bases que não codifica produtos funcionais e, conseqüentemente, perturbar a função do gene, contribuindo para a suscetibilidade a doenças (SPEICHER; ANTONARAKIS; MOTULSKY, 2010).

A mudança de uma base por outra em determinado gene é uma forma muito comum de mutação conhecida como polimorfismo de base única (SNP) e pode associar-se a diferenças na resposta imune do hospedeiro ao bacilo *M. leprae* por alterar a expressão de proteínas, produto funcional do gene (FRANCHESCHI *et al.*, 2009). Os SNP podem alterar a funcionalidade de determinado receptor e contribuir para a suscetibilidade à hanseníase ou aos episódios reacionais, como é o caso de variantes no gene do receptor do tipo *toll* 1 (TLR1) nas

¹ Alteração na sequência de DNA que resulta em uma sequência diferente daquela encontrada na maioria da população. As mutações são variáveis em tamanho e podem afetar desde um par de bases a um grande segmento do cromossomo (US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2016).

populações da China, Vietnã e Índia. Em outros casos, a variante do gene pode contribuir para a resistência do indivíduo à infecção pelo bacilo. Exemplo disso são alguns polimorfismos da interleucina 12 (IL-12) nos países citados anteriormente (HAN; SILVA, 2014).

Num primeiro momento, a exposição ao *Mycobacterium* é um acontecimento necessário para a infecção do indivíduo, mas o fator determinante na infecção e na sua evolução para as manifestações clínicas dependerá da suscetibilidade individual. Considerada uma doença poligênica, as formas clínicas da hanseníase resultam do efeito de um grande número de variantes genéticas de pequeno efeito. Neste caso, os genes têm entre si um efeito cumulativo, onde se destacam poucas variantes de maior efeito (SPEICHER; ANTONARAKIS; MOTULSKY, 2010). Vários genes de suscetibilidade já foram identificados; entretanto, o componente genético da hanseníase *per se*² ou das formas clínicas ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que a suscetibilidade à infecção é conduzida pelos mecanismos iniciais de interação do *M. leprae* e seus alvos celulares, principalmente a interação da bactéria com os macrófagos e com as células de Schwann (MIRA, 2006).

Em diversos tipos celulares, incluindo macrófagos e células de Schwann, são expressos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) capazes de reconhecer patógenos e precipitar cascatas de sinalização que ativam genes codificadores de citocinas, quimiocinas e moléculas coestimulatórias necessárias à resposta imune adquirida. Dentre essa classe de receptores, temos a família dos receptores do tipo *toll* (TLR) e o receptor *nucleotide-binding and oligomerization domain* (NOD2), que fazem parte dos PRR da imunidade inata e desempenham um papel essencial na defesa contra micro-organismos, inclusive micobactérias patogênicas (HART; TAPPING, 2012).

Estudos de associação identificaram alguns SNP nos genes dos TLR capazes de conferir suscetibilidade à infecção bacteriana e manifestação de reações hanseníacas. Dentre os genes de TLR estudados, destacam-se variantes do TLR1 como importantes determinantes de suscetibilidade à hanseníase em populações de Bangladesh, Brasil e Etiópia (SCHURING *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2013). Este estudo parte da hipótese de que variantes no gene TLR1 contribuem para a suscetibilidade à hanseníase por alterarem o reconhecimento do patógeno, a sinalização e a codificação de moléculas pró-inflamatórias, uma vez que esses receptores são parte fundamental da primeira linha de defesa contra a infecção pelo *M. leprae*.

Apesar de polimorfismos genéticos associados a receptores terem sido estudados em diferentes países, a complexidade do tema reforça a necessidade de mais estudos que

² De origem latina, esse termo significa por si ou por si só (PRIBERAM, 2006). Quando relacionado à hanseníase, indica a doença independente de suas formas clínicas.

esclareçam o conjunto de variantes genéticas que influenciam a suscetibilidade à doença e o modo como o sistema imune interage com o bacilo e com outros sistemas, precipitando os processos de inflamação e dano nervoso característicos da patologia (LASTÓRIA; ABREU, 2014). Isto posto, propõe-se neste projeto verificar a influência do SNP G743A do gene TLR1 com a suscetibilidade à hanseníase *per se* em indivíduos da Microrregião de Almenara, Minas Gerais.

Amaral (2012) realizou um estudo de epidemiologia genética também na Microrregião de Almenara com análise de associação baseada em famílias e verificou a associação do SNP G743A do gene TLR1 com a hanseníase, obtendo resultados significativos que serão abordados no decorrer desta dissertação. O presente trabalho, assim como a pesquisa mencionada anteriormente, é vinculado aos projetos do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Hanseníase (NEPHANS) e busca confirmar se nova análise de associação realizada no mesmo cenário, mas de base populacional, será capaz de encontrar resultados semelhantes ao estudo anterior.

Percebe-se que ainda há uma carência de pesquisas voltadas para o estudo de variantes de suscetibilidade à hanseníase na população brasileira. Do ponto de vista epidemiológico, o Brasil tem tido dificuldades no controle da transmissão da hanseníase pelas evidências de áreas de hiperendemia, avançado grau de incapacidade física no diagnóstico e por ser o segundo país no mundo com maior detecção de casos novos (WHO, 2014). Assim sendo, distingue-se a hanseníase em nosso país como um problema de saúde pública.

Novos trabalhos de epidemiologia genética contribuirão para identificar marcadores genéticos da hanseníase, o que é um passo importante para o desenvolvimento de métodos de predição do risco de adoecimento que contribuirão para a prevenção e o controle da patologia, assim como a redução das incapacidades físicas. Essas metas são compartilhadas com a Estratégia Global Aprimorada para Redução Adicional da Carga de Hanseníase – Plano 2011 a 2015 – da Organização Mundial da Saúde (2010) na qual se pontua a necessidade de um maior desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas diagnósticas com o fim de identificar indivíduos e comunidades de alto risco para hanseníase e o incentivo e prioridade a pesquisas com implicações para a saúde pública. Além disso, a identificação de marcadores genéticos é um passo necessário para o processo de elucidação da função biológica dos genes e das redes de genes que determinarão os fatores que influenciam a evolução da infecção para o estado patológico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Associar o polimorfismo G743A do gene TLR1 com a hanseníase *per se* na população de casos e controles da Microrregião de Almenara, Minas Gerais.

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar a população de casos e controles quanto a: variáveis sociodemográficas; condições de moradia e convívio; informações epidemiológicas;
- b) Descrever os aspectos clínicos da hanseníase entre os casos;
- c) Identificar a ocorrência do SNP G743A do gene TLR1 em casos e controles;
- d) Verificar a associação do SNP G743A do gene TLR1 com a suscetibilidade à hanseníase *per se*.

3 RECORTES TEÓRICOS

3.1 Hanseníase – aspectos clínicos

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. Nos últimos anos, evidências da coexistência do *Mycobacterium leprae* com o bacilo *Mycobacterium lepromatosis* na forma clínica lepromatosa da doença e no Fenômeno de Lúcio, reação hansênica grave, incomum e potencialmente fatal, têm sido observadas em casos clínicos do México (VERA-CABRERA *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2012), Canadá (JESSAMINE *et al.*, 2012) e Singapura (HAN; SIZER; TAN, 2012). Entretanto, ainda não há relatos da presença do *M. lepromatosis* em indivíduos doentes em outros países além daqueles já citados.

O bacilo *M. leprae* possui um tempo de multiplicação lento, podendo durar de 11 a 16 dias, característica que contribui para a lenta evolução do processo de exposição, infecção e adoecimento, que, a depender da relação estabelecida entre o parasita e seu hospedeiro, dura de dois a sete anos, com relatos de períodos de incubação inferiores a um ano e também de 10 anos (BRASIL, 2009). Ainda assim, alguns indivíduos infectados não desenvolverão a patologia. Biópsias e *swabs* nasais apresentando o ácido desoxirribonucleico (DNA) do bacilo, juntamente com a soropositividade para antígenos específicos do *M. leprae* em moradores saudáveis de áreas endêmicas, sugerem o papel do portador saudável na transmissão, corroborando para as características de alta infectividade e baixa patogenicidade da doença (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

O homem é considerado a única fonte de infecção da hanseníase. Contudo, alguns estudos apontam para o papel do tatu da espécie *Dasypus novemcinctus* como reservatório do bacilo e fonte de infecção para pacientes dos Estados Unidos e México, o que ainda não está completamente elucidado (TRUMAN *et al.*, 2011). Sabe-se que o nariz e a pele são as principais rotas de infecção e transmissão. A transmissão ocorre através da eliminação do bacilo pelas vias aéreas superiores altamente colonizadas de um indivíduo doente com a forma multibacilar sem tratamento. Indivíduos com muitos bacilos chegam a liberar uma média de cem milhões de bactérias viáveis por dia (SILVA *et al.*, 2013).

A provável porta de entrada do bacilo também são as vias áreas superiores, mucosa nasal e orofaringe. Porém, a transmissão requer um contato direto e frequente do hospedeiro suscetível com um doente não tratado e é facilitada pelo contato intradomiciliar, sobretudo nos domicílios com poucos cômodos e elevado número de residentes. Outros

fatores como a baixa condição socioeconômica e a precariedade de recursos básicos de sobrevivência e de acesso aos serviços de saúde contribuem para o adoecimento em conjunto com aspectos genéticos e imunológicos do hospedeiro (BRASIL, 2002).

A doença pode atingir indivíduos suscetíveis de todas as idades e ambos os sexos, não sendo comum em crianças devido ao seu longo período de incubação. No entanto, em áreas de hiperendemia com deficiência operacional no controle da doença, a presença de focos ativos de infecção contribui para um número considerável de diagnósticos em menores de quinze anos (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Após a infecção, a depender da resposta imune desencadeada pelo hospedeiro, poderá ocorrer a manifestação dos sinais e sintomas da doença que, num primeiro momento, denota o surgimento de uma ou várias lesões cutâneas: manchas pigmentares ou discrômicas, lesões em placa, infiltrações ou nódulos comumente encontradas na face, orelhas, braços, costas, nádegas e pernas, mas que também podem estar presentes na mucosa nasal e cavidade oral. Uma característica peculiar das lesões hansênicas é a alteração de sensibilidade, que pode estar diminuída, ausente ou aumentada (BRASIL, 2002) e abranger as sensibilidades térmica, dolorosa e tátil (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Quando o tratamento não é iniciado a partir do aparecimento dos primeiros sinais, lesões nervosas podem surgir decorrentes de processos inflamatórios desencadeados pelo parasitismo intracelular do *M. leprae* nas células de Schwann ou mesmo por respostas imunes exacerbadas. Essa inflamação desencadeia dores, espessamento do nervo afetado e perda da sensibilidade e força muscular nas áreas de inervação, processo denominado neurite. As áreas afetadas com maior frequência são as mãos, pés e os olhos (BRASIL, 2002).

A neuropatia periférica da hanseníase atinge tanto os nervos sensoriais quanto os motores e autonômicos com um padrão de mononeuropatia única ou múltipla. Com a cronicidade da neurite, o comprometimento neural passa a afetar as glândulas sudoríparas e sebáceas, prejudicando a capacidade de suar com conseqüente ressecamento da pele no local. Além disso, também são comuns a dormência, retração do tendão, diminuição da mobilidade das articulações, disfunção vasomotora e paralisia nas áreas inervadas (LASTÓRIA; ABREU, 2014). Ainda hoje, o diagnóstico da hanseníase é tardio e ocorre quando o dano nervoso já está estabelecido, predispondo o indivíduo aos danos secundários decorrentes de trauma, pressão anormal ou infecções que resultam em injúrias frequentes em olhos, pés e mãos, contraturas articulares, bem como o aparecimento de fissuras e úlceras que podem evoluir para osteomielite, reabsorção óssea e deformidades graves (BRAKEL, 2000).

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico. Ele inclui a anamnese, na qual são colhidas informações acerca da história e condições de vida do paciente, procurando identificar a origem da infecção, avaliação dermatológica com inspeção da superfície corporal em busca de lesões características, avaliação neurológica, avaliação da força muscular, da mobilidade articular e da sensibilidade, investigação de estados reacionais e diagnóstico diferencial (BRASIL, 2002).

Conforme a Portaria n. 3.125, de 7 de outubro de 2010, que aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase, o diagnóstico da doença é confirmado quando um ou mais dos seguintes sinais cardinais estão presentes: lesão e/ou área da pele com sensibilidade alterada; nervo periférico acometido e com alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas, espessados ou não; baciloscopia positiva (BRASIL, 2010d).

As principais patologias às quais as manifestações da hanseníase podem se assemelhar e requerem diagnóstico diferencial são: eczemátides, pitiríase versicolor, eritrodermias e eritemas difusos, psoríase, lúpus eritematoso, pelagra, sífilis, tinhas, sarcoidose, tuberculose, xantomas, hemoblastoses, esclerodermias e neurofibromatose de Von Recklinghausen (BRASIL, 2009).

Alguns exames laboratoriais prestam um serviço de apoio útil em caso de dúvidas quanto à classificação da doença, na instituição da poliquimioterapia (PQT), no diagnóstico diferencial ou mesmo na suspeita de recidiva, complementando o diagnóstico clínico. O exame de baciloscopia consiste na coleta de raspado intradérmico de lesões, dos lóbulos auriculares e dos cotovelos no qual o índice baciloscópico é investigado a partir de microscopia, ou seja, a quantidade de bacilos presentes nos campos examinados que varia de 0 a 6+. O resultado pode ser negativo, mesmo em casos confirmados clinicamente; por isso, a ausência de bacilos na microscopia não afasta o diagnóstico da doença (BRASIL, 2010b).

Assim como a baciloscopia, o exame histopatológico é utilizado para auxílio no esclarecimento da forma clínica de hanseníase e diagnóstico diferencial. Ele baseia-se na biópsia da lesão suspeita, fornecendo um quadro histológico com discriminação das alterações teciduais características das diferentes formas clínicas, além de permitir também a detecção do bacilo (URA; BARRETO, 2004). Atualmente, exames de apoio ao diagnóstico que avaliam a resposta de anticorpos do hospedeiro a antígenos do *M. leprae*, naturais ou sintéticos, como o Glicolípido Fenólico-1 (PGL-1) e Dissacarídeo natural-octil-HSA (NDO-HSA), estão sendo estudados e mostram resultados promissores, especialmente os testes sorológicos que têm sido apontados como potencialmente eficazes na detecção de indivíduos

infectados ainda sem tratamento e na classificação operacional da hanseníase (FABRI *et al.*, 2015).

O diagnóstico também pressupõe o conhecimento do conceito espectral da hanseníase, em que a relação do curso evolutivo da doença com o comprometimento cutâneo-neural direcionará a classificação da forma clínica e a escolha da terapêutica medicamentosa. Várias classificações já foram propostas até hoje. A primeira delas, a Classificação de Madri, elaborada no Congresso Internacional de Leprologia em 1953, foi baseada em critérios clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos. A partir desses critérios foi definida uma forma inicial e transitória classificada como indeterminada (I), grupos polares estáveis, classificados como tuberculoide (HT) e virchowiana (HV), e um grupo intermediário classificado como *borderline* ou dimorfo (HD) (SOUZA, 1997).

Em 1966, Ridley e Jopling propuseram classificação mais flexível que permitiu diagnosticar a hanseníase dentro de um espectro contínuo entre os grupos polares. Nela, a variação das formas clínicas vai do polo tuberculoide (TT) para as formas intermediárias, *borderline*-tuberculoide (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline*-lepromatosa (BL), até a forma polar lepromatosa (LL).

Para facilitar e fundamentar a escolha da PQT, a OMS definiu em 1981 uma classificação operacional da doença na qual as formas clínicas lepromatosa, *borderline*-lepromatosa e *borderline-borderline* estão categorizadas como multibacilar e as formas tuberculoide e *borderline*-tuberculoide formam o grupo paucibacilar. Posteriormente, foi especificado que os casos de hanseníase seriam classificados em paucibacilares quando houvesse de uma a cinco lesões, e em multibacilares naqueles com seis lesões ou mais e resultado de baciloscopia positivo. Entretanto, independente da disponibilidade e do resultado da baciloscopia, a classificação dos casos segue o critério clínico (WHO, 2012).

Com o diagnóstico confirmado de hanseníase, o indivíduo é avaliado quanto à presença de incapacidades físicas. Essa avaliação investiga a integridade da função neural a partir do teste de força motora e do teste de sensibilidade em olhos, mãos e pés, utilizando fio dental sem sabor e o conjunto de seis monofilamentos de *Semmes-Weinstein*. Os graus de incapacidade são divididos em: 0 ou nenhuma incapacidade física; 1 ou diminuição/perda da sensibilidade nos olhos, mãos e/ou pés; 2, que indica presença de incapacidades graves como lagofalmo, ectrópio, triquíase, entre outras (BRASIL, 2009).

O tratamento da hanseníase é realizado por PQT, uma associação de medicamentos capazes de matar o bacilo e evitar que a doença evolua. Com isso, já nas primeiras doses, o indivíduo doente deixa de eliminar o bacilo, rompendo a cadeia de

transmissão. Os medicamentos associados também têm a função de evitar a resistência medicamentosa do bacilo (BRASIL, 2002).

A escolha da PQT é feita com base na classificação operacional do doente. Indivíduos paucibacilares realizam tratamento que pode variar de seis a nove meses. O tratamento consiste em doses diárias autoadministradas de Dapsona (100 mg) e seis doses supervisionadas de Rifampicina (600 mg) e Dapsona (100 mg), tomadas mensalmente na unidade básica de saúde ou domicílio. Para indivíduos multibacilares, o tratamento dura de 12 a 18 meses e consiste em doses diárias autoadministradas de Dapsona (100 mg) e Clofazimina (50 mg) mais as doses supervisionadas mensais de Rifampicina (600 mg), Dapsona (100 mg) e Clofazimina (300 mg) tomadas na unidade básica de saúde ou domicílio. Independente do tipo de tratamento, aqueles que comparecem para a última dose supervisionada são submetidos a exame dermatoneurológico e avaliação do grau de incapacidade física e recebem alta por cura quando completam seis doses supervisionadas nos casos PB e doze doses supervisionadas para os casos MB. Ao final do tratamento MB, a ausência de melhora clínica pode indicar necessidade de um segundo ciclo de 12 meses. Neste caso, é feito um encaminhamento para avaliação em unidades de maior complexidade. Também é indicado para acompanhamento em unidade de referência os indivíduos paucibacilares com lesão única que receberão PQT por esquema alternativo (ROM - Rifampicina, Ofloxacina e Minociclina) devido a intolerância a algum dos medicamentos do esquema padrão (BRASIL, 2002).

Nos últimos anos, a atividade antimicobacteriana de medicamentos como a Moxifloxacina, Rifapentina e Diarilquinolina em estudos com camundongos e humanos têm resultado numa diminuição expressiva da carga bacilar em poucas semanas, levando a crer que essas opções são mais potentes que os medicamentos utilizados no esquema padrão. Apesar de promissoras, a viabilidade do uso dessas opções de tratamento requer ainda mais estudos quanto à segurança e ao tempo necessário de tratamento antes de serem utilizadas em larga escala (WHO, 2012).

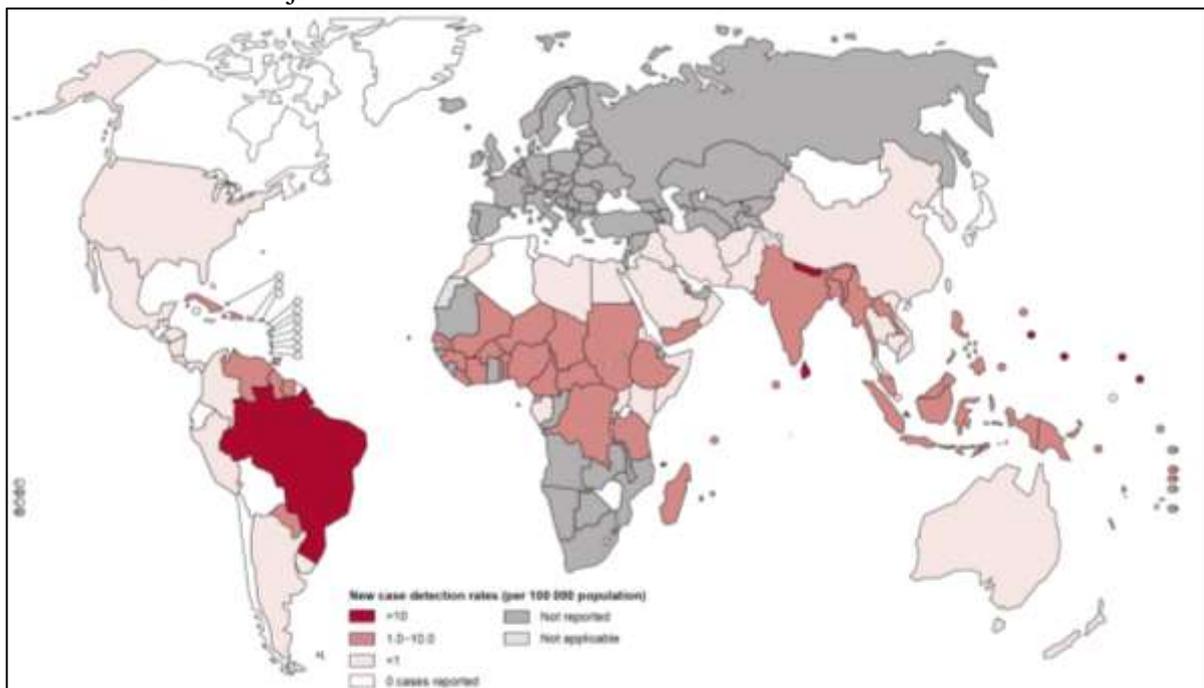
3.2 Hanseníase - aspectos epidemiológicos e operacionais

Há mais de 25 anos, a introdução da poliquimioterapia surgiu como uma estratégia de eliminação da doença baseada na cura dos indivíduos que atuavam como focos de transmissão do *M. leprae*. Contudo, em áreas endêmicas muitos indivíduos entre a população estão infectados e contribuem para a manutenção da cadeia de infecção, mostrando

que, além do tratamento medicamentoso dos doentes, o diagnóstico precoce permanece uma estratégia essencial para a redução do número de casos (BRASIL, 2010a).

A PQT e o diagnóstico precoce têm sido apontados pela OMS como os fatores que mais contribuíram para a expressiva redução da prevalência global da hanseníase: de mais de 5 milhões de casos na década de 1980 para menos de duzentos mil em 2014 (WHO, 2015). Embora a queda tenha sido expressiva, a redução da prevalência conhecida não é o fim do problema hanseníase. A taxa de detecção de casos novos, indicador que provê uma medida da transmissão recente e prevalência oculta da infecção na população, não tem tido uma redução homogênea em todos os países (WHO, 2012). O Mapa 1 mostra a distribuição das taxas de detecção de casos novos de hanseníase no mundo em 2014.

Mapa 1 – Taxa de detecção de casos novos de hanseníase, dados reportados à Organização Mundial de Saúde em janeiro de 2014



Fonte: World Health Organization (WHO), 2016.

O Mapa 1 aponta-nos que Brasil, Nepal e Sri Lanka foram os países com maior taxa de detecção de casos novos no mundo em 2014, todos eles com mais de 10 casos novos por 100.000 habitantes. Esse quadro pouco tem mudado com o passar dos anos, inclusive, o número de casos novos detectados anualmente tem sofrido pouca alteração. Em 2014, apenas treze países contribuíram com 94% do número total de casos novos em todo o mundo; mesmo assim, entre esses países a distribuição dos casos foi heterogênea. Brasil, Índia e Indonésia juntos contribuíram com 81% dos casos novos no mundo com detecção anual que ultrapassa

dez mil casos. Já outro grupo de dez países, nos quais se incluem Filipinas e Nigéria, contribuíram com apenas 16% do total global (WHO, 2015).

Entre os anos de 2005 e 2014, o Brasil apresentou um declínio na tendência de detecção de casos, mas ainda se destaca como o segundo país no mundo com maior número de indivíduos com hanseníase. Foram 31.064 casos novos detectados em 2014. Dentre eles, 61,9% eram multibacilares, o que indica a presença de casos mais avançados de hanseníase e, indiretamente, a magnitude da infecção na comunidade. No mesmo período, o percentual global de casos MB foi de 60,6% (WHO, 2015).

Para avaliar a continuidade da transmissão da infecção na comunidade, ou seja, um indício da presença de pessoas infectadas sem tratamento que contribuem para a perpetuação da cadeia de transmissão, é utilizado o indicador taxa de detecção em menores de 15 anos. Os resultados desse indicador revelam que em 2014 o Brasil foi o país que apresentou a maior proporção de detecção em menores de 15 anos nas Américas: 7,5% (WHO, 2015). A medida de vigilância consiste na busca e exame dos contatos domiciliares dos casos de hanseníase. Entretanto, no país a proporção de contatos examinados em 2010 foi considerada regular – apenas 58%, conforme parâmetros do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2012).

A proporção de casos diagnosticados com grau 2 de incapacidade física é um indicador operacional importante na avaliação da rapidez e precisão do diagnóstico pelos serviços de saúde e da vigilância epidemiológica da hanseníase. Em todo o mundo, 6,6% dos indivíduos diagnosticados já estão com incapacidades físicas graves. O Brasil possui resultado semelhante com uma proporção de 6,55% de casos novos diagnosticados com incapacidade grau 2 (WHO, 2015).

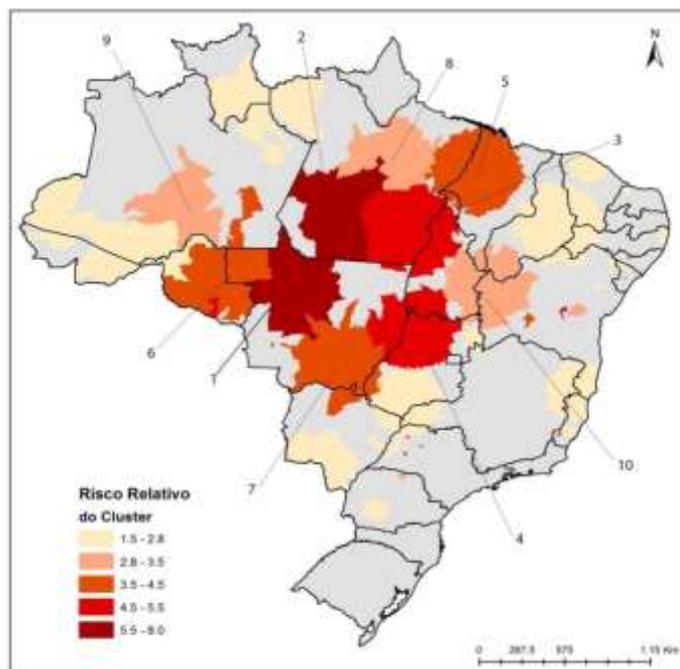
Outro dado importante de avaliação do problema hanseníase é a proporção de indivíduos que são diagnosticados e completam o tratamento, recebendo alta por cura, que é expressa na taxa de cura. Esse indicador sugere a eficiência no manejo dos pacientes pelos serviços de saúde. A taxa de cura brasileira foi de 83% no ano de 2014 tanto para casos PB quanto para os MB, ou seja, quase 20% dos indivíduos doentes em nosso país não chegam a completar o tratamento (WHO, 2015).

Os indicadores epidemiológicos e operacionais refletem a situação da hanseníase como problema de saúde pública no Brasil. O cenário interno, entretanto, apresenta diferenças regionais, estaduais e municipais. Uma das características da hanseníase é a variação geográfica. Como mostrado, a doença apresenta uma distribuição consideravelmente diversa entre os países; mesmo a nível local, dentro de um país, as diferenças na detecção de casos

são claramente percebidas entre as comunidades. Algumas populações possuem maior risco de adoecer e, conseqüentemente, têm mais casos novos detectados, indicando que existem fatores de risco que ainda não foram totalmente compreendidos e precisam ser elucidados (WHO, 2012). No Brasil, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são as que possuem os mais altos coeficientes de detecção e, embora concentrem somente 17,5% da população, são responsáveis por mais de 50% dos casos (BRASIL, 2008).

Apesar de mais relevantes do ponto de vista epidemiológico, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste não são as únicas regiões brasileiras que apresentam risco aumentado de hanseníase. De fato, todos os estados brasileiros apresentam alguma área de alto risco; um estudo do Ministério da Saúde verificou a presença de 26 *clusters* no país com taxa média de detecção de casos superior à média nacional. Estes *clusters* se caracterizam por vários conglomerados de municípios que apresentam uma característica em comum: alta taxa de ocorrência da doença e elevado risco para detecção de casos novos (BRASIL, 2008). O Mapa 2 traz a distribuição espacial dos *clusters* de alto risco identificados a partir do coeficiente de detecção de casos novos.

Mapa 2 – Análise de cluster da taxa de detecção geral da hanseníase no Brasil no triênio 2011-2013



Fonte: MS/SVS/CGHDE-Sinan (WHO, 2013).

A partir da análise do mapa revelam-se as áreas geográficas de alto risco distribuídas por todas as unidades federadas, inclusive Sul e Sudeste. Esses *clusters* reúnem municípios com pouca população e alta concentração de casos. Hoje em dia, os estados da

Amazônia brasileira destacam-se como os de maior risco para hanseníase e os da região sul como os de menor risco. Sabe-se que a epidemiologia da doença possui como determinantes as características socioeconômicas populacionais, por isso o enfoque das políticas públicas deve envolver uma atenção integral e integrada entre as regiões, estados e municípios. Nesse sentido, o desenvolvimento socioeconômico, a melhoria da educação e a redução da pobreza e da desigualdade naqueles locais devem ser levados em consideração e precisam repercutir positivamente na incidência da doença (BRASIL, 2008).

Medidas de vigilância – como o exame de contatos; o tratamento e a cura dos casos diagnosticados; a avaliação das incapacidades físicas – são essenciais e prioritárias nas áreas de *cluster* que demandam intensificação dessas ações. Para o alcance da meta de eliminação da hanseníase é posta em destaque a estratégia de aumento da detecção precoce e da cura dos indivíduos doentes (BRASIL, 2012). Contudo, antes que observemos uma diminuição no número de casos da doença, há que se esperar um aumento da detecção de casos novos, retrato da atuação dos serviços de saúde na busca ativa de casos, na melhoria do diagnóstico e nas demais ações de controle da hanseníase, a fim de evitar que uma redução do coeficiente de detecção e da prevalência, fruto do pouco investimento nas estratégias de eliminação, seja interpretada como avanço (BRASIL, 2008).

3.3 Hanseníase - aspectos imunológicos

A complexidade e variedade das manifestações clínicas da hanseníase baseiam-se na interação da micobactéria com o sistema imunológico do hospedeiro. Com crescimento lento e predileção por regiões mais frias do corpo como a passagem nasal, num primeiro momento, ao ser inalado, o *M. leprae* adere às células epiteliais nasais e mais eficientemente nas células epiteliais alveolares, tornando-as reservatórios de bacilos (SILVA *et al.*, 2013).

A cápsula externa e a parede celular do *M. leprae* são repletas de glicolípídeos e lipopolissacarídeos de superfície reconhecidos pelo organismo como padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP). Os PAMP permitem que as células do sistema imune reconheçam o bacilo a partir de sua ligação nos receptores de reconhecimento de padrão (PRR). Estes receptores atuam na identificação e resposta às micobactérias: os receptores do tipo *Toll* (TLR) e o NOD2 (MODLIN, 2010).

Após serem reconhecidos, os bacilos são endocitados e/ou fagocitados, degradados pelo fagolisossomo ou proteossoma da célula, gerando fragmentos peptídicos que, após processados, são apresentados na superfície da membrana celular em associação com o

Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) de classes I e II. O complexo antígeno e MHC de classe I, expresso em todas as células nucleadas, é reconhecido pelo receptor de linfócitos (TcR) e ativa os linfócitos T citotóxicos CD8⁺. O complexo antígeno e MHC de classe II, expresso pelas células apresentadoras de antígenos profissionais – células dendríticas, macrófagos e células B – e não profissionais – fibroblastos, células do endotélio vascular, entre outras –, é reconhecido pelo TcR dos linfócitos T auxiliar CD4⁺ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Na hanseníase, por um lado as células apresentadoras de antígeno podem destruir o bacilo e ativar linfócitos, mas por outro podem servir como habitat do *M. leprae* (BRITTON, 1993). Ao ser endocitado pelo macrófago, o bacilo induz a produção de sinais regulatórios positivos ou negativos através do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina 10 e 12 (IL-10 e IL-12) e fator de crescimento e transformação beta (TGF- β). Essas citocinas têm função oposta nos macrófagos uma vez que a liberação de TNF- α e IL-12 ativa a destruição do bacilo intracelular e induz a proliferação de linfócitos T, respectivamente, conferindo resistência à proliferação da micobactéria. Já a liberação de TGF- β e IL-10 desativa as funções do macrófago, impede a digestão do bacilo endocitado e promove sua proliferação no interior da célula (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). O próprio bacilo pode ainda inibir a fusão do fagolisossomo, escapar do fagossoma e ser resistente à digestão, persistindo no macrófago e levando a uma liberação constante de citocinas que resultarão em estimulação crônica das células T e transformação do macrófago em célula epitelióide. O macrófago infectado também pode se fundir a outros macrófagos e formar células gigantes multinucleadas ou granulomas, localizados na pele e nervos e característicos da forma TT da doença (BRITTON, 1993).

O bacilo da hanseníase também é capaz de se proliferar em células não -imunes justificada pela redução significativa de seu genoma, que o tornou dependente das funções celulares para a sobrevivência; neste caso, seu alvo primário é a célula de Schwann. Resultados de estudos de células de Schwann infectadas com um alto número de bacilos evidenciaram a capacidade do *M. leprae* de reprogramar o potencial nuclear e a plasticidade natural das células adultas e torná-las semelhantes às células-tronco, capazes de migrar e se diferenciar em tecidos mesenquimais, contribuindo para a disseminação da infecção em outros tecidos e na formação do granuloma. Além disso, quando reprogramadas, as células de Schwann produzem quimiocinas e fatores tróficos que recrutam macrófagos e possibilitam sua infecção (MASAKI *et al.*, 2013).

Após a fase inicial da infecção, a evolução para as manifestações clínicas está estreitamente relacionada com o padrão de resposta imune desenvolvido pelo hospedeiro. Na hanseníase tuberculoide, a ligação do TcR com o MHC de classe II resulta na liberação de IL-2 que atua no recrutamento e proliferação das células *natural killers* (NK) e linfócitos T citotóxicos e no crescimento autócrino dos linfócitos T auxiliares. Os linfócitos T liberam IFN- γ que age nos macrófagos, capacitando-os a matar os bacilos e conter sua proliferação por meio da produção de reativos de oxigênio e nitrogênio. Os macrófagos por sua vez liberam interleucina-1 β (IL-1 β), fator estimulador de colônia granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e TNF- α . Esta imunidade mediada por células é capaz de conter a carga bacilar por meio de uma resposta imune específica com padrão Th1 e pode levar à cura ou a uma forma branda da doença (YAMAMURA *et al.*, 1991; BRITTON, 1993; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

Nas lesões da hanseníase lepromatosa estão presentes linfócitos T CD4⁺, macrófagos e, mais predominantemente, linfócitos T CD8⁺ que liberam IL-4, IL-5 e IL-10, típico padrão de resposta Th2. Essas citocinas estão envolvidas com a imunidade humoral uma vez que a IL-4 estimula a produção de imunoglobulina E (IgE) e juntamente com a IL-10, são responsáveis pelo estímulo às células B na produção de anticorpos. A IL-4 também estimula a produção de TGF- β pelas células T CD4⁺, um potente inibidor da atividade dos macrófagos; é fator de crescimento para linfócitos T supressores; bloqueia os receptores de IL-2 nos linfócitos T, impedindo sua proliferação; inibe a ativação de macrófagos e monócitos pelo interferon gama (IFN- γ); impede a destruição do patógeno intracelular por meio da produção reduzida de TNF- α , prostaglandinas e de óxido nítrico nos macrófagos (SALGAME *et al.*, 1991; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

A cronicidade da liberação de IL-10 por macrófagos induz a multiplicação de linfócitos T CD4⁺ com perfil regulatório e que, ao manter a liberação de IL-10, perpetuam a supressão da resposta imune mediada por células. A inibição da destruição bacilar e a supressão da resposta antígeno-específica resultam na progressão da infecção (SALGAME *et al.*, 1991; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). Esse substrato de células T CD4⁺ com função supressora tem sido denominado células T reguladoras ou Treg, que expressam constitutivamente a molécula CD25 e o fator de transcrição FoxP3. Esse efeito supressor é mediado pela interação direta com as células T efetoras e liberação de citocinas anti-inflamatórias. Nota-se que este efeito imunossupressor não é sistêmico, mas local, ou seja, em sítios de multiplicação do patógeno. O papel das Treg difere a partir das diferentes formas clínicas da hanseníase: por um lado, foi observado um alto número destas células na forma

lepromatosa da doença, o que evidencia seu efeito na manutenção da multiplicação do bacilo decorrente da expressão aumentada de moléculas anti-inflamatórias, como IL-10; por outro lado, esse mesmo efeito não tem sido observado na forma tuberculoide da doença (PALERMO *et al.*, 2012).

O paradigma Th1/Th2 baseado nos diferentes padrões de produção de citocinas é capaz de esclarecer as respostas desencadeadas pelas formas clínicas tuberculoide e lepromatosa da doença. Contudo, o padrão nas formas *borderlines* ainda não está claro, com evidências de um perfil misto de citocinas em alguns pacientes. Por isso, é necessário compreender os mecanismos imunorregulatórios da produção e/ou inibição das citocinas dentro do espectro de formas clínicas da hanseníase (SCOLLARD *et al.*, 2006).

3.4 Hanseníase - aspectos genéticos

A descoberta de um micro-organismo como agente causador das doenças infecciosas trouxe um determinismo na causalidade incapaz de explicar várias características da infecção. A Teoria Microbiana de Pasteur destacou o conflito percebido na variabilidade das respostas imunes entre os indivíduos infectados em uma mesma população. A investigação dessa variabilidade por Charles Nicolle, entre 1911 e 1917, foi essencial para a descoberta do fenômeno da infecção inaparente, ou seja, entre os infectados coexistiam indivíduos sintomáticos e assintomáticos (ALCAÏS; ABEL; CASANOVA, 2009). A hipótese da influência genética na precipitação da hanseníase foi então levantada a partir da observação do grande número de indivíduos que, apesar do contato com o bacilo, não desenvolviam a doença e do amplo espectro de manifestações clínicas naqueles indivíduos doentes. Além disso, devido à diversidade limitada de genes, é provável que o *M. leprae* não tenha um papel decisivo no desfecho clínico (ALCAÏS *et al.*, 2005).

O envolvimento de outros fatores relacionados à infecção e progressão da hanseníase realçou-se a partir das observações de uma agregação familiar e étnica da doença, com uma concordância entre pais e filhos biológicos que não era percebida quando os filhos eram adotivos e ainda mais alta concordância para a hanseníase entre gêmeos monozigóticos comparados aos dizigóticos. Verificou-se que a predisposição às doenças infecciosas comuns, como a hanseníase, envolvia um amplo número de genes num tipo de suscetibilidade denominada poligênica, onde cada um contribuía com uma influência pequena num efeito cumulativo (ALCAÏS; ABEL; CASANOVA, 2009). Seguida à descoberta da suscetibilidade poligênica, iniciaram-se estudos que traziam o conceito de genes de efeito principal nas

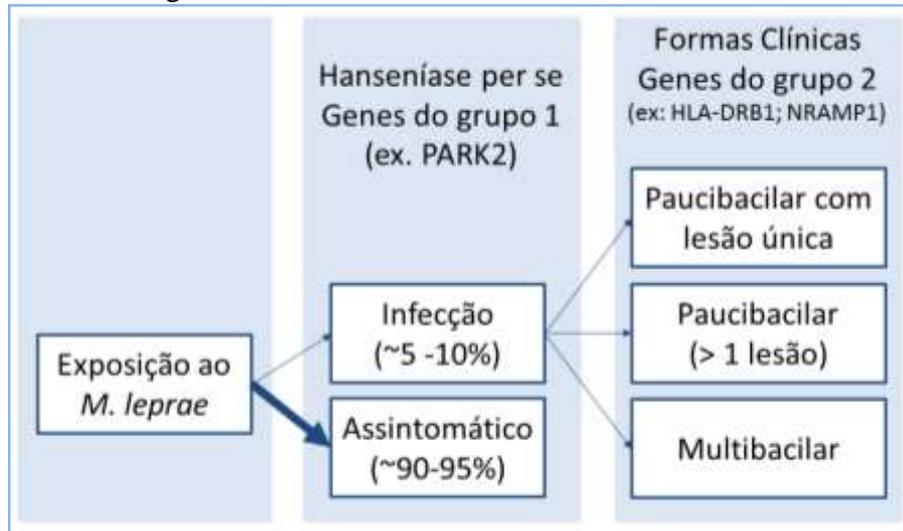
doenças infecciosas, isto é, um único gene de maior importância, mas com baixa penetrância³ e expressão fenotípica influenciada tanto por fatores ambientais como por outros genes de menor efeito (LALOUEL *et al.*, 1983).

Esses genes de efeito principal podem apresentar especificidade para uma determinada população, determinada doença e fenótipos clínicos e imunológicos. Para a hanseníase, alguns genes de efeito principal já foram mapeados por estudos de ligação genômica. Um deles foi o gene da Linfotóxina- α cuja variação resultou em risco aumentado de hanseníase na população do Vietnã, sobretudo antes dos 25 anos (MIRA *et al.*, 2003). Outras variantes na região regulatória compartilhada pelo gene da parkina (PARK2) e gene corregulatório da parkina (PACRG) também estiveram relacionadas ao fenótipo da hanseníase (SCHURR *et al.*, 2006). Outros genes candidatos incluem os genes do complexo MHC de classes I e II, genes do transportador associado ao processamento de antígeno (TAP), gene do TNF- α , IL-10, IFN- γ e genes dos NOD e TLR (MIRA, 2006; MARQUES *et al.*, 2014).

É provável que exista uma arquitetura genética que possibilite a predição da suscetibilidade ou resistência à hanseníase; por isso, torna-se importante a definição de uma hierarquia de genes envolvidos no adoecimento (ALCAÏS; ABEL; CASANOVA, 2009). O envolvimento dos genes na suscetibilidade poligênica da hanseníase é mais bem compreendido a partir de um modelo de dois estágios. Num primeiro momento, entende-se que todos os indivíduos infectados compartilham um estágio não sintomático da doença, fenótipo denominado hanseníase *per se*. Neste estágio, os genes implicados na hanseníase *per se* não necessariamente influenciam a progressão da doença para alguma forma clínica. A progressão para as diferentes formas clínicas envolve uma segunda gama de genes em um segundo estágio (SCHURR *et al.*, 2006). A Figura 1 exemplifica o modelo abordado.

³ Penetrância é um conceito estatístico que se refere à fração de casos com um dado genótipo que manifesta um fenótipo específico (SPEICHER; ANTONARAKIS; MOTULSKY, 2010).

Figura 1 – Modelo da Suscetibilidade Genética à Hanseníase em dois estágios



Fonte: ALTER *et al.*, 2011.

No primeiro estágio, os genes do grupo 1 contribuem para o estabelecimento da doença após a exposição ao *M. leprae* e no segundo estágio os genes do grupo 2 conferem risco para as manifestações de formas clínicas mais brandas, como a hanseníase paucibacilar, ou mais severas como a multibacilar (ALTER *et al.*, 2011).

A pesquisa sobre a genética humana das doenças infecciosas tem contribuído para o entendimento da resposta imune direcionada ao *M. leprae* a partir dos estudos de associação baseados em população ou famílias e estudos funcionais que buscam identificar possíveis genes candidatos e a influência de polimorfismos comuns em vias de resposta imunológica (ALCAÏS *et al.*, 2005). Apesar de a hipótese genética das doenças infecciosas ser uma mudança no paradigma, ela não faz oposição à teoria microbiana das doenças uma vez que no curso da hanseníase o bacilo não é herdado, mas sim a predisposição à infecção e ao adoecimento (SPEICHER; ANTONARAKIS; MOTULSKY, 2010).

3.5 A influência do TLR na suscetibilidade à Hanseníase e seu papel nas vias imunológicas

Como genes candidatos que têm atraído grande atenção por seu papel na detecção das lipoglicanas, lipomananas e lipoarabinomanana das micobactérias e na ativação de macrófagos durante a infecção pelo *M. leprae*, os genes da família TLR já foram investigados e associados à suscetibilidade e resistência à infecção bacteriana em diferentes populações. Em especial, estudos do gene TLR1, localizado no cromossomo 4p14, mostraram que o SNP

G743A, também identificado como rs4833095, uma variante *missense*⁴, esteve relacionado com a suscetibilidade à hanseníase na população indiana e brasileira (SCHURING *et al.*, 2009). Outro polimorfismo, o rs5743618, também uma variante *missense*, teve o genótipo homozigoto 602S relacionado à diminuição da incidência de hanseníase e proteção nas populações da Turquia (JOHNSON *et al.*, 2007) e Índia (WONG *et al.*, 2010), resultado que não se repetiu nas populações de Bauru e da Microrregião de Almenara em Minas Gerais, Brasil (MARQUES *et al.*, 2013).

A descoberta dos receptores do tipo *Toll* (TLR) teve início em 1989, quando Charles Janeway propôs que as células reconheciam patógenos através de um padrão, ou seja, as células do hospedeiro dispunham de receptores que se ligavam a estruturas denominadas PAMP. Dez anos após a proposta de Janeway, ocorreu a descoberta do primeiro receptor de reconhecimento de padrão em drosófilas; nesta espécie, também conhecida como mosca das frutas, cientistas identificaram um gene que codificava um receptor de membrana que denominaram Toll. Posteriormente, estudos apontaram que mutações com prejuízo na função do Toll tornaram as drosófilas suscetíveis a infecções por fungos (CHRISTMAS, 2010). Logo, foi descoberto um homólogo do receptor em mamíferos e agora sabe-se que humanos possuem pelo menos 11 tipos diferentes desse receptor e que a família de TLR constitui uma importante defesa contra infecção (TAKEDA; AKIRA, 2005).

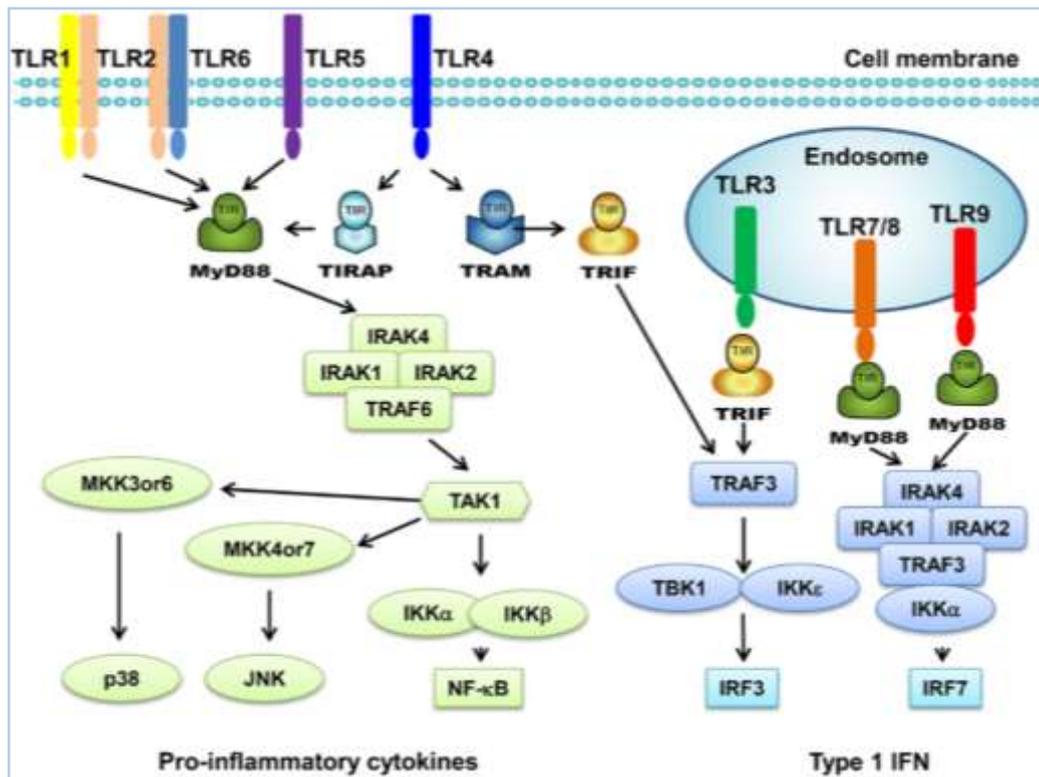
Os TLR podem detectar um amplo número de patógenos humanos, atuando na resposta imune inata e adaptativa. Por constituírem a linha de frente na resposta a sinais de perigo, os TLR são centralmente significantes (CHRISTMAS, 2010). Essa família de receptores é altamente específica e reconhece os PAMP, expressados por patógenos microbianos, e os padrões moleculares associados a danos (DAMP), moléculas endógenas liberadas no processo de morte celular ou necrose. Os PAMP incluem vários componentes da parede celular como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos (PGN) e lipopeptídeos, flagelinas, DNA bacteriano e RNA (ácido ribonucleico) viral. Os DAMP por sua vez incluem proteínas intracelulares como as proteínas *heat shock* e fragmentos proteicos da matriz extracelular (TOLL-LIKE RECEPTORS REVIEW, 2012).

Os TLR estão presentes em tecidos que envolvem a função imune e também são encontrados nos pulmões e no trato gastrointestinal (TOLL-LIKE RECEPTORS REVIEW, 2012). Sua estrutura consiste em proteínas com domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático. O domínio extracelular é responsável pelo reconhecimento do ligante e pela

⁴ Substituição de um único nucleotídeo na sequência do DNA que resulta na tradução de um aminoácido diferente com mudança no produto proteico final (US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2016).

transdução de sinal. A porção citoplasmática, também denominada de domínio TIR, é responsável pela sinalização via moléculas adaptadoras como a MyD88, TIRAP/Mal, TRIF e TRAM. Os diferentes tipos de adaptadores presentes no domínio TIR provêm a especificidade das vias de sinalização mediadas pelos diferentes tipos de TLR (TAKEDA; AKIRA, 2005).

Figura 2 – Receptores do tipo Toll e vias de sinalização mediadas pelo TLR



Fonte: ZHAO *et al.*, 2014.

A sinalização pelos TLR conduz a resposta inata aos patógenos e ocorre pela ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-κB) e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP) p38 e JNK com consequente aumento da expressão de genes pró-inflamatórios. Uma segunda via de sinalização se dá pela ativação do NF-κB e do fator regulatório do interferon, permitindo a indução adicional de vários genes como o interferon-β (IFN-β) (O'NEILL, 2004). A expressão de genes das moléculas coestimulatórias e citocinas inflamatórias vai instruir o desenvolvimento da imunidade adaptativa antígeno-específica, especialmente a resposta Th1 (TAKEDA; AKIRA, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

A fim de averiguar a associação do polimorfismo G743A do gene TLR1 com a suscetibilidade à hanseníase, conduziu-se um estudo com abordagem quantitativa, observacional e delineamento caso-controle, utilizando base populacional com dados obtidos no projeto “Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*”, realizado na microrregião de Almenara, Minas Gerais, em 2011 e 2014 e vinculado ao Grupo de Pesquisa NEPHANS.

O projeto referido propunha o estudo de polimorfismos genéticos através de estudos de associação genética com diferentes metodologias, sendo elas o Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) e o Caso-controle. O TDT foi o primeiro, realizado em 2012, com resultados reportados na Tese de Doutorado **Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase na população da Microrregião de Almenara, Minas Gerais** (AMARAL, 2012) e no artigo “Toll-like receptor 1 (TLR1) N248S single nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection”, publicado na revista **Journal of Infectious Diseases** (MARQUES *et al.*, 2013). O presente estudo, portanto, ao utilizar o delineamento Caso-controle, cumpre a segunda etapa do projeto já citado.

4.1 A Microrregião de Almenara como Cenário de Estudo

O Vale do Jequitinhonha é uma mesorregião mineira composta por cinco microrregiões, como apresentado no Mapa 3 a seguir. Dentre elas está a Microrregião de Almenara, que abrange 16 municípios: Almenara, Bandeira, Divisópolis, Felisburgo, Jacinto, Jequitinhonha, Joáima, Jordânia, Mata Verde, Monte Formoso, Palmópolis, Rio do Prado, Rubim, Salto da Divisa, Santa Maria do Salto e Santo Antônio do Jacinto. Com economia baseada em serviços e na atividade agropecuária, esses municípios possuem um baixo índice de desenvolvimento socioeconômico e população que varia entre cinco e doze mil habitantes, com exceção de Almenara, principal cidade da Microrregião, com quase 39 mil habitantes e o melhor desenvolvimento econômico entre as demais cidades (IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística).

Mapa 3 – Mapa das Microrregiões de Minas Gerais com destaque para a Microrregião de Almenara



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

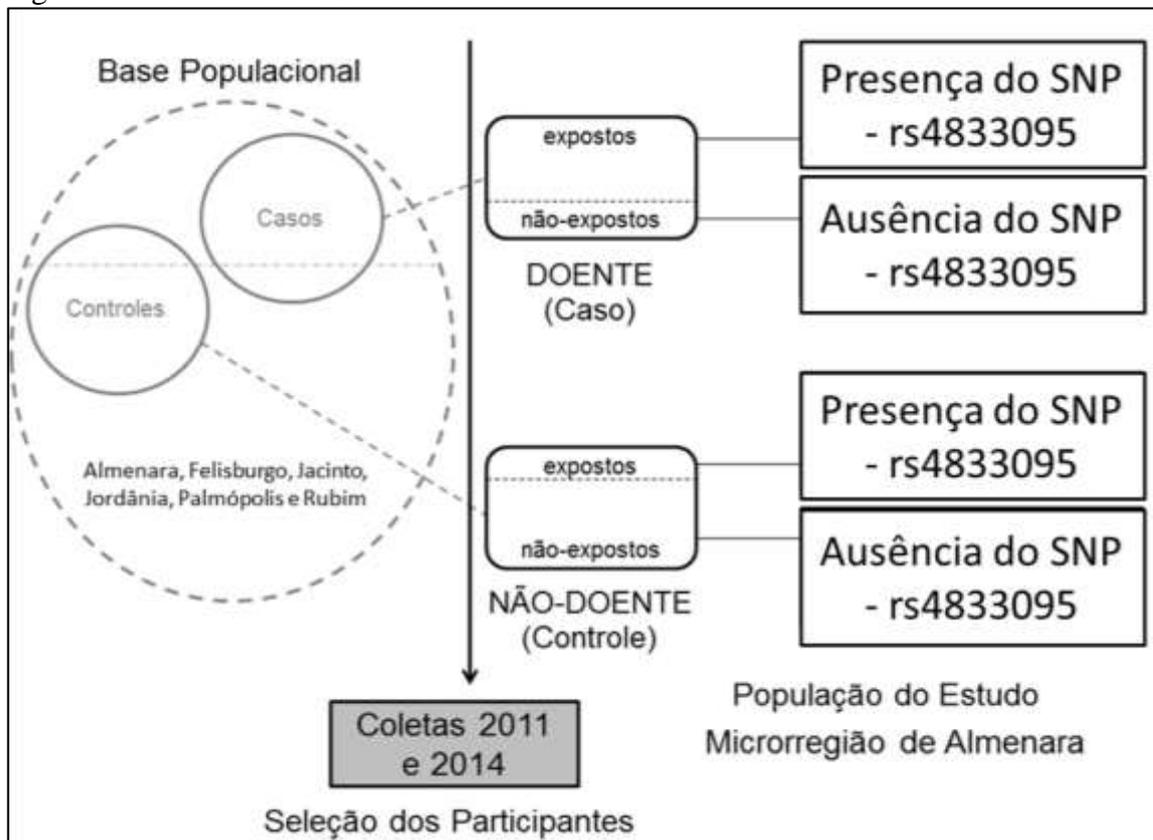
Na Microrregião de Almenara, dos 16 municípios que a compõem, 14 estão presentes em *cluster* de alto risco de detecção da doença, denominado *cluster* seis. São eles: Almenara, Bandeira, Felisburgo, Jacinto, Jequitinhonha, Joáima, Jordânia, Monte Formoso, Palmópolis, Rio do Prado, Rubim, Salto da Divisa, Santa Maria do Salto e Santo Antônio do Jacinto. O *cluster* seis, anteriormente denominado *cluster* 4, compreende municípios de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo, todos com grande concentração de casos em áreas com pouca população e altos coeficientes de detecção de casos novos (BRASIL, 2010a).

Uma pesquisa ecológica realizada por Amaral e Lana (2008) trouxe a média dos coeficientes de detecção de cada município da Microrregião entre os anos de 1998 e 2006. Como resultado percebeu-se que a detecção média nestas cidades foram as mais altas do Vale do Jequitinhonha, sendo os municípios de Almenara, Felisburgo, Jacinto, Jordânia, Palmópolis, Rubim e Santa Maria do Salto aqueles com as mais altas médias de detecção dentro da Microrregião. Com base na relevância epidemiológica, os municípios que compuseram o cenário do presente estudo foram: Almenara, Felisburgo, Jacinto, Jordânia, Palmópolis e Rubim.

4.2 Delineamento Caso-controle

Assim como outros estudos observacionais, o estudo de caso-controle mede a associação entre exposição e doença; entretanto, sua particularidade está na seleção dos sujeitos, que se baseia na ocorrência ou não de um desfecho (ASCHENGRAU; SEAGE, 2007). Nos estudos de caso-controle genéticos, procura-se, especificamente, inferir causalidade entre a exposição a um marcador genético com o fenótipo de doença ou sua severidade (PACHECO; MORAES, 2009). A figura abaixo mostra o delineamento deste trabalho com base nas características de um estudo caso-controle.

Figura 3 - Delineamento Caso-controle



Fonte: NADANOVSKY; COSTA; RAGGIO, 2008. (Adaptado)

O caso-controle de base populacional é desenvolvido recrutando-se dois grupos de indivíduos, aqueles que foram identificados com a doença, denominados casos, e outros selecionados da população que deu origem aos casos, mas que não estão doentes. Para ambos os grupos, o fator de exposição, juntamente com outras covariáveis, é comparado a fim de determinar uma medida da associação entre a exposição e a doença (PACHECO; MORAES, 2009).

4.3 Os sujeitos de pesquisa: seleção, recrutamento e coleta de dados

O método utilizado para a seleção da amostra de casos e controles foi não-probabilístico, constituindo-se uma amostragem de conveniência.

O grupo de casos foi composto por indivíduos diagnosticados com hanseníase e selecionados após consulta ao banco de dados do Sistema de Informação Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), disponibilizado pela Coordenadoria Estadual de Dermatologia Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais (SES/MG). Nas situações em que o registro do caso não constava no SINAN, recorreu-se aos arquivos dos serviços de saúde.

Foram priorizados aqueles que residiam na zona urbana devido ao quantitativo de visitas e à dificuldade de deslocamento e dispersão das residências localizadas na zona rural. Ainda assim, indivíduos pertencentes aos distritos de Pedra Grande, Avaí do Jacinto e Itapiru, áreas consideradas rurais, foram incluídos pela expressividade do número de casos registrados.

O grupo de controles foi composto por indivíduos que tiveram contato domiciliar com os casos de hanseníase selecionados para o estudo. Considerou-se contato domiciliar aqueles que residiram com o indivíduo doente na data do diagnóstico ou até cinco anos antes, compartilhando o mesmo domicílio ou terreno. Algo a ser pontuado na escolha dos controles a partir dos contatos domiciliares de casos de hanseníase é que, no contexto das doenças infecciosas, a avaliação do perfil genético de proteção ou suscetibilidade requer que todos os controles tenham sido expostos ao menos uma vez ao agente etiológico senão seria impossível afirmar que os controles não adoeceram simplesmente porque não tiveram contato com o *M. leprae*. Apesar de não ser possível afirmar categoricamente se alguém foi exposto ou não, uma das maneiras de aumentar a chance de exposição ao bacilo é utilizar os contatos domiciliares dos doentes, garantindo que os controles sejam escolhidos na população que deu origem aos casos. O uso desta estratégia é uma maneira de conduzir um estudo de epidemiologia genética das doenças infecciosas com menor probabilidade de viés e perda de poder (PACHECO; MORAES, 2009).

Os critérios utilizados para a seleção dos casos e controles seguem descritos no quadro a seguir:

Quadro 1 – Critérios de seleção de Casos e Controles

| Critérios de Seleção | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CASOS | |
| Critérios de Inclusão | Critérios de Exclusão |
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Diagnóstico de Hanseníase entre janeiro de 2001 e julho de 2014; ○ Residir em Almenara, Felisburgo, Jacinto, Jordânia, Palmópolis e Rubim no período da coleta de dados; ○ Idade igual ou superior a sete anos; ○ Aceite da coleta de sangue. | <ul style="list-style-type: none"> ○ Residir em outro município que não os selecionados para o estudo; ○ Idade inferior a sete anos; ○ Recusa em coletar sangue; ○ Coleta de sangue sem sucesso. |
| CONTROLES | |
| Critérios de Inclusão | Critérios de Exclusão |
| <ul style="list-style-type: none"> ○ Residir com o caso de hanseníase em mesmo domicílio ou terreno na época do diagnóstico ou até cinco anos antes; ○ Ausência de parentesco consanguíneo com o caso; ○ Idade igual ou superior a sete anos; ○ Nunca ter tido hanseníase; ○ Aceite da coleta de sangue. | <ul style="list-style-type: none"> ○ Ter residido com o caso há mais de cinco anos antes da data de diagnóstico; ○ Iniciar o compartilhamento do domicílio ou terreno somente após a data de diagnóstico; ○ Residir fora dos municípios selecionados; ○ Possuir problema mental que impossibilite o discernimento; ○ Parentesco consanguíneo de até terceiro grau; ○ Idade inferior a sete anos; ○ Recusa em coletar sangue; ○ Coleta de sangue sem sucesso. |

Fonte: Elaboração própria.

O recrutamento dos sujeitos e a coleta dos dados ocorreram no primeiro semestre de 2011 e entre os meses de junho e julho de 2014. Antes da coleta de dados houve reuniões com profissionais de saúde e gestores dos municípios selecionados no intuito de apresentar os objetivos e a metodologia da pesquisa, planejar e articular a execução do estudo, assegurando o sigilo das informações relacionadas ao caso de hanseníase.

A primeira abordagem era direcionada ao caso de hanseníase e realizada pelo Agente Comunitário de Saúde (ACS) que contactava todos cujo domicílio pertencia à

microárea de sua responsabilidade e fornecia informações acerca das características gerais do estudo, solicitando autorização verbal para a visita da equipe de pesquisadores, um pré-requisito para essa visita.

Durante a visita, o caso era questionado acerca do contato domiciliar com outras pessoas na mesma residência ou terreno na época do diagnóstico ou até cinco anos antes. Os contatos domiciliares informados eram visitados quando havia autorização verbal para tal e no caso de o contato ainda residir no município.

Todos os sujeitos eram informados acerca dos objetivos da pesquisa, das etapas da coleta de dados e da garantia do anonimato e, posteriormente, convidados a participar voluntariamente. Para aqueles que aceitaram, foi procedida a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

A identificação dos sujeitos realizou-se pela atribuição de códigos alfanuméricos individuais com identificação de caso, domicílio e contato domiciliar. Para casos ou controles aplicou-se um questionário semiestruturado específico no qual havia questões relativas a informações sociodemográficas, de saúde e epidemiológicas (APÊNDICE B).

No questionário direcionado ao caso, campos voltados para as especificidades da doença foram preenchidos após consulta das informações disponíveis no SINAN ou em prontuário médico, quando disponível.

Após aplicação do questionário, procedeu-se a exame clínico dermatoneurológico nos contatos domiciliares sem histórico de hanseníase a fim de investigar a presença de sinais sugestivos da doença. O exame consistia na:

1. Avaliação e registro de queixas;
2. Avaliação dermatológica;
3. Avaliação neurológica por inspeção e palpação dos nervos radial, ulnar, mediano, fibular e fibular posterior;
4. Avaliação da força muscular em pálpebras, músculos abdutor do quinto dedo, abdutor do polegar, extensão do punho, tibial anterior, extensor do hálux e fibulares longos e curtos;
5. Teste de avaliação da sensibilidade em mãos e pés utilizando estesiômetro.

Os sinais suspeitos da doença que incluíam queixas, alterações dermatológicas, alterações percebidas na palpação dos nervos, na avaliação da força muscular ou no teste de sensibilidade com estesiômetro eram registrados em formulário próprio (APÊNDICE C), encaminhado ao serviço de saúde de referência do município para confirmação diagnóstica.

Amostras de 4 mililitros (ml) de sangue total foram coletadas de casos e contatos domiciliares, utilizando-se como referência protocolo próprio (APÊNDICE D).

Ao finalizar a visita, a equipe orientava todos da residência acerca da forma de transmissão da hanseníase, seus sinais e sintomas, tratamento e procura do serviço de saúde local na ocorrência de suspeita da doença.

4.4 Variáveis de estudo

A variável dependente foi a ocorrência ou não da hanseníase *per se* entre os casos e controles. As variáveis independentes foram a presença do SNP G743A (rs4833095) do gene TLR1 e o sexo.

A escolha do SNP G743A do gene TLR1 partiu da necessidade de se confirmar associações reportadas em estudos com outras populações e diferentes metodologias presentes nas bases de dados disponibilizadas pelo Portal de Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

As variáveis utilizadas na análise descritiva foram:

- a) Variáveis sociodemográficas:
 - sexo (masculino, feminino);
 - faixa etária (anos);
 - cor de pele autorreferida (branca, preta, amarela, parda, indígena, outros).
- b) Condições de moradia:
 - número de cômodos no domicílio;
 - número de dormitórios no domicílio.
- c) Informações epidemiológicas:
 - vacinação por BCG (cicatriz vacinal);
 - histórico de infecções parasitárias (esquistossomose e helmintoses).
- d) Aspectos clínicos da hanseníase entre os casos:
 - classificação operacional (paucibacilar, multibacilar);
 - forma clínica de Madri (indeterminada, tuberculoide, dimorfa, virchowiana);
 - bacilospia (positiva, negativa);
 - grau de incapacidade física no diagnóstico (grau 0, grau 1, grau 2);
 - ocorrência de episódio reacional (reação reversa, eritema nodoso hansênico).
- e) Características de convívio com casos da doença entre controles:

- situação de contato (residia com o caso índice na data do diagnóstico e reside atualmente; residia com o caso índice na data do diagnóstico; residia com o caso índice diagnóstico antes da data do diagnóstico até cinco anos);
- característica da convivência (dorme no mesmo terreno; dorme no mesmo domicílio; dorme no mesmo cômodo);
- contato domiciliar de mais de um caso de hanseníase.

4.5 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras de sangue total foi realizada no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ), utilizando-se o Kit Qiagen Flexigene (número da categoria 51206). Os detalhes do protocolo de extração estão especificados no APÊNDICE E.

Após a extração, as amostras de DNA foram submetidas ao Espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 para quantificação dos ácidos nucleicos e avaliação da pureza por densidade óptica, estabelecendo como satisfatório grau de pureza, ou relação 260/280 nm (nanômetros), de aproximadamente 1,8.

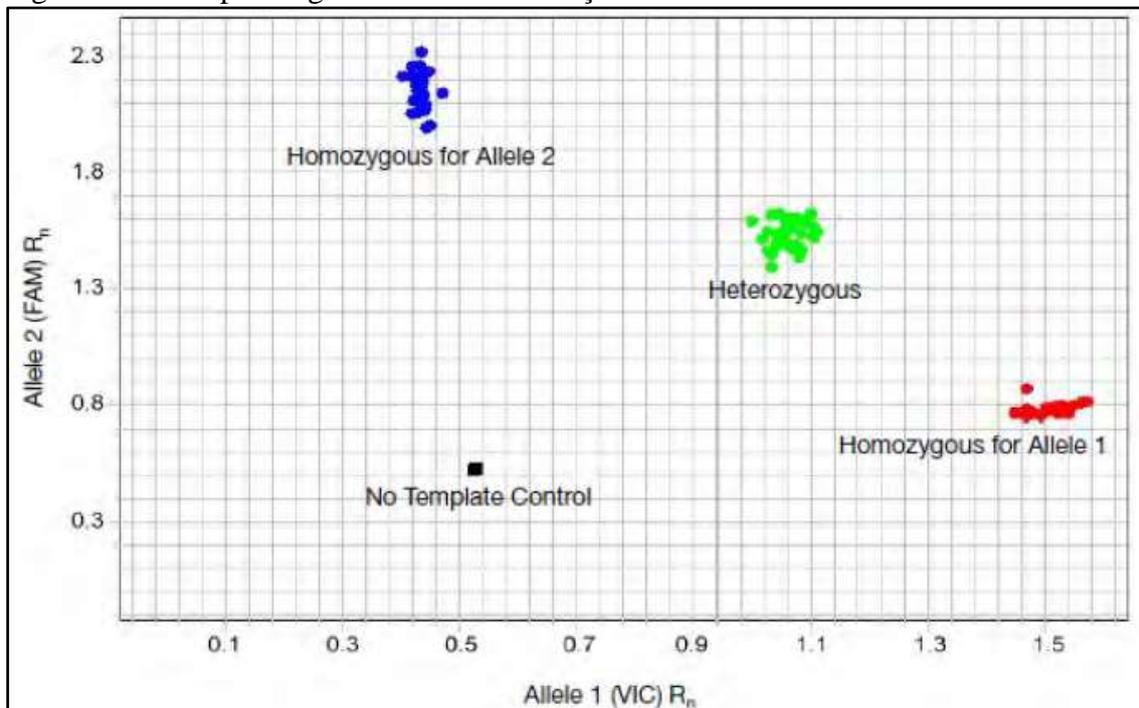
4.6 Método de genotipagem

Após isolar o DNA das amostras, a genotipagem envolveu a discriminação alélica e foi realizada por meio da amplificação dos fragmentos de DNA pelo método Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real através do sistema TaqMan®, utilizando ensaios com dois *primers* cada e duas sondas correspondentes ao SNP de interesse. Para detecção das variantes alélicas, a presença ou ausência do SNP era determinada a partir da mudança nos sinais de fluorescência da sequência-alvo amplificada e obtidos a partir dos corantes fluorescentes VIC e FAM ligados à extremidade 5' da sonda e de um *quencher* não fluorescente na extremidade 3'.

Num primeiro momento, a proximidade do *quencher* com o corante repórter impede os sinais de fluorescência; no entanto, a partir da clivagem exercida pela polimerase e a amplificação da sequência-alvo complementar à sonda, ocorre o desligamento do *quencher* não fluorescente, aumentando a fluorescência do corante repórter e indicando os alelos da amostra.

A Figura 4 abaixo apresenta o resultado da reação de PCR em Tempo Real, demonstrado em gráfico de discriminação alélica.

Figura 4 – Exemplo de gráfico de discriminação alélica



Fonte: LIFE TECHNOLOGIES, 2014.

Na Figura 4, os pontos azuis são as amostras cujo genótipo é homozigoto para o alelo 2 (FAM); os pontos verdes são as amostras heterozigotas (FAM e VIC); os pontos vermelhos, as amostras homozigotas para o alelo 1 (VIC). O ponto preto representa o controle negativo, ou seja, reação utilizada para assegurar reagentes livres de contaminação por DNA. Dando como exemplo o presente estudo, para o SNP N248S (rs4833095) teríamos nos pontos azuis os homozigotos S/S, nos pontos verdes os heterozigotos N/S e nos pontos vermelhos os homozigotos N/N.

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas no *7500 Real Time PCR System* disponibilizado pelo Laboratório de Parasitologia, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.7 Análise dos dados

O banco de dados com as informações referentes de casos e controles foi elaborado após a conclusão das Coletas de 2011 e 2014 e utilizou-se o *Software Epi Info*

versão 7.1.4. A fim de evitar inconsistências e garantir maior confiabilidade das informações, foi realizada entrada dupla dos dados, revisão e correção de erros de digitação.

Para o presente estudo, foi utilizado o *software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS versão 9.0) para as análises de estatística descritiva. O teste de Qui-quadrado (x²) foi realizado para avaliar a concordância com o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, com significância estatística indicada por p valor menor que 0,05 e o *odds ratio* foi calculado com seu respectivo intervalo de confiança de 95% para avaliar o efeito do polimorfismo na suscetibilidade à hanseníase *per se* ou suas formas clínicas. Para estas análises utilizou-se o *software R* com o pacote *SNPassoc*. Para controlar possíveis variáveis de confusão decorrentes do não pareamento da amostra para sexo e idade, foi feita uma análise multivariada por regressão logística, ajustada para idade e estratificada por sexo.

4.8 Aspectos éticos e financiamento

O presente estudo foi submetido à análise e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMG (COEP-UFMG), em 2010, por meio do parecer ETIC n. 454/10 (ANEXO A) e atende às determinações da Resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, que dá diretrizes e regulamenta a pesquisa com seres humanos.

O financiamento foi feito pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Ministério da Saúde.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo foram divididos em tópicos de acordo com os objetivos propostos, ou seja, primeiramente, uma análise descritiva de casos e controles conforme informações socioeconômicas, informações sobre o domicílio e variáveis epidemiológicas, seguida das características clínicas da doença entre os casos e características de contato com casos da doença entre controles. O último tópico traz a análise da associação do SNP G743S do gene TLR1 com a hanseníase *per se*.

5.1 Análise descritiva de Casos e Controles

A amostra deste estudo foi composta por 467 indivíduos, distribuídos em 234 casos e 233 controles distribuídos nos municípios de Almenara, Felisburgo, Jacinto, Jordânia, Palmópolis e Rubim, em proporções muito semelhantes.

5.1.1 Variáveis demográficas

A amostra compunha-se de 223 homens (47,8%) e 244 mulheres (52,2%). A idade mínima entre os participantes foi de 7 anos, conforme critério de inclusão no estudo, e a máxima foi de 109 anos com mediana de 49 anos. As frequências absolutas e relativas das variáveis sexo, idade e cor da pele estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise descritiva das variáveis sociodemográficas

| Variáveis | Casos | | Controles | | Total |
|---------------------|-------|------|-----------|------|-------|
| | n | % | n | % | |
| Sexo | | | | | |
| Masculino | 131 | 56 | 92 | 39,5 | 223 |
| Feminino | 103 | 44 | 141 | 60,5 | 244 |
| Faixa etária | | | | | |
| 7 a 14 anos | 4 | 1,7 | 6 | 2,6 | 10 |
| 15 a 29 anos | 39 | 16,7 | 34 | 14,6 | 73 |

Tabela 1 (continuação) - Análise descritiva das variáveis sociodemográficas

| | | | | | |
|--------------------|-----|------|-----|------|-----|
| 30 a 54 anos | 93 | 39,7 | 98 | 42,1 | 191 |
| ≥ 55 anos | 98 | 41,9 | 95 | 40,8 | 193 |
| Cor da pele | | | | | |
| Branca | 35 | 15 | 37 | 15,9 | 72 |
| Preta | 22 | 9,4 | 13 | 5,6 | 35 |
| Parda | 118 | 50,4 | 135 | 57,9 | 253 |
| Indígena | 1 | 0,4 | 1 | 0,4 | 2 |
| Ignorado | 58 | 24,8 | 47 | 20,2 | 105 |
| Total | 234 | 100 | 233 | 100 | 467 |

Fonte: Elaboração própria.

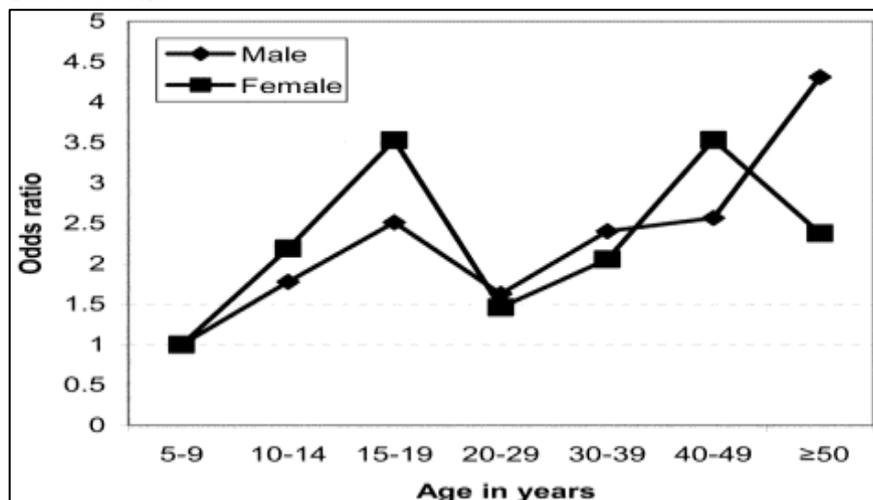
Conforme a Tabela 1, a frequência de homens é maior entre o grupo de casos em relação ao grupo controle, sendo o sexo feminino mais representado nos controles. Entre os casos de hanseníase na população brasileira, é notável o predomínio de homens. Um estudo do Ministério da Saúde observou que os coeficientes de detecção entre os sexos no período de 2001 a 2007 foram de 28,94/100.000 habitantes para o sexo masculino e de 22,63/100.000 para o sexo feminino (BRASIL, 2008). Vale ressaltar que a variável sexo entre os casos da doença é influenciada por uma maior tendência da forma multibacilar em homens, ou seja, em locais onde há predomínio da forma multibacilar ocorre, portanto, uma maior frequência do sexo masculino entre os casos da doença (WHO, 2012). Entretanto, essa observação é empírica e possivelmente influenciada por questões culturais.

Em doenças como a hanseníase, leishmaniose e leptospirose, as diferenças na incidência entre os sexos são contrastantes, o que também é observado em outras espécies de mamíferos. A hipótese fisiológica propõe que as interações dos hormônios sexuais com o sistema imune são a base para diferenças na suscetibilidade entre homens e mulheres: nas situações em que a precipitação de respostas imunes mais eficientes relaciona-se à patogênese, o sexo feminino é mais afetado uma vez que o estrogênio suprarregula as respostas imunológicas. Em contrapartida, a testosterona parece ter efeito inverso, pois

infrarregula as respostas imunes, o que propicia ao sexo masculino uma maior suscetibilidade a infecções mais graves. Ao discorrer sobre a suscetibilidade entre gêneros, há que se levar em consideração também a hipótese comportamental. Ela estipula que a exposição ao agente etiológico difere entre os sexos devido a diferenças de comportamento entre homens e mulheres. Na realidade, ambas as hipóteses cooperam mutuamente na suscetibilidade à infecção no sexo masculino. É esperado, entretanto, que na terceira idade as diferenças entre os sexos diminuam devido à queda dos níveis de hormônios femininos entre mulheres, uma vez que os níveis de andrógenos permanecem inalterados nos homens (GUERRA-SILVEIRA; ABAD-FRACH, 2013).

A variável faixa etária, categorizada em intervalos de idade, revela que na amostra a maioria é de adultos com idade superior a 29 anos. Ao se observar a distribuição da incidência de hanseníase nas diferentes faixas etárias, percebe-se que entre 10 e 15 anos ocorre um aumento na incidência da doença. Entre 16 e 29 anos a ocorrência da patologia vai diminuindo até iniciar novamente um aumento e platô que se segue dos 30 aos 60 anos de idade (MOET *et al.*, 2004). Essa distribuição é exemplificada no gráfico abaixo, que traz a chance de hanseníase clínica em diferentes faixas etárias.

Gráfico 1 – Razão de *odds* para hanseníase em contatos, por idade e sexo



Fonte: MOET *et al.*, 2006.

Neste estudo, observou-se que houve uma maior concentração de indivíduos na faixa etária de 7 a 29 anos no grupo de casos de hanseníase quando comparado ao grupo de controles. A literatura aponta que há uma relação entre o desenvolvimento de hanseníase clínica e a idade da primeira exposição ao bacilo; portanto, em áreas hiperendêmicas, como a Microrregião de Almenara, cenário deste estudo, é comum que se observem casos da doença

em crianças e jovens. A incidência da hanseníase em indivíduos jovens denota a presença de transmissão ativa da infecção na comunidade, ou seja, casos da doença ainda não identificados e sem tratamento. Por isso, a importância da investigação de sinais sugestivos da doença em contatos domiciliares, possibilitando o diagnóstico precoce. Infelizmente, em nosso país, a proporção de exame de contatos, como já citado, é de apenas 58%, o que corrobora para a permanência da transmissão e ocorrência de casos novos com detecção em indivíduos menores de 15 anos (BRASIL, 2012).

A cor de pele mais referida entre casos e controles foi a parda, seguida pela branca e preta. Apenas um caso e um controle referiram a cor indígena. Nota-se que a obtenção de informação acerca da cor de pele não teve 100% de abrangência na amostra: em 22,5% dos indivíduos este dado foi ignorado. Comparativamente, no Brasil, conforme o censo realizado pelo IBGE em 2008, a maioria da população se autodeclarou branca (49%), seguido por 35,3% que se declarou pardo ou moreno e 9,2%, negro ou preto (IBGE, 2008). Há que se pontuar que por ser uma variável autorreferida, a cor de pele é passível de viés de informação.

Recentemente, estudos utilizando uma variedade de marcadores genéticos indicou que indivíduos amostrados em todo o mundo formavam *clusters* que correspondiam às linhas continentais, bem como aos grupos de raça autorreferida, como, por exemplo, africanos, europeus e nativos americanos. Mas, dentro dos países, a estratificação da população a partir de um contexto histórico, político e social torna a estrutura genética extremamente complexa. Esta estrutura pode, inclusive, trazer como consequência a possibilidade de confusão em estudos de epidemiologia genética, principalmente os de caso-controle. Por isso, há a necessidade de ajuste para esta variável (TANG *et al.*, 2005).

5.1.2 Características domiciliares

A análise descritiva das condições de moradia foram distribuídas nas variáveis número de cômodos no domicílio e número de dormitórios. Na amostra, a média de cômodos por domicílio, tanto para casos como para controles, foi de 6. O número mínimo encontrado foi de um cômodo e o máximo de 17. O número de dormitórios variou entre um e 12 quartos, com média geral de dois dormitórios no domicílio de casos e controles.

Tabela 2 - Análise descritiva das condições de moradia

| Variáveis | Casos | | Controles | | Total |
|--------------------------|-------|------|-----------|------|-------|
| | n | % | n | % | n |
| Nº de cômodos | | | | | |
| Até 4 | 43 | 18,4 | 24 | 10,3 | 67 |
| ≥ 5 | 191 | 81,6 | 209 | 89,7 | 400 |
| Nº de dormitórios | | | | | |
| 1 | 38 | 16,2 | 38 | 16,3 | 76 |
| 2 | 95 | 40,6 | 90 | 38,6 | 185 |
| ≥ 3 | 101 | 43,2 | 105 | 45,1 | 206 |
| Total | 234 | 100 | 233 | 100 | 467 |

Fonte: Elaboração própria.

A Tabela 2 mostra que a maior parte dos sujeitos residia em domicílios com cinco ou mais cômodos. Entre os que moravam em domicílios com até quatro cômodos, a maioria era de casos (64,2%). Dos que residiam em domicílios com cinco cômodos ou mais, 47,8% eram casos de hanseníase e 52,2% eram controles. Quanto ao número de dormitórios, houve pouca diferença nas frequências entre casos e controles, observa-se que 56,8% dos casos e 54,9% dos controles moravam em residências com até dois quartos.

Conforme Brasil (2010a), a partir dos resultados dos estudos epidemiológicos que apontam as variáveis que influenciam a incidência da doença, “sem dúvida, a dinâmica epidemiológica da hanseníase é determinada pelas condições socioeconômicas das populações”. Domicílios com poucos cômodos e/ou menos dormitórios podem sugerir um aglomerado de pessoas em um espaço pequeno e também maior proximidade no contato domiciliar entre os residentes. Apesar de os fatores genéticos e imunológicos influenciarem a suscetibilidade individual à hanseníase, outros fatores relacionados às condições socioeconômicas - em especial à precariedade das condições de moradia, exemplificado pela proporção de casos de hanseníase da amostra que vivem em domicílios de até quatro cômodos - também influenciam no risco de adoecer por propiciarem transmissão facilitada do *M. leprae* entre os moradores uma vez que há evidências de aumento do risco de transmissão da

infecção com o aumento da proximidade com alguém infectado (MOET *et al.*, 2004). Além disso, boas condições de moradia estão associadas à redução no risco de hanseníase, efeito observado, sobretudo, entre indivíduos jovens. Por isso, a condição dos domicílios tem demonstrado ser um fator ambiental importante na transmissão do *M. leprae* (PONNIGHAUS *et al.*, 1994).

5.1.3 Variáveis epidemiológicas: helmintoses e histórico vacinal de BCG

Neste estudo, casos e controles foram questionados quanto ao histórico de parasitoses, discriminadas em esquistossomose e outras helmintoses. O estado de Minas Gerais possui a maior área endêmica de esquistossomose do país, sendo as regiões Norte e Leste do estado as mais afetadas, exatamente onde se localizam também os municípios da Microrregião de Almenara. Sabe-se que as helmintoses, assim como a hanseníase, são mais frequentes em populações pobres, podendo haver nessas comunidades a coexistência de endemias (BRASIL, 2011). A Tabela 3 traz a análise descritiva de esquistossomose e outras helmintoses em casos e controles.

Tabela 3 - Histórico de helmintoses

| Variáveis | Casos | | Controles | | Total |
|---------------------------|-------|------|-----------|------|-------|
| | n | % | n | % | |
| Esquistossomose | | | | | |
| Sim | 16 | 6,8 | 15 | 6,4 | 31 |
| Não | 218 | 93,2 | 218 | 93,6 | 436 |
| Outras helmintoses | | | | | |
| Sim | 7 | 3 | 9 | 3,9 | 16 |
| Não | 227 | 97 | 224 | 96,1 | 451 |
| Total | 234 | 100 | 233 | 100 | 467 |

Fonte: Elaboração própria.

No geral, a frequência de esquistossomose entre os sujeitos do estudo foi de, aproximadamente, 6%, enquanto as outras helmintoses tiveram frequência de 3%. O histórico

de esquistossomose foi um pouco mais frequente nos casos, enquanto as demais helmintoses foram mais frequentes no grupo controle. É necessário ressaltar que esses resultados devem ser tratados com cautela, pois se constituem numa morbidade referida e não comprovada por testes diagnósticos. o que traduz uma limitação no uso dessas informações.

Um estudo de revisão sistemática verificou os efeitos da coinfeção de tuberculose e doenças parasitárias relatados nas publicações científicas, mostrando que a coinfeção pode inibir determinados padrões de resposta imune do hospedeiro, aumentar a intolerância à antibioticoterapia e prejudicar o prognóstico da doença. Além disso, a infecção por parasitas, incluindo a esquistossomose, pode alterar a resposta imune protetora à vacinação com o Bacillus Calmette-Guérin (BCG), comprometendo sua eficácia (LI; ZHOU, 2013). Este achado é relevante na medida em que a BCG é administrada a contatos domiciliares de hanseníase com a finalidade de proteger contra a doença. Entretanto, são necessários mais estudos que verifiquem o risco de hanseníase e mecanismos imunológicos que conferem suscetibilidade atribuível à coinfeção por helmintos.

O histórico vacinal de BCG em casos e controles é mostrado na Tabela 4 através das frequências absoluta e relativa do número de cicatrizes vacinais.

Tabela 4 - Histórico vacinal de BCG

| Variável | Casos | | Controles | | Total |
|-------------------------|-------|------|-----------|------|-------|
| | n | % | n | % | n |
| Cicatriz vacinal | | | | | |
| 0 | 143 | 61,1 | 55 | 23,6 | 198 |
| 1 | 72 | 30,8 | 131 | 56,2 | 203 |
| 2 | 16 | 6,8 | 47 | 20,2 | 63 |
| Ignorado | 3 | 1,3 | 0 | 0 | 3 |
| Total | 234 | 100 | 233 | 100 | 467 |

Fonte: Elaboração própria.

Do total de indivíduos que constituíram a amostra, 42,4% não possuíam cicatriz vacinal, ou seja, possivelmente não receberam a vacina BCG. Houve diferenças na quantidade de cicatriz vacinal entre casos e controles: entre os casos, mais da metade (61,1%) não tinha cicatriz vacinal; entre controles esta situação foi frequente em 23,6% dos sujeitos. Nos indivíduos vacinados, a presença de uma cicatriz foi o achado mais frequente tanto em casos

como em controles. Em três indivíduos, a informação acerca da cicatriz vacinal estava ausente.

A vacina BCG foi inicialmente desenvolvida com a finalidade de proteger contra a tuberculose; posteriormente, estudos observaram efeito protetor também para a hanseníase com eficácia de 80% para contatos domiciliares de casos da doença. Verificou-se também que o efeito de proteção da BCG é aumentado na segunda dose da vacina. Apesar disso, o grau de sua eficácia e o número de doses requerem mais estudos para completa elucidação (BARRETO; PEREIRA; FERREIRA, 2006). É interessante notar que, entre os casos da doença que compunham a amostra do presente estudo, mais da metade não possuía cicatriz vacinal, ocorrência que remonta à ausência do fator de proteção contra a hanseníase derivado da vacina BCG. Entre os indivíduos com duas cicatrizes vacinais, 25,4% eram casos da doença. Por isso, fica claro que nestes indivíduos algum fator pode ter contribuído para a diminuição de eficácia da vacina.

O Ministério da Saúde preconiza que todos os contatos domiciliares de casos de hanseníase recebam a vacina BCG, independentemente da classificação operacional do doente. São vacinados os contatos sem cicatriz e os contatos com uma cicatriz, desde que o intervalo entre a primeira dose da BCG e a segunda seja de, no mínimo, seis meses. Apenas os menores de um ano com cicatriz vacinal e aqueles com duas cicatrizes vacinais não recebem outra dose (BRASIL, 2010c).

5.2 Análise descritiva dos casos

A análise descritiva dos casos abrangeu variáveis que remontam aos aspectos clínicos da doença com foco na classificação operacional e forma clínica da doença, baciloscopia, presença de incapacidade física no diagnóstico e ocorrência de episódio reacional.

Tabela 5 - Formas clínicas e baciloscopia

| Variáveis | Frequências | |
|----------------------------------|-------------|------|
| | n | % |
| Classificação Operacional | | |
| Paucibacilar | 70 | 29,9 |
| Multibacilar | 153 | 65,4 |

Tabela 5 (continuação) - Formas clínicas e baciloscopia

| | | |
|----------|----|-----|
| Ignorado | 11 | 4,7 |
|----------|----|-----|

Forma Clínica de Madri

| | | |
|---------------|----|------|
| Indeterminada | 48 | 20,5 |
|---------------|----|------|

| | | |
|--------------|----|-----|
| Tuberculoide | 22 | 9,4 |
|--------------|----|-----|

| | | |
|---------|----|------|
| Dimorfa | 99 | 42,3 |
|---------|----|------|

| | | |
|-------------|----|------|
| Virchowiana | 47 | 20,1 |
|-------------|----|------|

| | | |
|----------|----|-----|
| Ignorado | 18 | 7,7 |
|----------|----|-----|

| | | |
|--------------|------------|------------|
| Total | 234 | 100 |
|--------------|------------|------------|

| Variáveis | Frequências | |
|---------------------|--------------------|------------|
| | n | % |
| Baciloscopia | | |
| Negativa | 112 | 47,9 |
| Positiva | 78 | 33,3 |
| Não especificada | 1 | 0,4 |
| Não realizada | 7 | 3 |
| Ignorada | 36 | 15,4 |
| Total | 234 | 100 |

Fonte: Elaboração própria.

A classificação operacional foi atribuída a 95,3% dos casos. Nota-se que, apesar de ser informação essencial na escolha da poliquimioterapia, 4,7% dos casos tiveram esta informação ignorada no banco de dados do SINAN. Entre a classificação operacional, a multibacilar foi a mais frequente (63,7%).

A comparação da proporção de multibacilares entre países mostra uma frequência de 94,7% na República Dominicana, país da América Central, e em Burquina Faso, país

africano, esta frequência foi de 32,1%. Ambos os dados são relativos ao ano de 2014. Neste mesmo ano foram notificados no Brasil 31.064 casos novos de hanseníase; destes, 65,9% eram multibacilares (WHO, 2015).

A proporção de casos paucibacilares e multibacilares de hanseníase reflete a situação de transmissão. Quando há um grande risco de infecção recente em determinada população, predominam os casos paucibacilares (BRASIL, 2008). A frequência de casos multibacilares pode sugerir a procura tardia dos serviços de saúde para o diagnóstico, uma vez que essa classificação remonta à manifestação de seis ou mais lesões cutâneas.

Além da classificação operacional, também foi verificada a forma clínica da doença nos casos conforme a classificação de Madri e se constatou que as mais frequentes foram a dimorfa e a indeterminada, consideradas formas intermediárias da doença. Nas formas clínicas polares, a virchowiana foi a mais frequente. Como confirmação dos dados que mostram maioria de multibacilares entre os casos, as formas virchowianas e dimorfas estiveram presentes em 62,4% dos casos. Dentre os indivíduos diagnosticados, 7,7% tiveram sua forma clínica ignorada.

A frequência maior das formas clínicas dimorfa e lepromatosa nos doentes pode refletir a falha das respostas imunes frente à infecção pelo *M. leprae*. A resposta imune ao bacilo é bastante heterogênea entre pacientes dimorfos e lepromatosos. Contudo, a inativação ou silenciamento de células T reativas parece ser responsável pela não responsividade nos casos multibacilares. Em alguns pacientes, o acúmulo de antígenos bacterianos, como o PGL-1, pode inclusive levar à supressão de células T (BRITTON, 1993).

A não responsividade do sistema imune também esteve associada a variações genéticas nos PRR. Um estudo de base familiar realizado no Vietnã verificou a presença de cinco SNP do receptor NOD2 que contribuía para a suscetibilidade à hanseníase multibacilar (GRANT *et al.*, 2012). Os determinantes genéticos e imunológicos da resposta ineficiente à infecção pelo *M. leprae* resultam na intensa replicação do bacilo com manifestações clínicas mais graves da doença. Por isso, o diagnóstico precoce é necessário para evitar a ocorrência de incapacidades físicas nos doentes.

A baciloscopia é um exame que investiga a presença do bacilo em esfregaços de raspados intradérmicos de lóbulos auriculares, cotovelos e lesões hansênicas. Por ser um exame de fácil execução, pouco invasivo e de baixo custo, é frequentemente utilizado como apoio no diagnóstico da doença para classificação operacional dos casos (BRASIL, 2010b). Neste estudo, a baciloscopia foi realizada em 81,6% dos casos de hanseníase, sendo o resultado negativo mais frequente (47,9%). Em um dos casos, a baciloscopia foi realizada;

contudo, o dado referente ao resultado não foi especificado. Em 15,4% dos casos diagnosticados, a baciloscopia não foi realizada ou teve essa informação ignorada no banco do SINAN.

A baciloscopia positiva define o caso como multibacilar; entretanto, o resultado negativo não exclui o diagnóstico da doença. Por isso, esse exame não é específico para confirmação diagnóstica (WHO, 2012). No presente estudo, verifica-se que não foram todos os indivíduos que realizaram a baciloscopia; nestes casos, o diagnóstico foi puramente clínico.

A confirmação do diagnóstico através do resultado laboratorial não é completamente fidedigna, pois resultados discordantes são comuns e o resultado positivo pode apresentar proporções que variam entre 28 a 78% dos doentes, discordando, principalmente, nas formas clínicas *borderlines*. Essa sensibilidade da baciloscopia é menor que a esperada, mas, quando utilizada como apoio ao diagnóstico, auxilia na classificação correta dos casos multibacilares, evitando a escolha errônea do regime terapêutico e consequente risco de recidiva (CAVALCANTI *et al.*, 2012).

5.2.1 Incapacidades físicas e episódios reacionais

A hanseníase é causa de prejuízos físicos preveníveis que são secundários ao dano neuronal e estão associados às limitações nas atividades que envolvem o uso das mãos, dos pés e dos olhos com consequente restrição na participação social (BRAKEL *et al.*, 2012). A Tabela 6 traz a frequência de incapacidades entre os casos e a presença de episódios reacionais.

Tabela 6 - Incapacidades físicas e episódios reacionais

| Variáveis | Frequências | |
|------------------------------------|-------------|------|
| Incapacidade física no diagnóstico | n | % |
| Grau 0 | 108 | 46,2 |
| Grau 1 | 91 | 38,8 |
| Grau 2 | 14 | 6 |
| Ignorado | 21 | 9 |

Tabela 6 (continuação) - Incapacidades físicas e episódios reacionais

| Presença de Episódio Reacional | | |
|---------------------------------------|------------|------------|
| Não | 25 | 10,7 |
| Sim | 37 | 15,8 |
| Ignorado | 172 | 73,5 |
| Total | 234 | 100 |

Fonte: Elaboração própria.

Conforme a Tabela 6, a avaliação do grau de incapacidade física foi realizada em 91% dos casos. Dos indivíduos avaliados, 50,7% não apresentavam incapacidades no momento do diagnóstico; entretanto, 49,3% já apresentavam algum tipo de incapacidade. Os sujeitos com alguma incapacidade no diagnóstico subdividiram-se em 86,7% de indivíduos com grau 1 e 13,3% com incapacidades grau 2. No Brasil, em 2014, do total de casos novos diagnosticados nos serviços de saúde, 6,5% já apresentavam incapacidades grau 2, ou seja, perda da sensibilidade protetora em mãos, pés e olhos acrescida de complicações, como lesões traumáticas e úlceras, pé caído e reabsorções ósseas (WHO, 2015). A alta proporção de incapacidades físicas observadas entre os casos incluídos neste estudo revela que na Microrregião de Almenara é frequente o diagnóstico de indivíduos que já apresentam incapacidades; a proporção de casos diagnosticados com incapacidade grau 2 foi de 9% em 2011, conforme dados do SINAN⁵.

A presença de incapacidades físicas relacionadas à hanseníase revela a falha dos serviços de saúde em diagnosticar precocemente a doença. Por isso, a vigilância das incapacidades na atenção primária à saúde inclui a investigação de perda da sensibilidade protetora, da capacidade funcional e de complicações. Ela deve ser realizada no momento do diagnóstico e também após o término da PQT no intuito de verificar o grau do comprometimento neurológico e evitar a evolução para deformidades através da orientação para a realização do autocuidado e da reabilitação (BRASIL, 2002).

As reações hansênicas se manifestam por lesões cutâneas e neurológicas, localizadas ou sistêmicas, que podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento da hanseníase e necessita de intervenção imediata uma vez que podem evoluir para complicações

⁵ Proporção de casos novos diagnosticados com incapacidade física grau 2 construído a partir de informações obtidas pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/hansenise/bases/Hansbrnet.def>>.

graves como osteomielite e ulcerações, contribuindo para as incapacidades físicas e prejuízo da qualidade de vida do indivíduo (NERY *et al.*, 2006).

Dos 234 casos incluídos neste estudo, 62 (26,5%) foram avaliados para a presença de reações hansênicas. Em virtude da importância do diagnóstico dos episódios reacionais e seu manejo pelos serviços de saúde, a fim de evitar as complicações possíveis, faz-se necessário que todo indivíduo diagnosticado com hanseníase seja avaliado para a presença de reações antes, durante e após o término do tratamento (NERY *et al.*, 2006).

Entre os casos avaliados, 17,4% tiveram confirmação de episódio reacional. Os 37 casos com episódios reacionais subdividiram-se quanto ao tipo de reação, sendo 16 com reação do tipo 1 ou reação reversa (43,2%); 10 com reação do tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (27,1%), e dois com as reações do tipo 1 e do tipo 2 simultaneamente (5,4%). Nove casos avaliados (24,3%) tiveram o tipo de reação não especificado no banco de dados do SINAN. Nos indivíduos com hanseníase na população geral é observada maior frequência de reações do tipo 1. Isto se deve ao fato de que enquanto a reação reversa pode afetar os paucibacilares e multibacilares, a reação do tipo 2 afeta somente os multibacilares (ILEP, 2002).

De fato, os episódios reacionais são frequentes, afetando 25 a 30% dos casos da doença. Todos os indivíduos diagnosticados com hanseníase estão em risco de ter reações. Contudo, esse risco difere a depender das manifestações clínicas; aqueles diagnosticados sem dano neuronal e com apenas uma ou duas lesões de pele têm risco diminuído (ILEP, 2002). Outros fatores de risco que podem desencadear os episódios reacionais são gestação, infecções, estresse físico ou psicológico (BRASIL, 2002) e soropositividade anti PGL-1 (ROCHE; BRITTON, 1991).

5.3 Análise descritiva de variáveis epidemiológicas para controles

As variáveis epidemiológicas investigadas nos controles correspondem às características de contato com casos de hanseníase. Como já mencionado na metodologia deste trabalho, os controles foram selecionados após visita ao caso, tendo sido considerados contatos domiciliares dos casos, baseando-se no critério de inclusão de não consanguinidade.

Tabela 7 - Características de convivência com casos da doença

| Variáveis | Frequências | |
|---------------------------------------------|--------------------|------|
| | n | % |
| Situação de contato | | |
| Residir até cinco anos antes do diagnóstico | 151 | 64,8 |
| Residir na data do diagnóstico | 38 | 16,3 |
| Residir na data do diagnóstico e atualmente | 43 | 18,5 |
| Ignorado | 1 | 0,4 |
| Total | 233 | 100 |

| Variáveis | Frequências | |
|-----------------------------------|--------------------|------|
| | n | % |
| Característica do contato | | |
| Dorme no mesmo terreno | 146 | 62,6 |
| Dorme no mesmo domicílio | 40 | 17,2 |
| Dorme no mesmo cômodo | 43 | 18,5 |
| Ignorado | 4 | 1,7 |
| Contato de mais de um caso | | |
| Sim | 24 | 10,3 |
| Não | 162 | 69,5 |
| Ignorado | 47 | 20,2 |
| Total | 233 | 100 |

Fonte: Elaboração própria.

Observando a Tabela 7, podemos verificar que, quanto à situação de ser um contato domiciliar de caso, a maior parte dos controles conviveu com caso da doença na data do diagnóstico e até cinco anos antes, sendo que apenas 18,5% ainda conviviam com o caso na data da coleta. Na variável característica do contato, 35,7% dos controles conviviam no

mesmo domicílio que o caso índice especificamente; 17,2% compartilhavam a residência e 18,5% compartilhavam também o dormitório.

As condições de moradia e o tipo de contato com o indivíduo doente contribuem como fatores de risco para a infecção por propiciarem convívio mais próximo entre os residentes. É conhecido que a principal forma de transmissão ocorre pela inalação do bacilo eliminado das vias aéreas de pacientes multibacilares sem tratamento. Portanto, indivíduos que compartilham o domicílio e, ainda mais, aqueles que compartilham o dormitório estão em maior risco de infecção (BRASIL, 2002). Um estudo verificou que a soropositividade anti-PGL-1 entre contatos domiciliares de casos de hanseníase na Microrregião de Almenara foi mais prevalente entre aqueles que residiam em domicílios com grande número de moradores e poucos cômodos e dormitórios e naqueles com contato mais próximo e prolongado com casos de hanseníase (CARVALHO, 2012).

Sabe-se que contatos domiciliares de casos multibacilares têm oito vezes mais risco de infecção, enquanto contatos de hanseníase tuberculóide ou paucibacilar têm o risco aumentado em quatro vezes (MOET *et al.*, 2004). Contudo, o tempo necessário de exposição para o início da doença não é conhecido. Na realidade, para a hanseníase não é possível determinar o tempo transcorrido entre a exposição e o início da infecção: isto se deve à baixa patogenicidade do bacilo e seu longo período de incubação.

Conforme a Tabela 7, 10,3% dos controles tiveram contato com mais de um caso de hanseníase. Estudos realizados no Brasil e em outros países verificaram que, em regiões de hiperendemia, 30 a 73% dos casos de hanseníase reportam contato domiciliar com outro caso antes do aparecimento das lesões, sendo que mais de 60% caracterizaram o contato como diário (DEPS *et al.*, 2006). Estudo de seguimento de 20 anos realizado no Sri Lanka verificou que 20% dos casos de hanseníase reportaram adoecimento em mais de um membro da família (DISSANAYAKE, 2004). Portanto, podemos inferir que contatos domiciliares de mais de um caso da doença têm maior chance de desenvolver hanseníase por estarem expostos a uma maior carga bacilar, mas, como evidência da influência que os fatores de suscetibilidade individual exercem sobre a eficácia da resposta imune frente à infecção pelo *M. leprae*, observa-se que o adoecimento não ocorre em todos os contatos.

5.4 Associação do SNP G743A com a hanseníase *per se*

O G743A, também conhecido como rs4833095, é um polimorfismo de nucleotídeo único do gene TLR1 que envolve a troca de uma guanina por uma adenina na

sequência do DNA. Por isso, recebe a denominação N248S. Esta variante *missense* tem como consequência a alteração do aminoácido asparagina para serina na posição 248 da proteína, diminuindo a expressão do receptor TRL1 nas células do sistema imune (UCIECHOWISK *et al.*, 2011). Para analisar a associação do SNP G743 com a hanseníase *per se*, primeiramente foi verificada a distribuição dos alelos e genótipos na amostra estudada, seguida do teste de qui-quadrado para avaliar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A Tabela 8 mostra a distribuição dos alelos nos sujeitos deste estudo.

Tabela 8 - Frequência alélica e genotípica na amostra estudada

| Gene TLR1 | | | | |
|-----------------------|-----|------|----------------------|-------------------|
| SNP G743A (rs4833095) | | | | |
| Alelos | n | % | | |
| A | 340 | 48,4 | | |
| G | 363 | 51,6 | | |
| Genótipo | | | X² | Valor de p |
| G/G | 127 | 27,2 | | |
| G/A | 236 | 50,5 | 0,8 | p>0,05 |
| A/A | 104 | 22,3 | | |
| Total | 467 | 100 | | |

Fonte: Elaboração própria.

Em uma visão geral dos sujeitos, percebe-se que a ocorrência do alelo G743 foi mais frequente que o alelo polimórfico A743. A distribuição dos alelos do SNP G743A nas populações das Américas segue a proporção de 52,7% para o alelo G743 e 47,3% para o alelo A743. Com relação aos genótipos na amostra, o mais frequente foi o heterozigoto G/A seguido pelo homozigoto G/G e o A/A; esta distribuição também pode ser observada nas populações da América na qual os genótipos são distribuídos da seguinte maneira: 47,3% para o genótipo heterozigoto; 29,1% para o homozigoto G/G; 23,6% para o A/A. Com isso, percebemos que as frequências alélicas e genotípicas da amostra estiveram de acordo com as frequências observadas nas populações do continente americano (DELANEAU *et al.*, 2014).

5.4.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O equilíbrio de Hardy-Weinberg é um dos princípios fundamentais da genética de populações e estabelece que em um *locus* com dois alelos A e a, onde a frequência do alelo A na população é p e a frequência do alelo a é q, se considerarmos que essa população possui apenas casamentos aleatórios, sem preferencialidade ou consaguinidade, e nenhuma seleção agindo sobre os alelos, a probabilidade de observarmos um indivíduo com o genótipo AA, ou seja, a frequência do alelo A, é p^2 e a probabilidade de indivíduos aa é q^2 . A frequência de indivíduos Aa é então $2pq$, pois temos os heterozigotos Aa e os aA (SPEICHER; ANTONARAKIS; MOTULSKY, 2010).

Como a população que utilizamos não é infinita e também não assume todas as premissas, pode ser que exista subdivisão da população, migração recente e seleção natural. É esperado que a expectativa de equilíbrio tenha alguma variância e possa não ser alcançada. Por isso, primeiramente, é necessário testar os desvios do equilíbrio. Para tal, foi utilizado o teste de qui-quadrado (X^2) a fim de comparar as frequências dos valores esperados e observados dos genótipos heterozigoto e homozigoto na amostra estudada por meio da equação $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$. Resultados do teste X^2 encontram-se na Tabela 10.

Tabela 9 - Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

| Gene TLR1 | | |
|-------------------|-------|------------|
| SNP | X^2 | Valor de p |
| G743A (rs4833095) | 0,478 | p>0,05 |

Legenda: X^2 - qui-quadrado.

Fonte: Elaboração própria.

O teste X^2 revelou que a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo G743A, evidenciado pelo valor de p maior que 0,05, o que possibilita sua inclusão na análise de associação.

5.4.2 Análise do SNP G743A

A Tabela 10 apresenta análise descritiva das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos caso e controle.

Tabela 10 - Perfil alélico e genotípico em casos e controles

| Gene TLR1 | | | | |
|-----------------------|--------------|------|------------------|------|
| SNP G743A (rs4833095) | | | | |
| Variáveis | Casos | | Controles | |
| Alelos | n | % | n | % |
| G | 188 | 51,8 | 175 | 51,5 |
| A | 175 | 48,2 | 165 | 48,5 |
| Genótipos | | | | |
| G/G | 59 | 25,2 | 68 | 29,2 |
| G/A | 129 | 55,1 | 107 | 45,9 |
| A/A | 46 | 19,7 | 58 | 24,9 |
| Total | 234 | 100 | 233 | 100 |

Fonte: Elaboração própria.

Verifica-se que a distribuição dos alelos entre casos e controles tiveram proporções muito semelhantes, praticamente não havendo diferenças entre ambos. Em relação à distribuição dos genótipos, houve maior frequência do 743GG em controles que em casos (29,2%). Os indivíduos heterozigotos estiveram mais representados no grupo de casos, enquanto os homozigotos 743AA foram mais presentes no grupo de controles.

Podemos observar que a proporção dos diferentes alelos e genótipos entre casos e controles teve bastante similaridade em sua distribuição. Por isso, foi realizado cálculo das frequências absoluta e relativa da presença e ausência do alelo polimórfico do SNP G743A entre os grupos.

Tabela 11 - Frequência do alelo polimórfico do SNP G743A (rs4833095)

| Alelos | Casos | | Controles | | OR | IC 95% | Valor de p |
|----------------|-------|------|-----------|------|------|------------|------------|
| | n | % | n | % | | | |
| A+ (G/A e A/A) | 175 | 74,8 | 165 | 70,8 | 0,81 | 0,54 - 1,2 | 0,33 |
| A- (G/G) | 59 | 25,2 | 68 | 29,2 | | | |
| Total | 234 | 100 | 233 | 100 | | | |

Legenda: A+ - presença do alelo polimórfico; A- - ausência do alelo polimórfico; OR: *odds ratio*.
Fonte: Elaboração própria.

Os resultados da distribuição sugerem que o alelo G248 esteve mais representado no grupo controle, enquanto o alelo polimórfico A248 foi mais frequentemente encontrado nos casos de hanseníase. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa.

A fim de verificar a associação dos genótipos com a hanseníase, foi calculada a razão de chances cujos resultados são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 12 - Análise da associação do SNP G743A estratificada por sexo

| Gene TLR1 | | | | | | | | |
|-----------------------|----------|------|------|----------|------|-----------------|---------------------|------------|
| SNP G743A (rs4833095) | | | | | | | | |
| Sexo | Genótipo | Caso | | Controle | | OR ^a | IC 95% ^b | Valor de p |
| | | n | % | n | % | | | |
| Masculino | G/G | 34 | 26 | 27 | 29,3 | 1 | Referência | |
| | G/A | 66 | 50,4 | 42 | 45,7 | 0,8 | 0,42-1,52 | 0,77 |
| | A/A | 31 | 26,7 | 23 | 25 | 0,93 | 0,45-1,96 | |
| Feminino | G/G | 25 | 24,3 | 41 | 29,1 | 1 | Referência | |
| | G/A | 63 | 61,2 | 65 | 46,1 | 0,63 | 0,34-1,15 | 0,046 |
| | A/A | 15 | 14,6 | 35 | 24,8 | 1,42 | 0,65-3,10 | |

Legenda: OR: *odds ratio*; IC 95% - intervalo de confiança de 95%.

^a Análise de regressão logística

^b Valor ajustado para idade

Fonte: Elaboração própria.

Através dos resultados apresentados na Tabela 12, percebe-se que o *odds* para o genótipo 743AA foi de 0,43 nos homens (IC 95% 0,45-1,96) com um valor de *p* não significativo ($p > 0,05$). Nas mulheres, o *odds* para o genótipo 743AA foi 1,42 (IC 95% 0,65-3,10) com valor de *p* estatisticamente significativo ($p = 0,046$). Apesar de apresentar um valor com significância estatística, o intervalo de confiança para o *odds* do genótipo 743AA nas mulheres apresentou valores muito dispersos e que perpassaram pelo valor 1, o que anula a significância da medida de associação.

É importante destacar que nesses cálculos foi utilizada como parâmetro a relação de codominância entre o genótipo e o fenótipo, a qual compreende que em indivíduos heterozigotos ambos os alelos são expressos, perfazendo um fenótipo diferente do homozigoto seja para o alelo G/G ou para o alelo A/A (MIKO, 2008). Ressalta-se, porém, que como esta relação não foi capaz de explicar como se dá a relação genótipo-fenótipo para o SNP G743A do gene TLR1, outras relações necessitavam ser testadas.

A relação de dominância completa entre genótipo e fenótipo se refere à supressão da manifestação de um alelo pelo outro quando em heterozigose (MIKO, 2008). A fim de verificar a associação com base na relação de dominância completa, foi novamente avaliada a associação dos genótipos com a hanseníase. Entre homens e mulheres o genótipo mais frequente foi o heterozigoto, porém foi verificada uma maior frequência do genótipo G/A em mulheres (61,2%) quando comparado com os homens (50,4%). Além disso, o resultado da análise da medida de associação para o heterozigoto G/A não foi significativo para o sexo masculino (OR 0,83; IC 95% 0,49-1,41; $p = 0,048$), mas o foi para o sexo feminino com o valor de *odds* de 0,54, IC95% de 0,32 a 0,91 e o valor de $p = 0,02$. Portanto, mulheres heterozigotas 743GA tiveram menor chance de terem hanseníase.

A associação do SNP G743A no gene TLR1 com a proteção à hanseníase diferenciada pelo gênero ainda não havia sido reportada na literatura. Outros trabalhos, contudo, já haviam mostrado a associação positiva do SNP com a suscetibilidade ou proteção à hanseníase, independente do gênero. Um caso-controle realizado na Índia, utilizando 842 casos e 2.203 controles, encontrou maior frequência do alelo A743 entre os casos de hanseníase na proporção de 54% para casos e 51% para controles (OR 1,12; IC95% 0,97–1,31). Resultado similar também foi encontrado no presente estudo, em que a presença desse alelo foi frequente em 75% dos casos e 72% nos controles. Em ambos os estudos, essa

associação não teve significância estatística. Na análise da frequência de genótipos, entretanto, foi encontrada associação do genótipo homozigoto 743AA com a suscetibilidade à hanseníase *per se* nos pacientes indianos (OR 1,4; IC95% 1,06-1,70). O genótipo heterozigoto foi associado à proteção contra a hanseníase *per se* (OR 0,78; IC95% 0,63-0,96) e o homozigoto 743GG não foi associado à suscetibilidade ou proteção nesta população (SCHURING *et al.*, 2009).

No Brasil, estudo realizado em São Paulo verificou que a distribuição do alelo polimórfico entre casos e controles foi estatisticamente significativa (OR 1,65; IC95% 1,18-2,30; $p = 0,003$). A análise do genótipo mostrou que tanto o homozigoto 743AA quanto o heterozigoto 743GA estiveram associados à suscetibilidade à hanseníase *per se* (OR 1,58; IC95% 1,10–2,24; $p = 0,01$ e OR 1,81; IC95% 1,20–2,71; $p = 0,004$). A replicação deste estudo em populações de Rondonópolis, Mato Grosso e Rio de Janeiro obteve resultados muito semelhantes aos do trabalho realizado anteriormente (MARQUES *et al.*, 2013).

Em 2011, foi realizado na Microrregião de Almenara um estudo baseado em famílias, incluindo trios familiares compostos de pacientes de hanseníase e seus pais biológicos ou irmão biológico na ausência de algum progenitor, num delineamento conhecido como TDT. Os resultados mostraram que o alelo 743A foi mais transmitido dos pais afetados para os filhos também afetados e esteve associado à suscetibilidade à hanseníase ($p = 0,047$) (AMARAL, 2012).

Sabe-se que o aminoácido 248 do TLR1 localiza-se no sítio externo de ligação (SCHURING *et al.*, 2009) e foi demonstrado que indivíduos com o alelo A têm uma expressão muito reduzida de TLR1 na superfície dos leucócitos. É provável que haja um defeito no tráfego celular que prejudica o transporte do receptor para a membrana da célula, alterando sua expressão e, conseqüentemente, o reconhecimento do *M. leprae* e a sinalização de respostas imunes frente à infecção por micobactérias (UCIECHOWISK *et al.*, 2011). A análise dos níveis de citocinas de células obtidas de indivíduos saudáveis verificou que, quando estimuladas por antígenos do *M. leprae*, a razão do nível de TNF para o nível de IL-10 estava significativamente mais baixo naqueles com o alelo 743A, o que remonta às diferenças nos padrões de resposta imune Th1 e Th2. A liberação de TNF e seu papel na contenção da carga bacilar e evolução para a cura espontânea ou para doença com manifestações mais brandas podem estar inibidos nos indivíduos com o alelo 743A (MARQUES *et al.*, 2013). Entretanto, como evidenciado pelos resultados deste estudo, a dominância completa nos indivíduos heterozigotos G/A pode auxiliar a compreender como a

heterozigose é capaz de suprimir o efeito prejudicial do alelo 743A e conferir proteção à hanseníase *per se*.

Apesar de a associação significativa entre o genótipo heterozigoto e a proteção à hanseníase ter sido encontrada neste estudo, deve-se pontuar que a ausência de informação acerca da cor da pele para todos os sujeitos impossibilitou a realização de análise ajustada para esta covariável e, portanto, permanece como uma limitação. Essa limitação é relevante na medida em que as populações latino-americanas representam diferentes misturas de europeus, africanos e nativos americanos cuja proporção de ancestralidade depende do país de origem. O Brasil é, especialmente, um país de muita miscigenação, sendo, portanto, imprescindível restringir o recrutamento de casos e controles a determinada área geográfica ou mesmo realizar o pareamento da amostra para determinada etnia. Ressalta-se que esse pareamento não é tarefa fácil pela própria miscigenação da população brasileira (TANG *et al.*, 2005).

Além disso, a falta de associação do genótipo 743AA com a suscetibilidade à hanseníase pode decorrer do tamanho limitado da amostra, sendo que uma redução maior da amostra proporcionada pela estratificação por sexo pode, inclusive, ser uma limitação ao resultado significativo encontrado na associação do genótipo 743GA com a proteção à hanseníase no sexo feminino. Estudos futuros utilizando uma amostra de tamanho maior podem contribuir para a elucidação da associação protetora do genótipo heterozigoto específica para sexo. É relevante pontuar que, apesar da variável sexo ser quase sempre tratada como fator de confusão nos estudos epidemiológicos, o uso de análises estratificadas da variável neste tipo de estudo faz-se necessário uma vez que o sexo é determinante de risco já observado em várias doenças infecciosas (GUERRA-SILVEIRA; ABAD-FRANCH, 2013).

O estudo de caso-controle, em geral, é utilizado para as primeiras evidências de associação de um gene candidato (KAZEEM; FARRALL, 2005). Porém, é ideal que os resultados encontrados sejam confirmados por métodos alternativos, como o TDT (EVANGELOU *et al.*, 2006). O estudo de TDT realizado na Microrregião de Almenara em 2011 mostrou associação entre o genótipo 743AA e a suscetibilidade à hanseníase. Entretanto, não foi capaz de encontrar a associação do genótipo heterozigoto com a proteção à doença, assim como fizeram outros estudos de caso-controle. Esses dados ressaltam que o caso-controle é um delineamento ideal quando a doença possui um longo período de incubação, como a hanseníase; a população do estudo é dinâmica e é, principalmente, uma maneira eficaz de compreender a relação entre a presença de determinado polimorfismo genético e a doença (ASCHENGRAU; SEAGE, 2007).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo verificou que o alelo A do polimorfismo G743A, também conhecido por rs4833095, foi mais frequentemente encontrado em casos de hanseníase. Entretanto, a análise de genótipos não encontrou associação deste SNP com a suscetibilidade à hanseníase *per se* no delineamento caso-controle. Comparativamente, estudo anterior na mesma região geográfica verificou associação significativa com a suscetibilidade à hanseníase através de análise de associação baseada em família no método TDT.

O presente estudo foi capaz de detectar a associação entre o genótipo heterozigoto G/A com a proteção à hanseníase *per se* em mulheres, o que pode sugerir que o polimorfismo G743A é um fator de proteção específico para gênero. Em geral, a literatura reporta que pesquisas de epidemiologia genética replicados num mesmo cenário de estudo costumam ter resultados semelhantes em sua maioria. No entanto, a replicação do estudo TDT trouxe uma complementação dos resultados obtidos na primeira análise, em que na associação baseada em famílias foi verificado que o alelo A do polimorfismo estava associado à suscetibilidade à doença e na análise de associação de base populacional foi verificado o genótipo heterozigoto como fator de proteção à doença com a característica de ser gênero-específico. Percebe-se que, apesar de o heterozigoto G/A associar-se à proteção, o homozigoto G/G não teve relação com a hanseníase *per se*, assim como estudos internacionais também obtiveram resultado semelhante. São necessários novos estudos para elucidar como as alterações na expressão do receptor decorrente dos polimorfismos genéticos contribuem para a suscetibilidade ou proteção à doença e, ainda, como essa associação pode diferenciar-se de acordo com o gênero.

Como já relatado pela literatura científica, o estudo de caso-controle tem a dificuldade na seleção dos controles em áreas de endemia uma vez que o efeito da prevalência da doença não é totalmente conhecido. A infecção pelo *M. leprae* é pré-requisito para a infecção e progressão para a doença; porém, fatores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo podem influenciar tanto a exposição ao agente infeccioso quanto o desfecho, que pode ser favorável - a cura - ou desfavorável - a doença clínica. A análise das características dos sujeitos incluídos neste estudo mostrou uma grande frequência da doença no sexo masculino e em indivíduos jovens com grande parte dos casos de hanseníase vivendo em domicílios de até quatro cômodos, com histórico de parasitoses e sem cicatriz vacinal de BCG. Predominaram os casos multibacilares, sendo a baciloscopia positiva, as incapacidades físicas e os episódios reacionais achados frequentes no decorrer do diagnóstico e tratamento.

Apesar de o critério de ausência da doença e sinais clínicos sugestivos ser fundamental para a seleção de controles, ainda restam indivíduos que, apesar de saudáveis, estão infectados pelo *M. leprae* e permanecem sem manifestações clínicas. Por isso, para averiguar a suscetibilidade à hanseníase *per se*, é preciso estabelecer critérios mais rigorosos na seleção de controles em áreas endêmicas, por exemplo, utilizando análises de sorologia que exclua indivíduos soropositivos para antígenos específicos do *M. leprae*, como o anti-PGL-1. A análise das variáveis que denotavam exposição ao bacilo mostrou que a maioria dos controles teve um longo período de exposição e mais de 10% foi contato domiciliar de mais de um caso de hanseníase, levando a crer que variáveis não incluídas no modelo também podem exercer influências sobre a suscetibilidade à infecção e constituírem fator de confusão para seleção adequada dos controles em áreas endêmicas.

Também é importante pontuar que a ausência de informações acerca da cor da pele constituiu-se uma fragilidade deste estudo. A obtenção dessa informação em novas coletas se faz necessária para que as análises sejam novamente realizadas, ajustando-se esta variável no intuito de evitar possível confusão pela estratificação populacional.

É conhecido que a arquitetura genética da hanseníase influencia no risco de adoecimento. Todavia, como essa suscetibilidade é poligênica, faz-se preciso identificar as variantes que contribuem para a suscetibilidade ou resistência à doença na população brasileira, sobretudo nas áreas de grande endemicidade. Mais estudos de epidemiologia genética utilizando um número maior de polimorfismos em genes relacionados à resposta imune são necessários e podem contribuir para a identificação de um perfil genético de suscetibilidade à hanseníase.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda., 2008.

ALCAÏS, A.; ABEL, L.; CASANOVA, J. L. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, p. 2506-2514, Sep. 2009.

ALCAÏS, A. *et. al.* Genetic dissection of immunity in leprosy. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 1, p. 44-48, Feb. 2005.

ALTER, A. *et. al.* Leprosy as a genetic disease. **Mammalian Genome**, v. 22, n. 1-2, p. 19-31, Feb. 2011.

AMARAL, E. P. **Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase**. 2012. 124 f. Tese (Doutorado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

AMARAL, E. P.; LANA, F. C. F. Análise espacial da Hanseníase na microrregião de Almenara, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 61, número especial, p. 701-707, nov. 2008.

ASCHENGRAU, A.; SEAGE, G. R. **Essentials of Epidemiology in Public Health**. 3. ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2007.

BARRETO, M. L.; PEREIRA, S. M.; FERREIRA, A. A. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, 2006.

BRAKEL, W. H. V. *et. al.* Disability in people affected by leprosy: the role of impairment, activity, social participation, stigma and discrimination. **Global Health Action**, v. 5, 2012.

BRAKEL, W. H. V. Peripheral neuropathy in leprosy and its consequences. **Leprosy Review**, v. 71 (supl.), p. 146-153, Dec. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. **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**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde - relatório de situação**: Minas Gerais. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. **Saúde Brasil 2009**: uma análise da situação de saúde e da agenda nacional e internacional de prioridades em saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos**: baciloscopia em hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Nota Técnica n. 10, de 17 de maio de 2010**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010c.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria n. 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da hanseníase. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 out. 2010d.

_____. Ministério da Saúde. DATASUS. **Informações de Saúde**. 2010e. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0201>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância em Saúde**: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da Hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRITTON, W. J. Leprosy 1962-1992: Immunology of leprosy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p. 508-514, 1993.

CARVALHO, A. P. M. **Soropositividade anti PGL-I em contatos domiciliares de casos de hanseníase na Microrregião de Almenara, Minas Gerais**. 2012. 99 f. Dissertação

(Mestrado em Saúde e Enfermagem) - Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

CAVALCANTI, A. A. L. *et al.* Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: A 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 45, n. 5, p. 616-619, 2012.

CHRISTMAS, P. Toll-like Receptors: Sensors That Detect Infection. **Nature Education**, v. 3, n. 9, p. 85, 2010.

DELANEAU, O. *et al.* Integrating sequence and array data to create an improved 1000 Genomes Project haplotype reference panel. **Nature Communications**, v. 5, n. 3934, 2014.

DEPS, P. D. *et al.* Characteristics of known leprosy contact in a high endemic area in Brazil. **Leprosy Review**, v. 77, p. 34-40, 2006.

DISSANAYAKE, S. Relative lack of clinical disease among household contacts of tuberculosis patients compared to leprosy households. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 156-164, 2004.

EVANGELOU, E. *et al.* Family-Based versus Unrelated Case-Control Designs for Genetic Associations. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 8, p. 1147-1155, 2006.

FABRI, A. C. O. C. *et al.* Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infectious Diseases**, p. 2015-2018, 2015.

FRANCHESCHI, D. S. A. *et al.* Hanseníase no mundo moderno: o que sabemos sobre a influência genética do hospedeiro no seu controle? **Arquivos de Medicina**, v. 23, n. 4, p. 159-165, 2009.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.

GRANT, A. V. *et al.* Crohn's Disease Susceptibility Genes are Associated With Leprosy in the Vietnamese Population – Brief Report. **Journal of Infectious Diseases**, 2012.

GUERRA-SILVEIRA, F.; ABAD-FRANCH, F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. **PLoS One**, v. 8, n. 4, Apr. 2013.

HAN, X. Y.; SILVA, F. J. On the Age of Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014.

HAN, X. Y.; SIZER, K. C.; TAN, H. Identification of the Leprosy Agent *Mycobacterium lepromatosis* in Singapore. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 2, p. 168-172, 2012.

HAN, X. Y. *et al.* The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 8, p. 952-959, 2012.

HART, B. E.; TAPPING, R. I. Genetic diversity of Toll-like Receptors and Immunity to *M. leprae* Infection. **Journal of Tropical Medicine**, 2012. 12 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. **Pesquisa das Características Étnico-raciais da População**. [on-line]. 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/caracteristicas_raciais/default_zip.shtm> . Acesso em: 3 fev. 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

ILEP - The International Federation of Anti-Leprosy Associations. **Guia didático da lepra 2: como reconhecer e tratar reações hansênicas**. Londres: ILEP, 2002. 54p.

JESSAMINE, P. G. *et al.* Leprosy-like illness in a patient with *Mycobacterium lepromatosis* from Ontario, Canada. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 2, p. 299-333, 2012.

JOHNSON, C. M. *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, p. 7520-7524, Jun. 2007.

KAZEEM, G. R.; FARRALL, M. Integrating Case-control and TDT Studies. **Annals of Human Genetics**, v. 69, n. 3, p. 329-335, 2005.

LALOUEL, J. M. *et al.* A Unified Model for Complex Segregation Analysis. **American Journal of Human Genetics**, v. 35, p. 816-823, 1983.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205-218, mar.-abr. 2014.

LI, X.; ZHOU, X. Co-infection of tuberculosis and parasitic diseases in humans: a systematic review. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 79, 2013.

LIFE TECHNOLOGIES. **User Guide: TaqMan® SNP Genotyping Assays**. Life Technologies Corporation, 2014.

LOKWOOD, D. N. J. *et al.* Cytokine and Protein Markers of Leprosy Reactions in Skin and Nerves: Baseline Results for the North Indian INFIR Cohort. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, 2011.

MARQUES, C. L. *et al.* Toll-like receptor 1 (TLR1) N248S single nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 1, 2013.

MARQUES, C. S. *et al.* NOD2 e CCDC122-LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. **Human Genetics**, v. 133, p. 1525-1532b, 2014.

MASAKI, T. *et al.* Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. **Cell**, v. 152, p. 51-67, 2013.

MIKO, I. Genetic Dominance: Genotype-Phenotype Relationships. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 140, 2008.

MIRA, M. T. *et al.* Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nature Genetics**, v. 33, p. 412-415, 2003.

MIRA, M. T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 4, p. 1124-1131, Apr. 2006.

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

MOET, F. J. *et al.* Physical Distance, Genetic Relationship, Age, and Leprosy Classification Are Independent Risk Factors for Leprosy in Contacts of Patients with Leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 3, p. 346-353, 2006.

MOET, F. J. *et al.* Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Leprosy Review**, v. 75, p. 310-326, 2004.

NADANOVSKY, P.; COSTA, A. J. L.; RAGGIO, L. R. **Epidemiologia e Bioestatística na Pesquisa Odontológica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

NERY, J. A. C. *et al.* Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais. Uma abordagem prática. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 4, p. 367-375, 2006.

O'NEILL, L. A. J. Toll-like Receptor Signaling. **Nature Reviews Immunology**. [on-line] 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/nri/posters/tlr/nri1397.html>>. Acesso em: 4 out. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Estratégia global aprimorada para redução adicional da carga da hanseníase: período do plano: 2011-2015**. Organização Pan-Americana da Saúde. Brasília: Organização Mundial da Saúde, 2010.

PACHECO, A. G.; MORAES, M. O. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. **Disease Markers**, v. 27, n. 3, p. 173-186, 2009.

PALERMO, M. L. *et al.* Increased expression of regulatory T cells and down-regulation molecules in lepromatous leprosy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 878-883, May 2012.

PONNIGHAUS, J. M. *et al.* Extended schooling and good housing conditions are associated with reduced risk of leprosy in rural Malawi. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 62, n. 3, p. 345-352, 1994.

PRIBERAM. Dicionário da Língua Portuguesa, 2006. Disponível em: <<http://www.priberam.pt/dlpo/de%20per%20si>>. Acesso em: 9 fev. 2016.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to Immunity – a five group system. **International Journal of Leprosy**, v. 34, n. 3, p. 255-273, Jul.-Sep. 1966.

ROCHE, P. W.; BRITTON, W. J. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. **The Lancet**, v. 338, n. 8.768, p. 654-657, 1991.

SALGAME, P. *et al.* Differing Lymphokine Profiles of Functional Subsets of Human CD4 and CD8 T Cell Clones. **Science**, v. 254, n. 5.029, p. 279-282, Oct. 1991.

SCHURR, E. *et al.* Genetic predisposition to leprosy: Review: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. **Seminars in Immunology**, v. 18, n. 6, p. 404-410, Dec. 2006.

SCHURING, R. P. *et al.* Polymorphisms N248S in the Human Toll-like Receptor 1 Gene is related to leprosy and leprosy reactions. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 12, p. 1816-1819, Jun. 2009.

SCOLLARD, D. M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338-381, Apr. 2006.

SILVA, C. A. M. *et al.* Interaction of *Mycobacterium leprae* with Human Airway Epithelial Cells: Adherence, Entry, Survival, and Identification of Potential Adhesins by Surface Proteome Analysis. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 7, p. 2645-2659, 2013.

SOUZA, C. S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 325-334, jul.-set. 1997.

SPEICHER, M. R.; ANTONARAKIS, S. E.; MOTULSKY, A. G. **Human Genetics**. 4. ed. Berlin: Springer, 2010. 981p.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like Receptors in Innate Immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.

TANG, H. *et al.* Genetic Structure, Self-Identified Race/Ethnicity, and Confounding in Case-Control Association Studies. **American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 2, p. 268-275, 2005.

TEIXEIRA, A. C. *et al.* Avaliação da concordância entre exames clínicos e laboratoriais no diagnóstico da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, supl. 2, p. 48-55, 2008.

TOLL-LIKE RECEPTORS REVIEW. [on-line], 2012. Disponível em: <<http://www.invivogen.com/review-trlr>>. Acesso em: 27 ago. 2015.

TRUMAN, R. W. *et al.* Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 17, p. 1626-1633, 2011.

UCIECHOWISK, P. *et al.* Susceptibility to tuberculosis is associated with TLR1 polymorphisms resulting in a lack of TLR1 cell surface expression. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 90, n. 2, p. 377-388, 2011.

URA, S.; BARRETO, J. A. Educação continuada em hanseníase: papel da biópsia cutânea no diagnóstico de Hanseníase. **Hansenologia Internationalis**, v. 29, n. 2, p. 141-144, 2004.

US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Genetics Home Reference: Handbook. Bethesda: The Library, 2016. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/handbook/mutationsanddisorders/genemutation>>. Acesso em: 20 Mar. 2016.

VERA-CABRERA, L. *et al.* Case of diffuse lepromatous leprosy associated with “Mycobacterium lepromatosis”. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4366-4368, 2011.

WONG, S. H. *et al.* Leprosy and the adaptation of human Toll-like Receptor 1. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, Jul. 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leprosy new case detection rates, 2014**. 1 mapa. Escala indeterminável. WHO, 2016. Disponível em: <<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

_____. **Weekly Epidemiological Record**. World Health Organization Geneva - Annual Subscription, n. 36, p. 461-476, 2015.

_____. **Weekly Epidemiological Record**. World Health Organization Geneva - Annual Subscription, n. 36, p. 389-400, 2014.

_____. **Cluster analysis of the overall detection rate of leprosy in Brazil for the triennium 2011-2013**. 1 mapa. 1:287.5. WHO, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/lep/resources/Cluster_analysis/en/>. Acesso em: 10 fev. 2016.

_____. **WHO Expert Committee on Leprosy**: eighth report. Geneva: Who Technical Reports Series, n. 968, 2012.

YAMAMURA, M. *et al.* Defining Protective Responses to Pathogens: Cytokine Profiles in Leprosy Lesions. **Science**, v. 254, p. 277-279, 1991.

ZHAO, S. *et al.* Toll-like receptors and prostate cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 352, p. 1-6, Jul. 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE ENFERMAGEM
 Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (07 a 12 anos)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*” por morar em uma região que tem muitos casos de hanseníase.

A hanseníase é uma doença, causada por uma bactéria, que causa lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem deixar sequelas. Essa doença é transmitida pelo contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa, por meio da respiração. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio frequente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso aceite participar do estudo, será solicitado que você responda a um questionário aplicado por pesquisadores treinados da Escola de Enfermagem da UFMG, com perguntas relacionadas a você e à doença.

Em seguida, será realizado um exame da sua pele e dos nervos para identificar possíveis sinais ou sintomas sugestivos de hanseníase.

Por fim, serão coletados 05 mililitros de sangue, por punção venosa no braço, uma gota de sangue no local da punção e raspado da pele da orelha por um pequeno corte, utilizando material estéril e descartável para evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos destes procedimentos são mínimos e podem estar associados à coleta do material (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido). Com os resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.

Os materiais e os dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores apenas para os objetivos da pesquisa. Uma das preocupações está na garantia de que o nome dos participantes não seja revelado e, para tanto, todo o material coletado será identificado por etiquetas contendo apenas siglas e números, estabelecendo proteção ao sigilo das informações.

A participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar a autorização. A recusa não trará nenhum prejuízo à sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Este estudo não trará nenhum custo para você e todos os procedimentos serão realizados gratuitamente. Não haverá pagamento pela participação nesta pesquisa.

Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética da UFMG, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

Você assinará este Termo declarando que entendeu os objetivos, riscos e benefícios de sua participação na pesquisa, concordando em participar.

Seu responsável também assinará este termo, declarando que também entendeu os objetivos, riscos e benefícios de sua participação na pesquisa, autorizando sua participação.

Nome do Participante: _____
 Assinatura do participante: _____
 Nome do responsável: _____
 Assinatura do responsável: _____



Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana
 Coordenador da Pesquisa
 Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia
 Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG
 CEP: 30130-100 Tel: (31) 3409-9862

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
 (COEP/UFMG)
 Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade
 Administrativa II - Sala 2005 - Belo Horizonte - MG
 CEP: 31270-901 Tel: (31) 3409-4592

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(13 a 17 anos)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*” por morar em uma região que tem muitos casos de hanseníase.

A hanseníase é uma doença, causada por uma bactéria, que causa lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem deixar sequelas. Essa doença é transmitida através do contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa, por meio da respiração. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio frequente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso aceite participar do estudo, será solicitado que você responda a um questionário aplicado por pesquisadores treinados da Escola de Enfermagem da UFMG, com perguntas relacionadas a você e à doença.

Em seguida, será realizado um exame da sua pele e dos nervos para identificar possíveis sinais ou sintomas sugestivos de hanseníase.

Por fim, serão coletados 05 mililitros de sangue, por punção venosa no braço, uma gota de sangue no local da punção e raspado da pele da orelha por um pequeno corte, utilizando material estéril e descartável para evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos destes procedimentos são mínimos e podem estar associados à coleta do material (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido). Com os resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.

Os materiais e os dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores apenas para os objetivos da pesquisa. Uma das preocupações está na garantia de que o nome dos participantes não seja revelado e, para tanto, todo o material coletado será identificado por etiquetas contendo apenas siglas e números, estabelecendo proteção ao sigilo das informações.

A participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar a autorização. A recusa não trará nenhum prejuízo à sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Este estudo não trará nenhum custo para você e todos os procedimentos serão realizados gratuitamente. Não haverá pagamento pela participação nesta pesquisa.

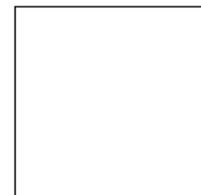
Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética da UFMG, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

Você assinará este Termo declarando que entendeu os objetivos, riscos e benefícios de sua participação na pesquisa, concordando em participar.

Nome do Participante: _____

Assinatura do participante: _____

Nome do responsável: _____



Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana
Coordenador da Pesquisa
Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia
Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG
CEP: 30130-100 Tel: (31) 3409-9862

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
(COEP/UFMG)
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade
Administrativa II - Sala 2005 - Belo Horizonte - MG
CEP: 31270-901 Tel: (31) 3409-4592

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(13 a 17 anos – cópia responsável)

_____ está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*” por morar em uma região que tem muitos casos de hanseníase.

A hanseníase é uma doença, causada por uma bactéria, que causa lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem deixar sequelas. Essa doença é transmitida pelo contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa, por meio da respiração. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio frequente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso concorde com a participação do estudo, será aplicado um questionário por pesquisadores treinados da Escola de Enfermagem da UFMG, com perguntas relacionadas a participante e à doença.

Em seguida, será realizado um exame da pele e dos nervos para identificar possíveis sinais ou sintomas sugestivos de hanseníase.

Por fim, serão coletados 05 mililitros de sangue, por punção venosa no braço, uma gota de sangue no local da punção e raspado da pele da orelha por um pequeno corte, utilizando material estéril e descartável para evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos destes procedimentos são mínimos e podem estar associados à coleta do material (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido). Com os resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.

Os materiais e os dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores apenas para os objetivos da pesquisa. Uma das preocupações está na garantia de que o nome dos participantes não seja revelado e, para tanto, todo o material coletado será identificado por etiquetas contendo apenas siglas e números, estabelecendo proteção ao sigilo das informações.

A participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir e retirar a autorização. A recusa não trará nenhum prejuízo à sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Este estudo não trará nenhum custo para você e todos os procedimentos serão realizados gratuitamente. Não haverá pagamento pela participação nesta pesquisa.

Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética da UFMG, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

Você assinará este Termo declarando que entendeu os objetivos, riscos e benefícios da participação na pesquisa e que autoriza, como responsável, a participação de

Nome do responsável: _____

Assinatura do responsável: _____





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE ENFERMAGEM
 Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*” por morar em uma região que tem muitos casos de hanseníase.

A hanseníase é uma doença, causada por uma bactéria, que causa lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem deixar sequelas. Essa doença é transmitida pelo contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa, por meio da respiração. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio frequente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso aceite participar do estudo, será solicitado que você responda a um questionário aplicado por pesquisadores treinados da Escola de Enfermagem da UFMG, com perguntas relacionadas a você e à doença.

Em seguida, será realizado um exame da sua pele e dos nervos para identificar possíveis sinais ou sintomas sugestivos de hanseníase.

Por fim, serão coletados 05 mililitros de sangue, por punção venosa no braço, uma gota de sangue no local da punção e raspado da pele da orelha por um pequeno corte, utilizando material estéril e descartável para evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos destes procedimentos são mínimos e podem estar associados à coleta do material (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido). Com os resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.

Os materiais e os dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores apenas para os objetivos da pesquisa. Uma das preocupações está na garantia de que o nome dos participantes não seja revelado e, para tanto, todo o material coletado será identificado por etiquetas contendo apenas siglas e números, estabelecendo proteção ao sigilo das informações.

A participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar a autorização. A recusa não trará nenhum prejuízo à sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Este estudo não trará nenhum custo para você e todos os procedimentos serão realizados gratuitamente. Não haverá pagamento pela participação nesta pesquisa.

Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética da UFMG, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

Você assinará este Termo declarando que entendeu os objetivos, riscos e benefícios de sua participação na pesquisa, concordando em participar.

Nome do Participante: _____

Assinatura do participante: _____

Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana
 Coordenador da Pesquisa
 Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia
 Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG
 CEP: 30130-100 Tel: (31) 3409-9862

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
 (COEP/UFMG)
 Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade
 Administrativa II - Sala 2005 - Belo Horizonte - MG
 CEP: 31270-901 Tel: (31) 3409-4592

APÊNDICE B – Questionário para Coleta de Dados

QUESTIONÁRIO CASO ÍNDICE DE HANSENÍASE

| | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------|
| Colar etiqueta com o número do domicílio | | Colar etiqueta com o número do caso índice | |
| FORMULÁRIO DE CASO ÍNDICE | | | |
| IDENTIFICAÇÃO | | | |
| Data da entrevista: __/__/__ | Entrevistador: | Município: | |
| Unidade de saúde/PSF: | | | |
| Nome completo: | | Apelido: | |
| Endereço atual (logradouro, número e bairro): | | | |
| CEP: | Latitude: | Longitude: | |
| Setor Censitário: | Fone: () | Celular: () | |
| E-mail: | | | |
| Idade: | Data de nascimento: ____/____/____ | Sexo: ? M ? F | Peso: |
| Escolaridade: | Naturalidade: | Estado: | |
| DADOS DO DOMICÍLIO | | | |
| Número de pessoas que residem neste endereço: | | Número de cômodos do domicílio: | |
| Número de dormitórios: | Número de pessoas que compartilham o dormitório com o caso índice: | | |
| Alguém que residia com o Sr.(a) até 05 anos antes de você ter hanseníase se mudou? ? Não | | | |
| ? Sim. Quantas pessoas? _____ Contatos (caso resida no mesmo município): | | | |
| Nome: _____ | | | |
| Endereço: _____ | | Telefone: _____ | |
| Nome: _____ | | | |
| Endereço: _____ | | Telefone: _____ | |
| Nome: _____ | | | |
| Endereço: _____ | | Telefone: _____ | |
| Nome: _____ | | | |
| Endereço: _____ | | Telefone: _____ | |
| DADOS EPIDEMIOLÓGICOS | | | |
| Mais algum morador tem/teve hanseníase? ? Não ? Sim. Quantos? _____ | | | |
| Além da hanseníase, o(a) Sr.(a) tem/teve outra(s) doença(s)? ? Não | | | |
| ? Sim. Especificar: | | | |
| ? DM. Há quanto tempo? _____ | | | |
| ? HAS. Há quanto tempo? _____ | | | |
| ? Dislipidemia (colesterol e/ou triglicérides alto). Há quanto tempo? _____ | | | |
| ? Doenças reumatóides (artrite, osteoartrite, artrose, gota). Há quanto tempo? _____ | | | |
| ? Lúpus. Há quanto tempo? _____ | | | |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A Sra. Está grávida? ? Não ? Sim ? Não se aplica Quanto tempo de gestação: _____ Ou com suspeita de gravidez? ? Não ? Sim | |
| Faz uso de algum medicamento regularmente? (Perguntar sobre medicamentos listados) ? Não ? Sim. Especificar: | |
| 1. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ | |
| 2. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ | |
| 3. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ | |
| 4. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ | |
| 5. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ | |
| 6. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ | |
| 7. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ | |
| 8. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ | |
| Cicatriz vacinal de BCG: ? 0 ? 1 ? 2 | Data do diagnóstico: ____/____/____ |
| Data início tratamento: ____/____/____ | Esquema terapêutico: ? PB/6 ? MB/12 ? MB/24 ? ROM ? Outros esquemas alternativos ? Ignorado |
| Data da alta: ____/____/____ | Tipo de alta: ? Cura ? Abandono ? Transferência ? Não se aplica |
| INFORMAÇÕES CLÍNICAS | |
| Presença de lesões na pele: ? Não ? Sim. Quantas? _____ | |
| Presença de nervos acometidos: ? Não ? Sim. Quantos? _____ | |
| Classificação operacional: ? Paucibacilar ? Multibacilar | |
| Forma clínica (Madri): ? I ? T ? D ? V ? Ignorada | |
| Grau de incapacidade física – diagnóstico: ? 0 ? 1 ? 2 ? Ignorado | Grau de incapacidade física – alta: ? 0 ? 1 ? 2 ? Ignorado ? Não se aplica |
| Localização da(s) incapacidade(s): Olhos: ? D ? E Mãos: ? D ? E Pés: ? D ? E | |
| Baciloscopia: ? Não realizada ? Ignorada ? Realizada. Resultado: IB: ? 0 ? 1+ ? 2+ ? 3+ ? 4+ ? 5+ ? 6+ | |
| História de reação: ? Não ? Ignorada ? Sim. Qual? ? Tipo 1 –RR ? Tipo 2 – ENH ? Não especificada | |

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A Sra. Está grávida? ? Não ? Sim ? Não se aplica Quanto tempo de gestação: _____ Ou com suspeita de gravidez? ? Não ? Sim | | |
| Faz uso de algum medicamento regularmente? (Perguntar sobre medicamentos listados) ? Não ? Sim. Especificar: 1. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 2. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 3. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 4. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 5. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 6. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 7. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ 8. _____ . Dose diária: _____ . Tempo de uso: _____ | | |
| AVALIAÇÃO DERMATONEUROLÓGICA | | |
| Cicatriz vacinal de BCG: ? 0 ? 1 ? 2 Sinais sugestivos de hanseníase: ? Não ? Sim. Especificar: | | |
| Avaliação dermatológica: Manchas ? Não ? Sim Quantas: _____ Manchas com alteração de sensibilidade ? Não ? Sim Quantas: _____ Placas ? Não ? Sim Quantas: _____ Tubérculos ? Não ? Sim Quantos: _____ Nódulos ? Não ? Sim Quantos: _____ Infiltrações ? Não ? Sim Quantos: _____ Outras ? Não ? Sim Quantos: _____ Especificar: _____ | Avaliação neurológica: Nervos espessados ? Não ? Sim. Especificar: ? Ulnar ? Radial ? Radial cutâneo ? Fibular ? Tibial posterior Força muscular reduzida ? Não ? Sim. Especificar: ? Pálpebras ? Abdutor do quinto dedo ? Abdutor do polegar ? Extensor do punho ? Extensor do halux ? Extensor longo dos dedos ? Tibial anterior ? Fibulares | Avaliação de sensibilidade: Sensibilidade alterada? ? Não ? Sim. Especificar: ? Olho esquerdo ? Olho direito ? Mão esquerda ? Mão direita ? Pé esquerdo ? Pé direito |
| Diagnóstico confirmado: ? Não ? Sim ? Não avaliado ? Não se aplica | | |
| INFORMAÇÕES RELACIONADAS AO CASO ÍNDICE | | |
| Grau de parentesco: _____ | | |
| Situação de co: ? Residia com o caso índice na data do diagnóstico e reside atualmente ? Residia com o caso índice na data do diagnóstico ? Residia com o caso índice antes da data do diagnóstico – até 5 anos antes <div style="text-align: right; margin-right: 50px;">S</div> | | |
| Há quanto tempo reside com o caso índice? (meses ou anos completos): _____ | | |
| Característica de contato: ? Intradomiciliar ? Peridomiciliar | | |
| Convivência: ? Dorme no mesmo terreno ? Dorme no mesmo domicílio ? Dorme no mesmo cômodo | | |

APÊNDICE C – Formulário de encaminhamento de caso suspeito de Hanseníase

FORMULÁRIO DE ENCAMINHAMENTO DE CASO SUSPEITO DE HANSENÍASE

Dados do usuário

Nome: _____

Endereço completo: _____

Dados Clínicos

Queixa:

Avaliação dermatoneurológica (alterações):

Palpação de nervos (alterações):

Avaliação de força muscular (alterações):

Avaliação de sensibilidade



DIREITA



ESQUERDA



DIREITO



ESQUERDO

Data: ___/___/___

Nome de quem realizou a avaliação: _____

APÊNDICE D - Protocolo para coleta, transporte e armazenamento de sangue

Os procedimentos a serem executados para a coleta devem acompanhar a seguinte ordem:

1. **GARROTEAMENTO:** Os membros a serem puncionados deverão ser garroteados em região mais proximal ao corpo em relação ao ponto de punção. O garrote deverá ser retirado assim que a veia for puncionada e o sangue começar a fluir para o interior do tubo.
2. **ASSEPSIA:** A assepsia do local da punção deve ser feita com algodão embebido em etanol 70%. Devem ser realizadas duas etapas: na primeira, realizam-se três movimentos de limpeza no sentido oposto à inserção da agulha e, na segunda, três movimentos no mesmo sentido da inserção da agulha. A segunda etapa da limpeza não deve ser feita com a mesma região do algodão utilizada na primeira etapa.
3. **PUNÇÃO:** A punção poderá ser feita com a utilização de sistema de coleta a vácuo ou com seringas de êmbolo. Todo o material deve estar esterilizado. Deverão ser coletados 4 mL de sangue em tubo plástico próprio contendo EDTA.
4. **IDENTIFICAÇÃO DOS TUBOS:** Após a coleta, imediatamente será afixada ao tubo uma etiqueta contendo um código que irá identificar o doador.
5. **TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO:** Os tubos deverão ser imediatamente armazenados em caixa própria contendo gelo químico para serem transportados e armazenados em *freezer* a temperatura de -20° C.

APÊNDICE E – Protocolo de extração de DNA pelo Método Qiagen Flexigene

Extração de DNA humano com kit Qiagen

(Método Qiagen FlexiGene)

1. Objetivo:

- Descrição e instrução detalhada das ações e procedimentos a serem desenvolvidos pelos pesquisadores e colaboradores do projeto para extração de DNA retiradas a partir de amostras de sangue periférico.
- Descrição dos métodos envolvidos no gerenciamento de reagentes e armazenagens das alíquotas de DNA extraídas.

2. Materiais e equipamentos utilizados:

- Jaleco
- Luvas
- Óculos de proteção
- Canetas para escrita em plástico
- Centrífuga
- Micro-centrífuga
- Vórtex
- Banho-maria
- Banho seco
- Micropipetas
- Tubos eppendorf 2,0mL ou 0,5mL
- Kit de extração de DNA Qiagen FlexiGene (Nº Cat. 51206)

3. Responsabilidades:

Este procedimento deve ser realizado pelos membros da pesquisa que tenham sido previamente treinados e acompanhados por outros alunos que já desenvolvem esta técnica com experiência.

4. Procedimento Operacional:

Antes de qualquer experimento deve-se certificar de que todos os materiais que serão utilizados estejam disponíveis e deve-se realizar a assepsia dos materiais e equipamentos a serem utilizados.

4.1. Etapa pré-operacional

Ressuspender o liofilizado Protease Qiagen seguindo os volumes de Buffer FG3 (buffer de hidratação) indicado no próprio tubo de protease (0.3mL ou 1.4mL).

4.2. Etapa operacional:

1. Separar os tubos de sangue provindos da coleta;
2. Centrifugar o tubo de sangue a 2.500rpm por 10 minutos;
3. Com o auxílio de uma micropipeta, retirar o máximo de plasma possível sem que se altere o creme leucocitário;
4. Colher 1mL de células (leucócitos e hemácias), transferir para um eppendorf de 2mL;
5. Centrifugar o restante do sangue no tubo de coleta, a 2.500rpm por 10 minutos;
6. Ao tubo eppendorf adicionar 500µL de FG1 e homogeneizar com auxílio do vortéx até que se observe o aparecimento de espuma;
7. Centrifugar o tubo eppendorf por 3 minutos a 11.000rpm;
8. Descartar o sobrenadante e secar bem em papel absorvente;
9. Adicionar mais 1mL de sangue ao tubo eppendorf e repetir as etapas 6, 7 e 8;
10. Adicionar mais 500µL de FG1 no tubo eppendorf e homogeneizar no vortéx até que o pellet seja dissolvido. Caso o pellet ainda continue rosado, pode ser feita mais uma lavagem com 500µL de FG1;
11. Adicionar 250µL de FG2 + 2,5µL de proteinase K em cada tubo;
12. Homogeneizar no vortéx ou por pipetagem até a total dissolução do pellet;
13. Levar ao banho-maria com temperatura de 60 a 65°C por 15 minutos;
14. Acrescentar 500µL de isopropanol P.A gelado (ou etanol P.A);
15. Homogeneizar por alguns segundos no vortéx. Nesta etapa observa-se o DNA sendo precipitado na forma de um novelo, quanto maior o novelo, maior o rendimento da extração;

16. Centrifugar por 3 minutos a 11.000rpm;
17. Descartar o sobrenadante e secar bem em papel absorvente;
18. Acrescentar 500 μ L de etanol a 70% gelado;
19. Homogeneizar e centrifugar por 3 minutos a 11.000rpm;
20. Descartar o sobrenadante e secar bem em papel absorvente por no mínimo 10 minutos;
21. Ressuspender em 350 μ L de FG3 e dissolver todo o pellet usando o vortéx. Caso se perceba a quantidade de DNA seja pouca, na etapa, na etapa 15, diminua a quantidade de FG3 para 200 μ L.
22. Caso persista o pellet, levar ao banho seco por 10 minutos a 65. O DNA pode ficar por várias horas para que seja todo dissolvido; 23. Separar 50 μ L em tubo eppendorf de 0,5mL, como alíquota, e o restante em tubo eppendorf de 2,0mL, como estoque;
24. Armazenar a -20 C.

OBS: Antes da etapa operacional para extra o com kit Qiagen FlexGene, lavar 3 vezes com soluço de TRIS:NH₄Cl (1:9) pH 7,65.

TRIS-HCl: 0,17M; pH 7,65; 100mL

- 0,17M= g = 2,059g (Solu o filtrada e autoclavada)

121,114 x 0,1L

NH₄Cl: 0,155M; 200mL

- 0,155M= g = 2,059g (Solu o filtrada)

53,49 x 0,2L

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Departamento de Enfermagem Materno Infantil



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE ENFERMAGEM
 DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM MATERNO INFANTIL E SAUDE PUBLICA
 Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia
 CEP.: 30.130-100 - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil
 Tel.: 3248-9860 FAX.: 3248-9859 E-mail: emi@enf.ufmg.br

PARECER

ASSUNTO: PROJETO DE PESQUISA

"ANÁLISE DO PROCESSO DE EXPOSIÇÃO, INFECÇÃO E ADOECIMENTO DE CONTATOS DOMICILIARES DE CASOS DE HANSENIASE POR MEIO DE MARCADORES DE INFECÇÃO E DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA AO MYCOBACTERIUM LEPRAE"

INTERESSADO: PROF. FRANCISCO CARLOS FÉLIX LANA

RELATORA: PROF. LENICE DE CASTRO MENDES VILLELA

HISTÓRICO:

Recebi da Secretaria do Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública, em 07/03/2012, para emissão de parecer, o Projeto de Pesquisa: "Análise do processo de exposição, infecção e adoecimento de contatos domiciliares de casos de hanseníase por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*" de autoria do Prof. Francisco Carlos Félix Lana.

MÉRITO:

Trata-se de um projeto de pesquisa que tem como objetivo analisar uma coorte de contatos domiciliares de casos índice de hanseníase, quanto ao processo de exposição, infecção e adoecimento por meio de marcadores de infecção e de suscetibilidade genética ao *Mycobacterium leprae*, na Região de Almenara / Minas Gerais.

O estudo tem como justificativa principal a necessidade da compreensão do processo exposição, infecção e adoecimento, uma vez que pode intervir precocemente no controle da hanseníase. Segundo os autores o conhecimento atual e as tecnologias disponíveis não são suficientes para o diagnóstico precoce, pois são baseadas em parâmetros clínicos e para tanto se faz necessário a manifestação de sinais

Aprovado em reunião da Câmara

Clara de Jesus Marques Andrade
 Profª Clara de Jesus Marques Andrade
 Chefe do Departamento de Enfermagem Materno

característicos da doença. O desafio, portanto, é aprimorar e desenvolver novas tecnologias integrando áreas como biologia molecular, genética e imunologia. Na área da biologia molecular destaca-se a utilização da reação em cadeia de polimerase (PCR) para detectar e quantificar o DNA do bacilo, bem como determinar sua viabilidade, o que contribui para detecção precoce da hanseníase entre os contatos. Em relação à genética é amplamente aceita a hipótese da influência da composição genética do indivíduo na suscetibilidade à doença, tanto em relação ao seu desenvolvimento quanto na evolução para suas diferentes formas clínicas. Os principais genes e regiões genômicas relacionados à suscetibilidade à hanseníase são aqueles ligados à produção de citocinas e outras moléculas importantes na via imunológica, como os genes dos receptores do tipo *Toll* (TLR) e NOD (do inglês *Nucleotide-binding oligomerization*). Sugerem que a presença de alelos desses genes pode ser utilizada como um marcador para a suscetibilidade ou resistência à doença e um dos indicadores para o prognóstico da infecção. Por fim, no campo da imunologia referem-se ao teste sorológico capaz de detectar anticorpos contra o glicolípido fenólico-1 (PGL-I) que pode ser utilizado como um marcador de infecção que auxilia na identificação de indivíduos expostos, com infecção subclínica, e com hanseníase no seu estágio inicial. O aumento da produção de anti PGL-I pode estar relacionado com a manifestação clínica da doença, portanto é importante o acompanhamento periódico de todos os indivíduos que apresentam resultado anti PGL-I positivo.

A metodologia está bem descrita e define o estudo como epidemiológico de coorte prospectiva, com amostra constituída por 110 contatos domiciliares, com idade superior a sete anos de idade, que residem nos municípios de Almenara, Jacinto, Jordânia e Rubim. Envolve a realização de exame dermatoneurológico, análise de sorologia anti PGL-I, de viabilidade do *Mycobacterium leprae* e de suscetibilidade genética. A amostra foi selecionada a partir do estudo "Soropositividade anti PGL-I em contatos domiciliares de casos de hanseníase na microrregião de Almenara". Além disso, serão incluídos os contatos domiciliares dos casos notificados desde o ano de 2011 até a data de início da coleta de dados, que concordarem em participar do estudo. Pretende-se utilizar um questionário semi-estruturado contendo questões relacionadas aos aspectos sócio-demográficos, situação vacinal por BCG e características clínico-epidemiológicas do caso-índice. Objetiva-se coletar amostras de 05 ml (cinco mililitros) de sangue total dos contatos para análise de suscetibilidade genética e sorologia anti PGL-I. Para análise da viabilidade bacilar será realizado coleta de raspado intradérmico dos lóbulos auriculares. A técnica de PCR será utilizada para a análise de viabilidade bacilar e de suscetibilidade genética, e para a análise anti PGL-I o teste ML Flow. Para caracterização da população de estudo será