

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENFERMAGEM

Evaldo Pinheiro Amaral

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE FATORES GENÉTICOS NA
SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE NA POPULAÇÃO DA
MICRORREGIÃO DE ALMENARA, MINAS GERAIS**

Belo Horizonte

2012

Evaldo Pinheiro Amaral

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE FATORES GENÉTICOS NA
SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE NA POPULAÇÃO DA
MICRORREGIÃO DE ALMENARA, MINAS GERAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Enfermagem.

Orientador: Dr. Francisco Carlos Félix Lana

Co-orientador: Dr. Milton Ozório Moraes

Belo Horizonte

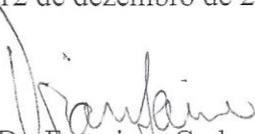
2012

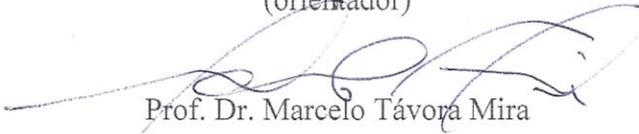
A485a Amaral, Evaldo Pinheiro.
Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à Hanseníase na população da microrregião de Almenara, Minas Gerais [manuscrito]. / Evaldo Pinheiro Amaral. - - Belo Horizonte: 2012. 122f.: il.
Orientador: Francisco Carlos Félix Lana.
Co-Orientador: Milton Ozório Moraes.
Área de concentração: Saúde e Enfermagem.
Tese (doutorado): 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. Moraes, Milton Ozório. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: WC 335

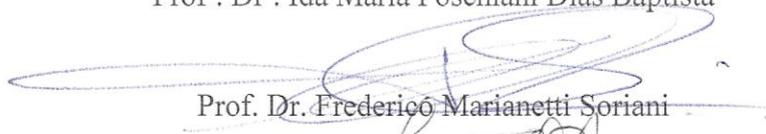
ATA DE NÚMERO 29 (VINTE E NOVE) DA SESSÃO PÚBLICA DE ARGÜIÇÃO E DEFESA DA TESE APRESENTADA PELO CANDIDATO EVALDO PINHEIRO AMARAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENFERMAGEM.

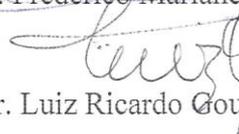
Aos 12 (doze) dias do mês de dezembro de dois mil e doze, realizou-se no Anfiteatro da Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, a sessão pública para apresentação e defesa da tese *"ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE FATORES GENÉTICOS NA SUSCETIBILIDADE À HANSENÍASE NA POPULAÇÃO DA MICRORREGIÃO DE ALMENARA, MINAS GERAIS"*, do aluno Evaldo Pinheiro Amaral, candidato ao título de "Doutor em Enfermagem". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores: Francisco Carlos Félix Lana (orientador), Marcelo Távora Mira, Ida Maria Foschiani Dias Baptista, Frederico Marianetti Soriani e Luiz Ricardo Goulart Filho, sob a presidência do primeiro. Os trabalhos iniciaram-se às 14:00 horas com apresentação oral do candidato, seguida de argüição pelos membros da Comissão Examinadora. Após avaliação, os examinadores consideraram *Evaldo Pinheiro Amaral, aprovado e apto a receber o título de doutor em enfermagem após a entrega da versão definitiva da tese*. Nada mais havendo a tratar, eu, Grazielle Cristine Pereira, 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, 12 de dezembro de 2012.


 Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana
 (orientador)


 Prof. Dr. Marcelo Távora Mira


 Prof. Dr. Ida Maria Foschiani Dias Baptista


 Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani


 Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho


 Grazielle Cristine Pereira
 Secretária do Colegiado de Pós-Graduação


 Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana
 Coordenador do Colegiado de Pós-Graduação
 ESCOLA DE ENFERMAGEM/UFMG

HOMOLOGADO em reunião do CPG
 Em 05/02/13

*Aos pacientes portadores de hanseníase e aos seus familiares,
por terem nos recebido em suas casas e
possibilitado a realização deste estudo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus,
que esteve ao meu lado em todos os momentos, me dando forças e guiando meus passos e por ter colocado pessoas importantes para me auxiliar nesta jornada.

Aos meus pais e irmãs,
pelo amor, apoio e compreensão incondicionais.

A minha esposa Andréia,
pelo amor e carinho, além da compreensão e incentivo fundamentais para a conclusão desta etapa.

Aos demais familiares e amigos,
pela torcida, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Ao Prof. Francisco Carlos Félix Lana,
pelo apoio e orientação ao longo de toda minha trajetória acadêmica, pela confiança no meu trabalho, por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional e pela amizade ao longo desses anos.

Ao Prof. Milton Ozório Moraes,
pela coorientação, ensinamentos e apoio durante a realização deste trabalho e pela oportunidade de aprimoramento profissional.

Às colegas Marcilane, Angélica, Fabiana e Ana Paula,
pela convivência e auxílio fundamental na realização deste trabalho, especialmente durante o período da coleta de dados em Almenara.

Às bolsistas de iniciação científica Sarah e Bárbara,
pelo auxílio durante a etapa das análises laboratoriais.

Às colegas do grupo de pesquisa Amanda, Virgínia, Fernanda e Ana Valesca,
pela amizade, incentivo, momentos de descontração e oportunidades de construção do conhecimento.

À equipe do Laboratório de Hanseníase da FIOCRUZ/RJ, em especial à Dra. Euzenir Nunes Sarno, ao Dr. Antônio Pacheco, a Carolinne Marques, a Lucia Elena, a Cristiane Domingues e a José Augusto,
pelo apoio técnico e científico durante a realização de todas as etapas deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do CPqRR/FIOCRUZ, em especial ao Dr. Rodrigo Oliveira, à Dra. Jaqueline Germano, ao Dr. Carlos Eduardo, a Clari Gandra, a Guilherme Oliveira, a Luciana Lisboa e aos bolsistas de iniciação científica,
por terem proporcionado as condições técnicas necessárias e auxiliado na realização das análises laboratoriais.

À equipe do Laboratório de Imunopatologia do CPqRR/FIOCRUZ, em especial à Dra. Fernanda Barbosa Nogueira Raad,
pelo auxílio e disponibilidade na realização das genotipagens das amostras de DNA.

Aos colegas Peritos Bruno, Cristiano, Heuber, Jorge, Renata e Pádua,
pela compreensão, apoio e colaboração fundamentais para viabilizar a adequação das atividades de pesquisa e trabalho durante a etapa de coleta de dados em Almenara.

À família de José Gobira,
pelo apoio e receptividade na chegada e estadia em Almenara.

Aos profissionais de saúde dos municípios da microrregião de Almenara, em especial aos Enfermeiros e Agentes Comunitários de Saúde,
pelo apoio durante a etapa de coleta de dados, principalmente em relação à sensibilização dos pacientes e seus familiares.

À equipe da Coordenadoria Estadual de Dermatologia Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais,
pela disponibilização de alguns dados utilizados neste estudo.

À equipe da Gerência Regional de Saúde de Pedra Azul, em especial a Glória Botelho e Manoel,
pelo apoio durante a realização da coleta de dados.

Aos motoristas Sebastião, Luís Carlos e André,
pela tranquilidade, segurança na condução e momentos de descontração durante as diversas viagens ao campo.

Aos professores e funcionários da Escola de Enfermagem da UFMG, em especial aos do Colegiado de Pós-Graduação,
pelo aprendizado proporcionado e apoio nas atividades acadêmicas.

Aos colegas e amigos da pós-graduação,
pela convivência, incentivo e colaboração na construção do conhecimento e pelos momentos de descontração.

*“O real não está na saída nem na chegada:
ele se dispõe para a gente é no meio da travessia”.*

João Guimarães Rosa

RESUMO

AMARAL, E. P. **Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase na população da microrregião de Almenara, Minas Gerais.** 2012. 122 f. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa que apresenta um largo espectro de manifestações clínicas. Essa grande variação é determinada pela resposta imunológica do hospedeiro à infecção pelo *Mycobacterium leprae*, que por sua vez é influenciada pela composição genética do indivíduo. A maioria dos genes e regiões genômicas associadas com a suscetibilidade ou resistência à doença estão relacionadas à produção de citocinas e outras moléculas importantes das vias imunológicas. No entanto, embora esta hipótese seja amplamente aceita, diferentes estudos realizados com populações distintas apresentam resultados muitas vezes discordantes ou controversos. Por esta razão, torna-se necessária a realização de estudos adicionais, com diferentes desenhos e populações, visando replicar e validar os resultados já encontrados. O objetivo deste estudo foi analisar a influência de polimorfismos de base única (SNP) na suscetibilidade à hanseníase na população da microrregião de Almenara, Minas Gerais. Para tal fim, utilizou-se um estudo baseado em famílias e a análise foi realizada por meio do Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT). Foram analisados polimorfismos dos genes *TLR1*, *NOD2*, *LTA4H*, *IFNG* e *IL10*. A amostra populacional foi composta por 125 núcleos familiares de casos de hanseníase residentes nos municípios de Almenara, Felisburgo, Jacinto, Jordânia, Palmópolis e Rubim, totalizando 447 indivíduos. Foram realizadas meta-análises para se estimar as medidas de associação de consenso entre os estudos disponíveis sobre os genes *TLR1*, *IFNG* e *IL10*. A análise do desequilíbrio de transmissão identificou a associação estatisticamente significativa dos SNPs rs4833095 e rs5743618 do gene *TLR1* e a hanseníase *per se*, com os alelos G e T, respectivamente, associados à suscetibilidade à doença. A análise da transmissão desses dois marcadores também indicou que os haplótipos G/T e A/G (rs4833095/rs5743618) estavam associados à suscetibilidade e à resistência à hanseníase, respectivamente. Não foram encontradas associações significativas entre os alelos e haplótipos dos demais polimorfismos estudados e a doença. Os resultados das meta-análises mostraram associações estatisticamente significativas para a combinação dos estudos sobre os SNP dos genes *TLR1* (rs4833095 e rs5743618), *IFNG* (rs2430561) e *IL10* (rs1800871). Os resultados obtidos confirmaram o papel do gene *TLR1* na regulação da resposta imunológica ao *M. leprae* e apontaram para a necessidade de novos estudos sobre os demais genes analisados para que se obter resultados conclusivos.

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

ABSTRACT

AMARAL, E. P. **Analysis of the influence of genetic factors on the susceptibility to leprosy among the population from the microregion of Almenara, Minas Gerais.** 2012. 122f. Thesis (Doctorate in Nursing) – Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

Leprosy is an infectious disease that presents a large spectrum of clinical manifestations. This variation is correlated to the level of the host immune response to the *Mycobacterium leprae*, which in turn is influenced by the individual genetic background. The majority of genes and genomic regions associated with susceptibility/resistance to leprosy are related to the production of cytokines and other important molecules in the immunological pathways. However, although this hypothesis is widely accepted, different studies with distinct populations have often discordant or controversial results. For this reason, it is necessary to perform additional studies, with different designs and populations, aiming to replicate and validate the results already found. The objective of this study was to analyze the influence of single nucleotide polymorphisms (SNP) on the susceptibility to leprosy among the population from the microregion of Almenara, Minas Gerais. For this purpose, it was conducted a family based study and the analysis was performed using the Transmission Disequilibrium Test (TDT). Genetic polymorphisms of *TLR1*, *NOD2*, *LTA4H*, *IFNG* and *IL10* genes were analyzed. The sample was composed of 125 nuclear families of leprosy cases from the cities of Almenara, Felisburgo, Jacinto, Jordania, Palmópolis and Rubim, with a total of 447 individuals. Meta-analysis were carried out to define consensus association estimates for the available studies about *TLR1*, *IFNG* and *IL10* genes. The analysis of transmission disequilibrium identified a statistically significant association between the *TLR1* rs4833095 and rs5743618 SNPs and the leprosy *per se*, and the G and T alleles, respectively, were associated to the disease susceptibility. The analysis of the transmission of these markers also indicated that the G/T and A/G haplotypes (rs4833095/rs5743618) were associated to susceptibility and resistance to leprosy, respectively. No significant associations were found between the alleles and haplotypes of the other polymorphisms and the disease. Meta-analysis showed statistically significant results for the *TLR1* rs4833095 and rs5743618, *IFNG* rs2430561 and *IL10* rs1800871 SNPs. The results confirmed the role of *TLR1* gene on the regulation of immune response to the *M. leprae* and indicate that other studies will be required for conclusive results to the other genes analyzed.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Mapa dos coeficientes de prevalência da hanseníase no mundo – Início de 2011.....	18
FIGURA 2 - Mapas do Brasil com a comparação dos <i>clusters</i> de alto risco de hanseníase – 2005 – 2007 e 2007 – 2009.....	31
FIGURA 3 - As vias mais proeminentes envolvendo genes consistentemente associados com a hanseníase em estudos genéticos.....	45
FIGURA 4 - Ilustração gráfica do resultado da genotipagem por PCR em tempo real.....	57
FIGURA 5 - Diagrama ilustrativo da análise do desequilíbrio de ligação entre os marcadores dos genes <i>TLR1</i> (a), <i>NOD2</i> (b) e <i>LTA4H</i> (c).....	66
FIGURA 6 - Diagrama representativo da meta-análise dos estudos que analisaram o marcador rs4833095 (N248S) do gene <i>TLR1</i>	73
FIGURA 7 - Diagrama representativo da meta-análise dos estudos que analisaram o marcador rs5743618 (I602S) do gene <i>TLR1</i>	74
FIGURA 8 - Diagrama representativo da meta-análise dos estudos que analisaram o marcador rs2430561(+874 T/A) do gene <i>IFNG</i>	76
FIGURA 9 - Diagrama representativo da meta-análise dos estudos que analisaram o marcador rs1800871 gene <i>IL10</i>	78
QUADRO 1 - Relação dos SNP analisados e dos estudos de associação genética publicados sobre eles até agosto de 2012.....	51
QUADRO 2 - Relação dos coletados no formulário de caso-índice segundo a fonte.....	55
QUADRO 3 - Relação dos artigos identificados na revisão sistemática e avaliação dos critérios para inclusão na meta-análise.....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características dos casos de hanseníase participantes do estudo.....	62
TABELA 2 - Caracterização dos núcleos familiares – Microrregião de Almenara – 2011.....	64
TABELA 3 - Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	65
TABELA 4 - Análise do desequilíbrio de ligação entre os SNP de <i>TLR1</i> , <i>NOD2</i> e <i>LTA4H</i>	67
TABELA 5 - Teste de Desequilíbrio de Transmissão dos alelos.....	67
TABELA 6 - Teste de desequilíbrio de transmissão dos haplótipos formados pelos polimorfismos rs4833095 (N248S) e rs5743618 (I602S) do gene <i>TLR1</i> , respectivamente.....	69
TABELA 7 - Teste de desequilíbrio de transmissão dos haplótipos formados pelos polimorfismos rs805734, rs2066843 e rs751271 do gene <i>NOD2</i> , respectivamente.....	69
TABELA 8 - Teste de desequilíbrio de transmissão dos haplótipos formados pelos polimorfismos rs17525495 e rs1978331 do gene <i>LTA4H</i> , respectivamente.....	70
TABELA 9 - Resultado da meta-análise dos dados dos estudos sobre o SNP <i>TLR1</i> N248S.....	73
TABELA 10 - Resultado da meta-análise dos dados dos estudos sobre o SNP <i>TLR1</i> I602S.....	75
TABELA 11 - Resultado da meta-análise dos dados dos estudos sobre o SNP <i>IFNG</i> +874.....	76
TABELA 12 - Resultado da meta-análise dos dados dos estudos sobre o SNP <i>IL10</i> -819.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	- Agente Comunitário de Saúde
APC	- Célula apresentadora de antígenos
BAAR	- Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	- Bacilo Calmette-Guérin
BB	- Forma clínica <i>borderline-borderline</i>
BL	- Forma clínica <i>borderline-lepromatosa</i>
BT	- Forma clínica <i>borderline-tuberculóide</i>
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
CPqRR	- Centro de Pesquisas René Rachou
DC	- Células dendríticas
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
ENH	- Eritema nodoso hansênico
FBAT	- Testes de associação baseados em família
FIOCRUZ	- Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GM-CSF	- Fator estimulador de colônia granulócito-macrófago
GWAS	- Estudo de associação do genoma em larga escala
HD	- Hanseníase dimorfa
HI	- Hanseníase indeterminada
HT	- Hanseníase tuberculóide
HV	- Hanseníase virchowiana
IFN- γ	- Interferon-gamma
I	- Forma clínica indeterminada
IL	- Interleucina
LAM	- Lipoarabinomanana
LD	- Desequilíbrio de ligação
LICM	- Laboratório de Imunologia Celular e Molecular
LL	- Forma clínica lepromatosa
LT- α	- Linfotóxina- α
LTA ₄	- Leucotrieno A ₄
LTA4H	- Leucotrieno A ₄ Hidrolase

LTB ₄	- Leucotrieno B ₄
MB	- Multibacilar
MBL2	- Lecitina ligante de manose 2
MDP	- Dipeptídeo muramil
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
MRC1	- Receptor de manose C tipo 1
mRNA	- RNA mensageiro
NF-κB	- Fator nuclear-kappa B
NK	- Células <i>natural killer</i>
NLR	- Receptores do tipo NOD
NOD2	- <i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OPAS	- Organização Pan-Americana de Saúde
PAMP	- Padrões moleculares associados a patógenos
PB	- Paucibacilar
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
PGL-1	- Glicolípido fenólico-1
PNCH	- Programa Nacional de Controle da Hanseníase
PQT	- Poliquimioterapia
PRR	- Receptores de reconhecimento de padrões
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
RNA	- Ácido ribonucleico
RR	- Reação reversa
SES/MG	- Secretaria de Estado da Saúde
SINAN	- Sistema de Informações de Agravos de Notificação
SNP	- Polimorfismo de base única
STR	- <i>Short tandem repeat</i>
TB	- Tuberculose
TDT	- Teste de desequilíbrio de transmissão
TGF-β	- Fator de crescimento e transformação beta
Th	- T auxiliar
TLR	- Receptores do tipo Toll
TNF-α	- Fator de necrose tumoral alfa

TT - Forma clínica tuberculóide-tuberculóide
UBS - Unidade básica de saúde
VDR - Receptor de vitamina D
VNTR - *Variable number of tandem repeats*
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.1 Objetivos específicos.....	22
3 REFERENCIAL TEÓRICO	24
3.1 Hanseníase.....	24
3.1.1 Conceito, etiologia e transmissão.....	24
3.1.2 Diagnóstico.....	25
3.1.3 Aspectos clínicos e classificação.....	26
3.1.4 Episódios reacionais.....	28
3.1.5 Tratamento.....	29
3.1.6 Situação epidemiológica.....	30
3.2 Aspectos imunológicos da infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i>	32
3.2.1 Resposta imune inata.....	32
3.2.1.1 <i>Toll-like receptors</i>	34
3.2.1.2 <i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2</i>	36
3.2.1.3 Leucotrieno A ₄ Hidrolase.....	36
3.2.2 Resposta imune adaptativa.....	36
3.2.2.1 Interferon-gama.....	39
3.2.2.2 Interleucina 10.....	39
3.3 Estudos de associação genética.....	40
3.4 Influência da composição genética do indivíduo na suscetibilidade à hanseníase.....	44
3.4.1 Genes candidatos.....	46
3.4.1.1 <i>TLR1</i>	46
3.4.1.2 <i>NOD2</i>	47
3.4.1.3 <i>LTA4H</i>	47
3.4.1.4 <i>IFNG</i>	47
3.4.1.5 <i>IL10</i>	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Escolha dos polimorfismos a serem analisados.....	50
4.2 Tipo de estudo.....	50
4.3 Cenário do estudo.....	52
4.4 População do estudo.....	52
4.5 Recrutamento dos sujeitos do estudo.....	53
4.5.1 Abordagem inicial dos pacientes.....	53
4.5.2 Visitas domiciliares.....	54
4.5.3 Coleta de sangue.....	55
4.5.4 Exame dermatoneurológico dos contatos intradomiciliares.....	56
4.5.5 Orientações sobre a hanseníase.....	56
4.6 Extração de DNA.....	56
4.7 Genotipagem das amostras.....	56
4.8 Tratamento e análise dos dados.....	58
4.8.1 Revisão sistemática e meta-análise.....	59

4.9	Aspectos éticos.....	60
4.10	Financiamento.....	60
5	RESULTADOS.....	62
5.1	Caracterização da amostra estudada.....	62
5.2	Análise da associação dos SNP com a hanseníase.....	65
5.3	Meta-análise.....	70
5.3.1	<i>TLR1</i> (<i>rs4833095</i> e <i>rs5743618</i>).....	72
5.3.2	<i>IFNG</i> (<i>rs2430561</i>).....	75
5.3.3	<i>IL10</i> (<i>rs1800871</i>).....	77
6	DISCUSSÃO.....	80
6.1	Características da população estudada.....	80
6.2	Associação dos SNP <i>rs4833095</i> e <i>rs5743618</i> do gene <i>TLR1</i> com a hanseníase.....	81
6.3	Replicação dos SNP <i>IFNG</i> <i>rs2430561</i> e <i>IL10</i> <i>rs1800871</i>	84
6.4	Necessidade de novos estudos para os genes <i>NOD2</i> e <i>LTA4H</i>	87
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
	REFERÊNCIAS.....	94
	APÊNDICES.....	110
	ANEXOS.....	121

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, de evolução lenta, que se manifesta principalmente por meio de sinais e sintomas dermatoneurológicos. Quando permanece sem tratamento, pode evoluir com lesões nos nervos periféricos, que acabam acarretando incapacidades físicas e deformidades. Estas, por sua vez, resultam não apenas em prejuízos econômicos e psicológicos aos doentes, mas também são responsáveis pelo preconceito que recai sobre eles (BRASIL, 2002).

A doença é causada pelo *Mycobacterium leprae* e o homem é considerado seu único reservatório natural com relevância epidemiológica. A forma mais provável de transmissão e infecção ocorre por meio de secreções provenientes das vias aéreas superiores. Desta forma, o convívio frequente e prolongado entre indivíduos suscetíveis e doentes com as formas contagiantes – sem tratamento – constitui um importante fator determinante para a transmissão do bacilo (TALHARI; GARRIDO, 1997; PINTO NETO *et al.*, 2002; ARAÚJO, 2003). O bacilo possui alta infectividade, mas baixa patogenicidade, sendo que a maioria dos indivíduos apresenta imunidade natural a ele. Uma vez exposto ao *M. leprae*, a resposta do hospedeiro pode variar de uma infecção subclínica seguida de cura até a evolução para as formas mais graves da doença ou, ainda, o desenvolvimento das formas mais brandas (FOSS, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008). O desenvolvimento e o padrão da hanseníase, bem como a ocorrência e a intensidade de episódios reacionais, são influenciados por fatores como as condições socioeconômicas, o estado nutricional, a vacinação com BCG e a taxa de exposição ao bacilo (MORAES *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2008). Entretanto, em última instância, o desfecho da infecção está diretamente relacionado à resposta imunológica do hospedeiro (FOSS, 1997; TALHARI; GARRIDO, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; RADA; ARANZAZU; CONVIT, 2009; MODLIN, 2010).

A introdução da poliquimioterapia (PQT), a partir do início da década de 80, reduziu o tempo de tratamento e permitiu a cura da doença, propiciando uma grande diminuição de sua prevalência global. Entretanto, apesar da queda observada na prevalência, os coeficientes de detecção permanecem elevados, contrariando a premissa de que, com a expansão da cobertura pela PQT e o tratamento dos doentes, o potencial de transmissão da doença diminuiria e ela desapareceria gradualmente (MARTELLI *et al.*, 2002). Em 2011, foram registrados 219.075 novos

Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase

casos da doença no mundo, sendo que o Brasil foi responsável por 33.955 desses registros. No final daquele ano, apenas três países – entre eles o Brasil – ainda apresentavam coeficientes de prevalência superiores a 1,00 caso/10.000 habitantes (WHO, 2012a), conforme demonstrado na FIG. 1.

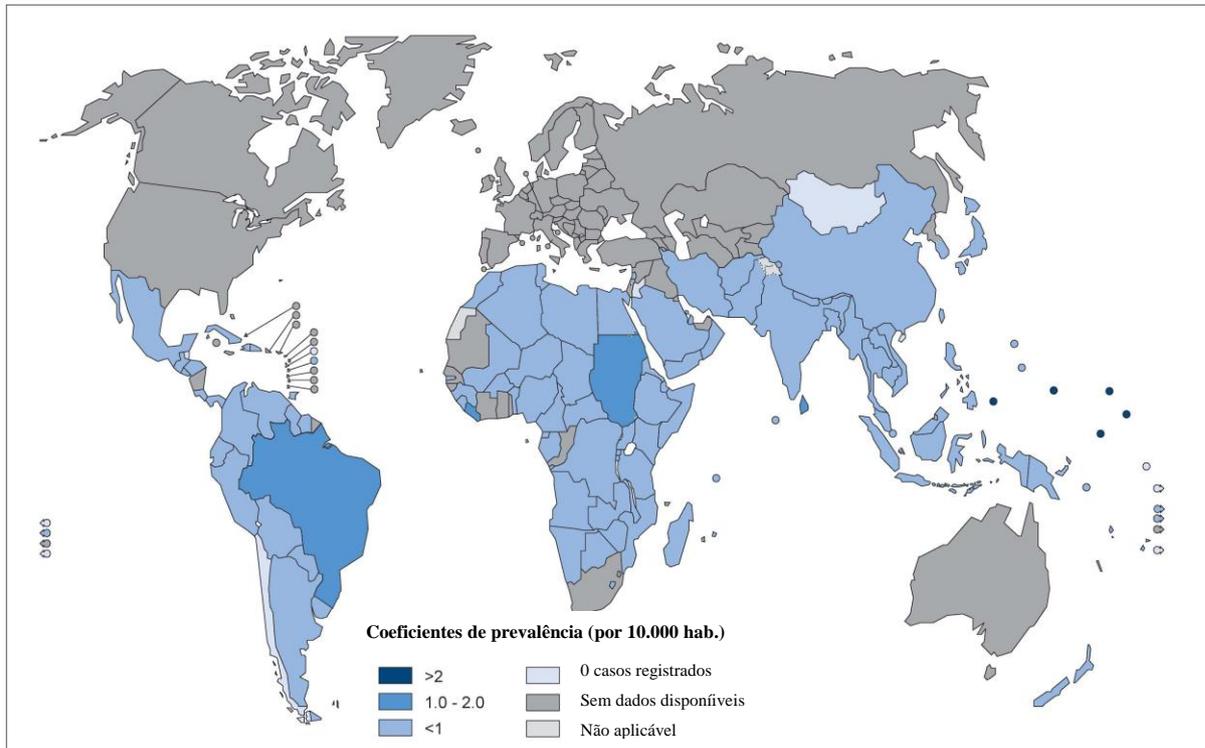


FIGURA 1 – Mapa dos coeficientes de prevalência da hanseníase no mundo – Início de 2011.

Fonte: Adaptado de WHO, 2012b. (Os dados da legenda foram traduzidos para o idioma português).

Atualmente, é amplamente aceita a hipótese de que a composição genética do indivíduo influencia na suscetibilidade à doença, tanto em relação ao seu aparecimento – a hanseníase *per se* – quanto à sua evolução para as diferentes formas clínicas (MARQUET; SCHURR, 2001; ALTER *et al.*, 2008; ALCAÏS; ABEL; CASANOVA, 2009). Diversos estudos sustentam esta hipótese, já tendo sido demonstrado que contatos domiciliares que apresentam relações consanguíneas com o caso índice apresentam risco mais alto de desenvolver a hanseníase quando comparados àqueles contatos que não apresentam essa relação (SUNDAR *et al.*, 1989; FINE *et al.*, 1997; FITNESS; TOSH; HILL, 2002) e que a concordância entre gêmeos monozigóticos em relação ao aparecimento da doença e à sua intensidade é maior que entre gêmeos dizigóticos (ABEL; DEMENAI, 1988; HILL, 2001;

Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase

MORAES *et al.*, 2006; ALTER *et al.*, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2008). O agrupamento de casos em conglomerados, famílias ou comunidades com antecedentes genéticos comuns reforça a hipótese da influência genética na suscetibilidade à doença (MORAES *et al.*, 2006).

Devido ao importante papel desempenhado pela imunidade do hospedeiro no espectro clínico da doença, 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 (ALCAÏS *et al.*, 2005; PREVEDELLO; MIRA, 2007; SOUZA; PEREIRA *et al.*, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2008; MISCH *et al.*, 2010, SARDINHA *et al.*, 2011).

No entanto, diferentes estudos realizados com diferentes populações apresentam, muitas vezes, resultados discordantes ou conflitantes. Estas discrepâncias poderiam ser explicadas, em parte, por equívocos no delineamento dos estudos como, por exemplo, no dimensionamento e na seleção das amostras. Outra explicação poderia ser a existência de especificidades no perfil genético de cada uma das populações, relacionadas à resistência/suscetibilidade ao *M. leprae*, resultantes das diferentes pressões seletivas a que elas têm sido expostas ao longo da história. Desta forma, tornam-se necessários estudos adicionais com diferentes desenhos e em populações distintas, a fim de replicar os resultados e alcançar a sua validação, evitando-se as a ocorrência de associações espúrias (PACHECO; MORAES, 2009; SOUZA; PEREIRA, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2008). A meta-análise constitui outra importante estratégia que pode ser utilizada para se definir uma estimativa da medida de associação de consenso entre os diversos estudos (PACHECO *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2011).

Um estudo realizado pelo grupo do Programa Nacional de Controle da Hanseníase (PNCH) identificou as áreas com as maiores concentrações da doença (*clusters*) no país (BRASIL, 2008). Dois destes *clusters* englobam cidades de Minas Gerais, com destaque para o de número 4, do qual fazem parte 73 municípios do Estado. Entre estes, estão os 16 que compõem a microrregião de Almenara. Estudos anteriores (AMARAL; LANA, 2008) já apontavam esta microrregião como hiperendêmica.

Diante disso, viu-se a oportunidade da realização de um estudo visando analisar a influência de fatores genéticos na resistência/suscetibilidade à hanseníase na população da microrregião de Almenara, Estado de Minas Gerais.

Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase

Conhecer melhor a imunopatogênese da hanseníase e o papel desempenhado por fatores genéticos envolvidos na resistência/suscetibilidade do indivíduo à infecção pelo *M. leprae* pode permitir o desenvolvimento de formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença, por meio da predição do risco de adoecer e/ou de desenvolver suas formas clínicas mais graves.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a influência de polimorfismos genéticos na suscetibilidade à hanseníase na população de municípios da microrregião de Almenara, Minas Gerais, visando replicar resultados encontrados por outros estudos de mesma natureza.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a existência de associação entre polimorfismos de base única (SNP) nos genes *TLR1* (rs4833095 e rs5743618), *NOD2* (rs8057341, rs2066843 e rs751271), *LTA4H* (rs1978331 e rs17525495), *IFNG* (rs2430561) e *IL10* (rs1800871) e a suscetibilidade à hanseníase.
- b) Analisar a existência de associação entre os haplótipos dos genes *TLR1* (rs4833095 e rs5743618), *NOD2* (rs8057341, rs2066843 e rs751271) e *LTA4H* (rs1978331 e rs17525495) e a suscetibilidade à hanseníase.
- c) Realizar uma meta-análise sobre a associação dos SNP nos genes de *TLR1* (rs4833095 e rs5743618), *IFNG* (rs2430561) e *IL10* (rs1800871) e a suscetibilidade à hanseníase, incluindo os resultados obtidos neste estudo e em outros estudos em andamento do nosso grupo de pesquisa em populações distintas.

*“O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um oceano”.*

Isaac Newton

Referencial Teórico

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Hanseníase

3.1.1 Conceito, etiologia e transmissão

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa que atinge principalmente a pele e os nervos periféricos. Em raras situações, pode vir a acometer ossos, linfonodos, estruturas nasais e testículos. Ela apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas e histopatológicas, que podem variar de uma única lesão de pele com alteração da sensibilidade até um vasto comprometimento neural. Esta característica confere à doença um grande potencial incapacitante, sendo responsável pelas deficiências e deformidades físicas apresentadas por muitos de seus portadores (TALHARI; GARRIDO, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; ARAÚJO, 2003).

O agente causador da hanseníase é o *Mycobacterium leprae*, também conhecido como bacilo de Hansen, em homenagem ao seu descobridor o médico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912). Trata-se de um parasita intracelular obrigatório, que infecta principalmente macrófagos e células de Schwann (KAPLAN; COHN, 1986). Ele possui a forma de um bastonete reto ou ligeiramente curvado e nos exames histopatológicos pode ser visto isolado ou agrupado por meio de uma substância chamada gléia. É considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois não se descora pela lavagem no álcool e ácido após ser corado pela fucsina (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

Comparado a outras micobactérias como, por exemplo, o *Mycobacterium tuberculosis*, o *M. leprae* apresenta uma grande redução evolutiva em seu genoma, resultando na perda de genes em diversas categorias funcionais, entre elas mecanismos essenciais à sua replicação (COLE *et al.*, 2001; MONOT *et al.*, 2009). Isto justifica sua dependência em relação à utilização das estruturas presentes nas células do hospedeiro e também o longo período necessário para sua multiplicação, que varia de 12 a 14 dias (van BEERS; WIT; KLATSER, 1996). Estes fatores também explicam os fracassos na tentativa de cultivo *in vitro* do bacilo para estudos.

Embora já se saiba que o tatu da espécie *Dasypus novemcinctus* pode ser naturalmente infectado pelo *M. leprae* (SCOLLARD *et al.*, 2006; TRUMAN *et al.*,

2011), o homem ainda é considerado o único reservatório natural do bacilo com relevância epidemiológica.

Os doentes sem tratamento, em especial aqueles que apresentam alta carga bacilar, são considerados a principal fonte de infecção e a transmissão provavelmente ocorre por meio de secreções das vias aéreas superiores (ARAÚJO, 2003). Desta forma, o contato frequente e prolongado de indivíduos suscetíveis com esses portadores favorece a infecção (PINTO NETO *et al.*, 2002; DOUGLAS *et al.*, 2004).

3.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é feito através do exame físico, em que se busca identificar os sinais dermatoneurológicos da doença. A avaliação dermatológica visa identificar lesões na pele com alterações da sensibilidade térmica, dolorosa e/ou tátil, típicas da doença. Já a avaliação neurológica consiste na inspeção dos olhos, nariz, mãos e pés, palpação dos nervos periféricos, avaliação da força muscular e da sensibilidade nos olhos, membros superiores e inferiores. A palpação dos nervos periféricos tem o objetivo de verificar se há espessamento dos ramos que inervam os membros superiores e inferiores, visando prevenir lesões neurais e consequentes incapacidades (BRASIL, 2002).

Como método complementar, existe a baciloscopia, que é um exame bacteriológico em que se busca identificar o *M. leprae* em esfregaços de raspados intradérmicos colhidos nos lóbulos das orelhas, nos cotovelos e nas lesões suspeitas do paciente. Este é considerado apenas um método de apoio ao diagnóstico, pois o seu resultado negativo não exclui a confirmação da doença – desde que esta seja evidenciada por sinais clínicos. Pode ser utilizado também para auxiliar na classificação operacional do doente (BRASIL, 2002).

A reação de Mitsuda é um teste de aplicação intradérmica e leitura tardia, com resposta do tipo granulomatosa, avaliada de três a quatro semanas após a inoculação de antígenos da hanseníase (entre eles a lepromina), resultando em pápula infiltrada (positiva) ou ausência de alteração cutânea (negativa). No entanto, ela não possui valor diagnóstico, servindo apenas para medir a capacidade do indivíduo em montar uma resposta imune celular contra o *M. leprae* (ARAÚJO, 2003; SCOLLARD, 2006).

3.1.3 Aspectos clínicos e classificação

A infecção ativa pelo *M. leprae* é caracterizada por uma grande variedade do curso clínico. Evidências clínicas e epidemiológicas apontam que a grande maioria das pessoas apresenta algum tipo de imunidade inata ao bacilo, sendo que apenas uma pequena parcela dos indivíduos infectados por ele chega a desenvolver a doença. Nestes, as manifestações podem variar de uma forma mais branda – na qual há poucos bacilos presentes e as lesões são localizadas e em pequeno número – às formas mais avançadas – com grande proliferação bacilar, extensas lesões de pele e graves danos neurais (MODLIN, 1994; FOSS, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008).

O grande espectro de manifestações clínicas da hanseníase deu origem a diversas classificações. Para fins de pesquisas clínico-epidemiológicas, a mais utilizada é a criada na década de 60 por Ridley e Jopling (1966). Já para fins operacionais, a mais usada é a de Madri, proposta em 1953, durante o Congresso Internacional de Leprologia.

O modelo de Ridley-Jopling (1966) baseia-se em exames histológicos e baciloscópicos e divide o espectro de variação em cinco diferentes formas clínicas, sendo duas polares e três interpolares. As formas polares são a tuberculóide (TT) – caracterizada por lesão cutânea ou neural localizada e predomínio de resposta imune celular, com pouco ou nenhum bacilo – e a lepromatosa (LL) – que apresenta deficiência de resposta imune celular e predomínio de resposta humoral, com disseminação da doença. As formas interpolares – denominadas *borderline* – são *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatosa* (BL). Elas apresentam, nessa ordem, progressiva redução da resposta imune celular, acompanhada por lesões de pele e nervos mais numerosas, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos (RIDLEY; JOPLING, 1966). Posteriormente, a forma clínica indeterminada (I) foi descrita como sendo um estágio inicial e transitório da doença que, posteriormente, evolui para alguma das demais formas, mais estáveis (JOPLING; Mc DOUGALL, 1988). Este sistema possui a vantagem de apresentar uma grande concordância entre aspectos clínicos, imunológicos e patológicos (PARDILLO *et al.*, 2007). No entanto, depende de exames que nem sempre estão acessíveis aos serviços de saúde responsáveis pelo diagnóstico e tratamento da hanseníase, principalmente em regiões mais pobres.

Na classificação de Madri, a doença é dividida em quatro diferentes formas clínicas, com base em critérios clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos. As formas tuberculóide (HT) e virchowiana (HV) são consideradas tipos polares opostos e imunologicamente estáveis. Já as formas indeterminada (HI) e dimorfa (HD) compõem grupos imunologicamente instáveis. O grupo HI é considerado a forma inicial da hanseníase e, no curso natural da doença, pode evoluir para a cura, para um dos polos ou permanecer como indeterminada (OMS; OPAS, 1989).

Frente à necessidade de expandir a campanha de eliminação da hanseníase e aumentar a oferta de tratamento para áreas mais carentes, a Organização Mundial de Saúde (OMS) passou a adotar a contagem do número de lesões de pele como forma de classificar operacionalmente os pacientes (PARDILLO *et al.*, 2007, MENDONÇA *et al.*, 2008). Neste sistema, são considerados como PB e MB aqueles que apresentam de uma a cinco lesões ou mais de cinco lesões, respectivamente (WHO, 1995). Este modelo facilita o trabalho de campo, mas pode gerar erros na classificação com conseqüente sub ou supertratamento dos pacientes, aumentando os riscos de recidiva ou de danos à saúde provocados pelos efeitos colaterais dos medicamentos, respectivamente (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2007; PARDILLO *et al.*, 2007; BARRETO *et al.*, 2008; GROSSI *et al.*, 2008).

Com precisão limitada, os modelos de classificação de Ridley-Jopling e da OMS podem ser aproximados, reclassificando as formas TT e BT como paucibacilares (PB) e as formas BB, BL e LL como multibacilares (MB) (WHO, 1988; ALTER *et al.*, 2008).

Uma ferramenta sugerida para auxiliar na classificação dos pacientes é o ML Flow, ou teste de fluxo lateral, um teste sorológico rápido para identificação de um anticorpo IgM específico para o *M. leprae* (anti-PGL-1). Trata-se de um teste simples e de fácil realização, feito a partir de uma gota de sangue ou de soro, que apresenta uma boa concordância com outros exames sorológicos (SILVA *et al.*, 2008) e com a baciloscopia (BARRETO *et al.*, 2008; GROSSI *et al.*, 2008; LYON *et al.* 2008; BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2009; CONTIN *et al.*, 2011). No entanto, esse teste ainda não está disponível para utilização em larga escala pelos serviços de saúde.

O grau de incapacidade física é determinado a partir da avaliação neurológica dos olhos, mãos e pés, por serem estas as áreas com maior frequência de lesão, de diagnóstico simples e com maiores repercussões nas atividades cotidianas do indivíduo. O resultado final é expresso em valores que variam de 0 a 2. Para o grau

0 estão classificados os doentes sem qualquer tipo de incapacidade funcional devido à hanseníase; grau 1, aqueles que apresentam perda de sensibilidade protetora e o grau 2 os que, além da perda de sensibilidade, apresentam complicações tais como: úlceras tróficas, garras, reabsorções ósseas em mãos e/ou pés ou, ainda, lesões oculares diversas (BRASIL, 2002).

3.1.4 Episódios reacionais

Durante o curso da hanseníase, o paciente pode apresentar as chamadas reações hansênicas ou episódios reacionais, que são processos inflamatórios agudos, localizados ou sistêmicos, resultantes de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o agente infectante. Eles podem ocorrer antes, durante ou mesmo após o tratamento com sucesso da doença (MORAES *et al.*, 1999; MORAES *et al.*, 2000; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008).

As duas principais reações são a do tipo 1 e tipo 2 que, juntas, atingem de 30 a 50% de todos os pacientes de hanseníase (KUMAR; DOGRA; KAUR, 2004; SCOLLARD *et al.*, 2006; WALKER; LOCKWOOD, 2006; WALKER; LOCKWOOD, 2008). Geralmente elas ocorrem separadamente, mas podem, eventualmente, atingir o mesmo indivíduo, em momentos diferentes (MORAES *et al.*, 2001; MENDONÇA *et al.*, 2008).

A reação tipo 1 – ou Reação Reversa (RR) – apresenta geralmente um quadro de endurecimento e eritema das lesões já existentes, muitas vezes com edema acral proeminente, podendo levar a ulcerações, além de neurite progressiva, causando neuropatia sensorial e motora. Ela acomete principalmente pacientes paucibacilares e estaria associada a um aumento abrupto da resposta imunológica mediada por células. (SAMPAIO; SARNO, 1998; SAMPAIO *et al.*, 2002; KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008). A RR geralmente se desenvolve gradualmente e pode durar várias semanas (SCOLLARD *et al.*, 2006).

A reação tipo 2 – ou Eritema Nodoso Hansênico (ENH) – ocorre geralmente em pacientes multibacilares e apresenta-se como uma reação inflamatória sistêmica. Durante sua ocorrência, podem surgir nódulos eritematosos na face, extremidades ou tronco, não necessariamente em locais onde já havia lesões. Os pacientes podem desenvolver ainda febre, mal estar, mialgia e algum grau de neurite com neuropatia sensorial e motora. O ENH apresenta um quadro imunopatológico mais

complexo e estaria associado à deposição de imunocomplexos nos tecidos (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; KAHAWITA; LOCKWOOD, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2008). Em seu curso natural, o ENH geralmente dura de uma a duas semanas, mas vários pacientes apresentam múltiplos episódios de reincidência durante vários meses (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Embora os fatores predisponentes e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desencadeamento dos episódios reacionais ainda não estejam claramente definidos, sabe-se que eles são os principais responsáveis pelos danos neurais causados pela hanseníase. Estes, por sua vez, representam a principal causa de morbidade e resultam no potencial incapacitante da doença.

3.1.5 Tratamento

O tratamento da hanseníase padronizado pela OMS é feito através da poliquimioterapia (PQT). O esquema para os pacientes paucibacilares (PQT/PB) é constituído por seis doses mensais de rifampicina e doses diárias autoadministradas de dapsona, com duração que pode variar de 6 a 9 meses. Já o esquema multibacilar (PQT/MB) consiste em 12 doses mensais de rifampicina e doses diárias autoadministradas de dapsona e clofazimina, com duração mínima de 12 e máxima de 18 meses. Após a conclusão do tratamento preconizado, o paciente é considerado curado (BRASIL, 2002).

Por ainda não serem completamente entendidos, o manejo dos episódios reacionais ainda representa um grande desafio para os serviços de saúde, ainda mais pelo fato de que podem ocorrer mesmo após o término do esquema terapêutico. Os corticosteroides são o primeiro tratamento indicado para as reações tipo 1, sendo frequentemente necessário o uso de altas doses, por períodos prolongados. Já para as reações tipo 2, o tratamento de escolha é a talidomida (WALKER; LOCKWOOD, 2006; WALKER; WATERS; LOCKWOOD, 2007). A clofazimina e a pentoxifilina também vêm sendo utilizadas como auxiliares no controle do ENH (SAMPAIO *et al.*, 1998), embora sejam menos efetivas que a talidomida. (SCOLLARD *et al.*, 2006; SALES *et al.*, 2007; KAHAWITA; WALKER; LOCKWOOD, 2008).

3.1.6 Situação epidemiológica

Desde a implantação da PQT, na década de 80, mais de 15 milhões de casos de hanseníase foram diagnosticados e tratados em todo mundo, resultando em uma grande redução da prevalência global da doença. Este resultado se deve, em grande parte, ao aumento da cobertura dos serviços de saúde e à disponibilização gratuita do tratamento em todos os países endêmicos, medidas que fazem parte da estratégia da OMS para a eliminação hanseníase enquanto um problema de saúde pública (WHO, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2011; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Acreditava-se que, a partir de certo limiar de prevalência, o potencial de transmissão da hanseníase passaria a ser muito limitado e que, abaixo desse limiar, a doença desapareceria gradativamente (MARTELLI *et al.*, 2002). No entanto, a redução da prevalência não foi acompanhada pela diminuição na detecção de novos casos, evidenciando que a cadeia de transmissão da doença não está sendo interrompida, conforme esperado (ARAÚJO, 2005).

Em 2011, foram registrados 219.075 novos casos de hanseníase no mundo, resultando em um coeficiente de detecção de 4,06 casos/100.000 habitantes. Deste total, 83% estavam concentrados em apenas 3 países – Índia, Brasil e Indonésia. O Brasil se destaca neste cenário, tendo sido responsável por 33.955 registros. Isto representa o segundo maior número absoluto e 16% do total de casos registrados no mundo – ficando atrás apenas da Índia. No final daquele ano, havia 29.690 pacientes em registro ativo no país (WHO, 2012a).

Um estudo realizado pelo grupo do Programa Nacional de Controle da Hanseníase alocou e analisou espacialmente todos os casos de hanseníase registrados no Brasil entre 2005 e 2007, buscando delimitar áreas de maior concentração da doença e com características semelhantes em relação ao risco de adoecer, chamadas de *clusters* ou conglomerados. Os resultados apontaram a existência de 25 *clusters*, todos estatisticamente significativos. Outro estudo semelhante analisou os casos notificados de 2007 a 2009 e confirmou a existência daqueles *clusters* e demonstrou o aparecimento de um novo grande conglomerado de casos que inclui a região metropolitana de Fortaleza e parte do oeste do Estado do Rio Grande do Norte (BRASIL, 2010; BRASIL, 2011).

Os 10 maiores *clusters* eram compostos por 1.173 municípios e respondiam por 53,5% dos casos novos detectados no período, contendo apenas 17,5% da

população do país (BRASIL, 2008). A FIG. 2 mostra as áreas identificadas em cada estudo.

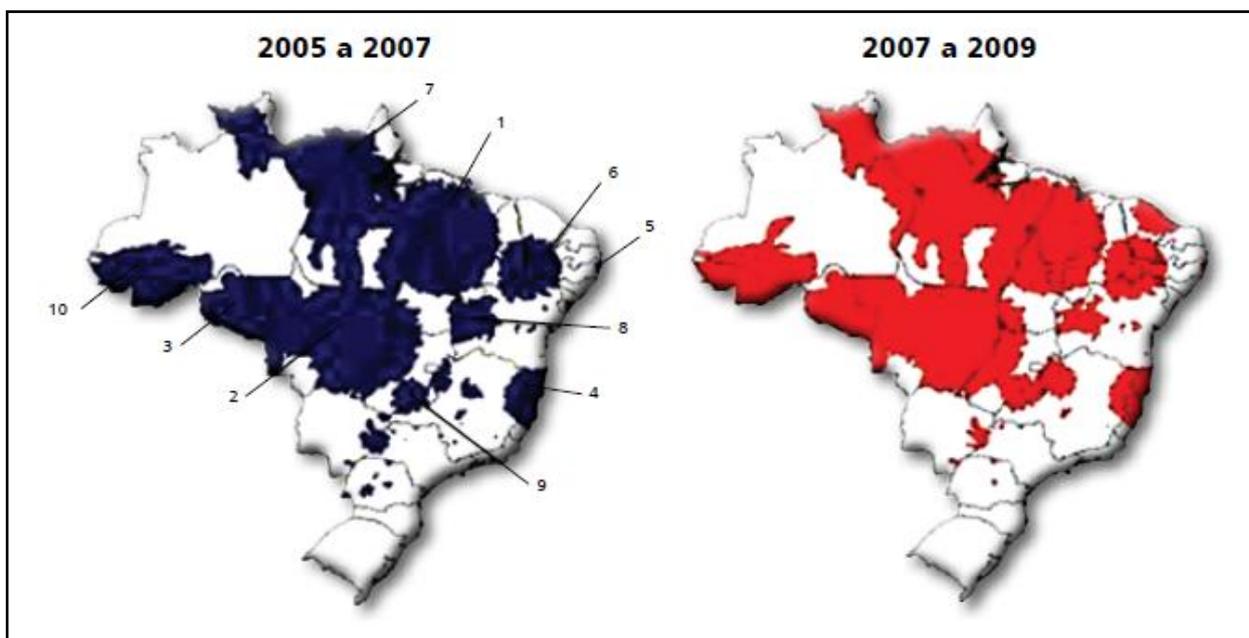


FIGURA 2 – Mapas do Brasil com a comparação dos *clusters* de alto risco de hanseníase – 2005 – 2007 e 2007 – 2009.

Os *clusters* definem áreas onde se concentram a maioria dos casos e que apresentam o maior risco de adoecer. Sua identificação foi orientada pelos dados das notificações registradas no SINAN. Para isso, levou-se em conta o coeficiente médio de detecção de casos novos para os períodos estudados. Os casos foram alocados nas coordenadas geográficas das sedes dos respectivos municípios e, para determinação dos *clusters*, foi utilizado método conhecido como estatística espacial de varredura. Os números representam os 10 *clusters* mais importantes, em ordem decrescente.

Fonte: BRASIL, 2010, p.25.

Os *clusters* de números 4 e 9 englobam 73 e 12 municípios do Estado de Minas Gerais, respectivamente. Entre os municípios mineiros que pertencem ao *cluster* 4, estão os 16 que compõem a microrregião de Almenara.

Estudo anterior ao do PNCH, utilizando metodologia semelhante, já havia mostrado que esta microrregião apresentava coeficientes de prevalência e detecção que permitiam classificá-la como uma área hiperendêmica. Destacavam-se os municípios de Almenara e Santa Maria do Salto que apresentaram os maiores coeficientes de detecção durante o período analisado. Este estudo ainda identificou a existência de um *cluster* no interior da microrregião com detecção média de novos casos acima do esperado (AMARAL; LANA, 2008). Esta estratégia permite o planejamento e a implementação de medidas que possam melhorar as ações de

vigilância em hanseníase, visando o diagnóstico e tratamento precoce dos doentes, vigilância de contatos, entre outras ações que têm como objetivo o controle da doença.

Em Minas Gerais, a Coordenadoria Estadual de Dermatologia Sanitária elegeu municípios prioritários para o controle da hanseníase, com base nos seguintes critérios: ter diagnosticado 10 ou mais casos novos de hanseníase no último ano de avaliação; possuir taxa de detecção maior ou igual a 20 casos/100.000 habitantes; ter diagnosticado dois ou mais casos novos em menores de 15 anos e ter população superior ou igual a 5.000 habitantes. Entre os 39 municípios escolhidos, estão Almenara e Santa Maria do Salto (MINAS GERAIS, 2010). Em 2011, os municípios da microrregião de Almenara notificaram 72 casos.

3.2 Aspectos imunológicos da infecção pelo *Mycobacterium leprae*

Esquemáticamente, a resposta imunológica pode ser dividida em inata e adaptativa. A primeira tem a característica de ser inespecífica, sendo considerada a primeira linha de interação entre o organismo e os antígenos de qualquer natureza. Já a segunda tem ação altamente específica contra cada patógeno, além de possuir o efeito de “memória”, permitindo responder de forma mais vigorosa a repetidas exposições ao mesmo micro-organismo.

O largo espectro de manifestações clínicas e histopatológicas da hanseníase é um reflexo da reação imunológica do hospedeiro frente à infecção pelo *M. leprae* e o desfecho da infecção está diretamente relacionado à capacidade do organismo de montar uma resposta imune eficaz contra o bacilo (FOSS, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008).

Para fins didáticos, as características de cada uma são discutidas separadamente a seguir, embora, na prática, constituam um sistema integrado.

3.2.1 Resposta imune inata

Uma vez em contato com o organismo, padrões moleculares do antígeno são reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. Entre as moléculas do bacilo envolvidas neste processo estão a lipoarabinomanana (LAM) e o glicolípido

fenólico-1 (PGL-1), este último um componente da parede celular encontrado apenas no *M. leprae*.

O reconhecimento dessas moléculas é feito por uma classe especializada de células, denominadas células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *antigen presenter cells*), responsáveis pela captação e processamento do parasita. As principais representantes das APC são as Células Dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*), devido à sua eficiência e por serem as únicas capazes de ativar linfócitos T *naive*, essenciais para a indução de uma resposta imune celular (JANEWAY JR.; MEDZHITOV, 2002; MIRA *et al.*, 2004). Além delas, destacam-se também as células de Langerhans (que são um subtipo de DC presente na pele e mucosas), os linfócitos B e os macrófagos. Estes últimos ainda servem como habitat celular para o *M. leprae* e como células efetoras na destruição do bacilo (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

As APC possuem receptores chamados de PRR (do inglês *pattern recognition receptors*), que reconhecem padrões moleculares que são compartilhados por grupos de patógenos (PAMP, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Eles podem ser expressos na superfície celular, em diferentes compartimentos intracelulares ou secretados na corrente sanguínea ou nos tecidos. Exemplos de PRR são os receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) e do tipo NOD (NLR, do inglês *NOD-like receptors*). Há ainda receptores envolvidos na adesão e entrada do *M. leprae* nas células de Schwann e nos macrófagos, como o receptor de manose C tipo 1 (MRC1, do inglês *mannose receptor C type 1*) e receptores do complemento (SCOLLARD *et al.*, 2006; RADA; ARANZAZU; CONVIT, 2009; MODLIN, 2010; SCHENK *et al.*, 2012).

Após digerir as proteínas do antígeno, as APC expõem os fragmentos (peptídeos) em suas membranas celulares, associadas a moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) de classes I e II, apresentando-as aos linfócitos T. Além disso, elas também secretam citocinas e quimiocinas, entre elas o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor alpha*), o interferon-gamma (IFN- γ), as interleucinas (IL) IL-1 e IL-6, que atuarão sobre os linfócitos T e IL-12 que estimula diretamente as células NK (do inglês *natural killer*), influenciando na determinação do perfil da resposta imune adquirida (FOSS, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; SCOLLARD *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2008; MODLIN, 2010).

O TNF- α e o IFN- γ também ativam os macrófagos que, após fagocitarem o patógeno, utilizam diferentes mecanismos microbicidas visando destruí-lo, como a produção de óxido nítrico (NO), de radicais superóxido e a indução dependente de vitamina D de peptídeos antimicrobianos, incluindo a catelicidina e β -defensinas (LIU *et al.*, 2006; LEANDRO *et al.*, 2009; RADA; ARANZAZU; CONVIT, 2009).

Uma resposta imune inata efetiva, combinada à baixa virulência do *M. leprae*, é associada às baixas taxas de desenvolvimento da doença. Por outro lado, o sucesso da infecção e a sobrevivência do bacilo dependem de sua capacidade de escapar das estratégias de defesa montadas pelo hospedeiro.

A habilidade do *M. leprae* de sobreviver no interior dos macrófagos na presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio está associada à existência de sistemas (pseudoenzimáticos) com ação óxido-redox eficiente capazes de realizarem a limpeza e desintoxicação desses radicais ativos (ASCENZI *et al.*, 2006; ASCENZI; MILANI; VISCA, 2006; ASCENZI *et al.*, 2008; ASCENZI; VISCA, 2008). Além disso, certos glicolipídios micobacterianos, como a LAM e o PGL-I, teriam a capacidade de suprimir a resposta imune, inibindo a produção de citocinas como o IFN- γ , impedindo a ativação e maturação das DC e atrapalhando sua interação com os linfócitos T (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MURRAY *et al.*, 2007). Por fim, uma vez fagocitado, o *M. leprae* induziria a formação e a distribuição intracelular de gotículas lipídicas (CRUZ *et al.*, 2008; MATTOS *et al.*, 2010; MATTOS *et al.*, 2011). Estas gotículas seriam compostas por ácidos graxos e fosfolipídios oxidados, originados tanto do próprio bacilo quanto do hospedeiro. A presença desses corpos lipídicos junto aos vacúolos infectados dá a essas células um aspecto espumoso – sendo conhecidas como células de Virchow ou células espumosas (do inglês *foamy cells*) – e diminui sua capacidade de resposta antimicrobiana, principalmente aquela mediada pelos TLR (CRUZ *et al.*, 2008; ROBINSON *et al.*, 2008; MONTOYA *et al.*, 2009).

3.2.1.1 Toll-like receptors

Os TLR representam um grupo de receptores transmembrana encontrados desde a *Drosophila* até nos mamíferos. Eles são componentes críticos do sistema imunológico inato e reconhecem uma vasta gama de moléculas pertencentes a patógenos. Nos seres humanos, o grupo desses receptores é composto por 10

Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase

subtipos de proteínas que apresentam especificidade para componentes de vírus, bactérias e fungos e atuam iniciando vias de sinalização que levam à ativação da resposta imune inata, produção de citocinas e formação da resposta imune adaptativa. Alguns deles estão presentes na membrana plasmática e são responsáveis pelo reconhecimento de LPS (TLR4), lipopeptídeos (TLR1/2 e 2/6) e flagelina (TLR5). Outros ficam localizados no ambiente intracelular e identificam ácidos nucleicos no compartimento endossomal (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) (LEANDRO *et al.*, 2009; HAWN *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2010). Os TLR 1, 2 e 6 formam um subgrupo relacionado filogeneticamente, sendo que a grande similaridade entre o primeiro e o último sugere que eles tenham surgido de um evento de duplicação gênica recente (BEUTLER; REHLI, 2002; ROACH *et al.* 2005). TLR2 requer um co-receptor representado por TLR1 ou TLR6, o que confere uma especificidade de ligação e habilita a sinalização celular (OZINSKY *et al.*, 2000).

O heterodímero TLR1/2 detecta lipoproteínas e atua na ativação celular para destruir o *M. leprae*, requerendo um grupo triacil para sua atividade. Diversos componentes da parede celular micobacteriana, como a lipomanana, LAM, phosphatidylinositol dimannoside e a lipoproteína 19k-Da atuam como agonistas para esse par de receptores (JOHNSON *et al.*, 2007). No caso da hanseníase, demonstrou-se que TLR1 e TLR2 foram mais expressos em amostras de lesões provenientes de pacientes TT quando comparadas a lesões de VV, indicando que a ativação dos TLR no sítio da doença contribui para conter a infecção (KRUTZIK *et al.*, 2003). O mecanismo de atuação por meio do qual esses receptores restringem a internalização e crescimento do patógeno ainda não está completamente definido, mas sabe-se que sua ativação leva à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-12, que induzem uma resposta imune adaptativa Th1. Além disso, ela também leva à expansão de DC e à diferenciação de macrófagos. A expressão de TLR1 em monócitos e DC é aumentada por citocinas ligadas à resposta Th1, como o IFN- γ e o fator estimulador de colônia granulócito-macróforo (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), respectivamente, enquanto IL-4 – uma citocina do tipo 2 – diminui a expressão de TLR2 (MODLIN, 2010).

3.2.1.2 Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2

O receptor NOD2 (do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) faz parte da família dos receptores do tipo NOD e atua no ambiente intracelular detectando patógenos presentes no citosol. No caso da hanseníase, ele reconhece parte de um peptidoglicano presente na parede celular micobacteriana – o MDP (do inglês *muramyl dipeptide*) – e leva à indução, por meio da molécula adaptadora RIP2, do fator nuclear-kappa B (NF-κB) e de fatores antimicrobianos, atuando também em sinergia com os TLR para induzir um perfil inflamatório da imunidade adaptativa (HAWN *et al.*, 2007; BERRINGTON *et al.*, 2010; MODLIN, 2010; SUN *et al.*, 2011; SCHENK *et al.*, 2012). A ativação de monócitos via NOD2 pelo MDP induz sua diferenciação em DC por meio de um mecanismo dependente de IL-32. Essas células são mais eficientes em apresentar antígenos ao MHC que aquelas derivadas de GM-CSF. A expressão de NOD2 e IL-32 no sítio da doença é maior em pacientes com formas mais limitadas da doença quando comparados àqueles com formas mais progressivas (SCHENK *et al.*, 2012).

3.2.1.3 Leucotrieno A₄ Hidrolase

A Leucotrieno A₄ Hidrolase (LTA4H) é uma enzima que converte o leucotrieno A₄ (LTA₄) em leucotrieno B₄ (LTB₄), um potente quimioatrativo leucocitário e eicosanóide pró-inflamatório (MISCH *et al.*, 2010). Análises funcionais sugeriram que a atividade reduzida da LTA4H conferia hipersuscetibilidade a micobactérias em larvas de peixes-zebra. Esta hipersuscetibilidade estaria ligada ao excesso de produção de lipoxinas anti-inflamatórias que limitariam a produção de TNF, permitindo a proliferação bacilar (TOBIN *et al.*, 2010).

3.2.2 Resposta imune adaptativa

Classicamente, a resposta imune adaptativa tem sido dividida em celular – ou do tipo 1 – e humoral – ou do tipo 2. Este modelo já havia sido descrito anteriormente para outras doenças infecciosas, como a leishmaniose, sendo demonstrado pela primeira vez para a hanseníase no início da década de 90 (YAMAMURA *et al.*, 1991; MODLIN, 1994).

Os linfócitos da linhagem T CD4⁺, também chamados de T auxiliares (Th, do inglês *T helper*), exercem um papel fundamental na resistência ao *M. leprae*. As células Th1 e Th2 são as principais subpopulações funcionais dessa linhagem e atuam secretando citocinas que irão regular o tipo de resposta imune adaptativa a ser desenvolvida. A resposta Th1 caracteriza-se pela produção de citocinas como IL-2, IFN- γ e linfotóxina-alfa (LT- α), levando à ativação de macrófagos, da fagocitose e dos mecanismos citotóxicos, aumentando a imunidade mediada por células. Ao contrário, na resposta Th2 há a produção de IL-4, IL-5 e IL-10, citocinas que estimulam a produção de anticorpos pelos linfócitos B, aumentando a resposta humoral e diminuindo a resposta celular (YAMAMURA *et al.*, 1991; MODLIN, 1994; FOSS, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008; RADA; ARANZAZU; CONVIT, 2009).

A resposta Th1 é mais eficiente na eliminação de patógenos intracelulares, como é o caso das micobactérias. A exacerbação da imunidade celular e a produção de citocinas pró-inflamatórias presentes nesse tipo de resposta levam à formação do granuloma e impedem a proliferação do bacilo. Dessa forma, ela está mais associada às infecções paucibacilares, conforme observado nas formas TT e BT. Por outro lado, sua ação citotóxica pode levar a uma intensificação das lesões cutâneas e neurais, tornando-se lesiva ao organismo e podendo gerar graves sequelas.

Já a resposta Th2 estimula os linfócitos do tipo B a produzirem anticorpos e inibem a ativação dos macrófagos. No entanto, sabe-se que, apesar da produção em grande quantidade de anticorpos específicos contra o *M. leprae*, ela é ineficaz para a eliminação dos bacilos, resultando em infecção progressiva. Por essa razão, esse tipo de resposta está mais associado às formas clínicas multibacilares, sendo observado principalmente em pacientes com as formas BL e LL (FOSS, 1997; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; SCOLLARD *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2008).

Durante anos, prevaleceu o paradigma Th1-Th2, no qual acreditava-se que o predomínio de um dos tipos de resposta imunológica anulava o outro. No entanto, novas descobertas mostraram que uma grande proporção dos pacientes de hanseníase podem produzir citocinas comuns a ambos os perfis, tais como IFN- γ , IL-12 e IL-4, evidenciando que esse modelo dicotômico não respondia plenamente às questões relacionadas à imunologia da doença (SCOLLARD *et al.*, 2006).

Atualmente, novos subgrupos de células T auxiliares já foram descritos. Entre eles, destacam-se as células T reguladoras (T_{reg}) (SHEVACH, 2002). Elas se caracterizam por expressarem a molécula IL-2Ra (CD25) e o fator de transcrição FoxP3 – sendo também designadas como $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ - e representam de 5 a 10% de todas as células T $CD4^+$ circulantes no sangue periférico (ATTIA *et al.*, 2010; MASSONE *et al.*, 2010). O mecanismo de ação das células T_{reg} ainda não está claramente definido, mas evidências indicam que elas atuariam suprimindo as respostas Th1 e Th2, por meio da secreção de citocinas, entre elas o fator de crescimento e transformação beta ($TGF-\beta$, do inglês *transforming growth factor-beta*). Por um lado, esta ação favoreceria a proliferação e disseminação do *M. leprae* observada no polo LL, mas, por outro, reduziria os danos tissulares provocados pela resposta imune, principalmente durante os episódios reacionais (ATTIA *et al.*, 2010; MASSONE *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2011; PALERMO *et al.*, 2012). Alguns autores chegaram a designar a ação das células T_{reg} como Th3, visando diferenciá-la das outras duas, embora ressaltem que essa designação não é a mais adequada, pois elas não fariam jus ao adjetivo de “auxiliares” uma vez que atuariam inibindo a resposta imune (KUMAR *et al.*, 2011).

Outro subgrupo já descrito de células T $CD4^+$ é o Th17, que são células produtoras de IL-17. Estudo recente demonstrou que elas estão envolvidas na imunopatogênese dos episódios reacionais de ENH, exercendo um papel análogo às células Th1 e sendo potencialmente sobre-reguladas pela talidomida (MARTINIUK *et al.*, 2012). No entanto, seu papel na infecção pelo *M. leprae* ainda não está bem definido.

Desta forma, conclui-se que a resposta imunológica do organismo diante da invasão pelo *M. leprae* constitui um processo complexo, cujo resultado está relacionado a diversos fatores, entre eles a interação entre citocinas, receptores e as células do sistema imune no sítio de infecção pelo bacilo. Por sua vez, a disponibilidade, a quantidade e o *timing* na produção dessas citocinas e receptores estaria ligada às características genéticas do indivíduo, definindo a resistência ou a suscetibilidade ao parasita.

3.2.2.1 Interferon-gama

O IFN- γ é uma citocina secretada principalmente por células dendríticas, macrófagos, células NK e por células T CD4⁺ e T CD8⁺ e é considerado um modulador chave da resposta imune inata e adaptativa. Ele estimula a ação microbicida dos macrófagos baseada na produção de NO e outras espécies reativas. Além disso, ele sobrerregula a expressão de subunidades sinalizadoras do receptor de IL-12 nas células T – permitindo que elas respondam a esta citocina – e inibe a produção de IL-4 e IL-10, induzindo uma resposta imune adaptativa do tipo Th1 *in vivo* (LIBRATY *et al.*, 1997; SCHRODER *et al.*, 2004). Esta, por sua vez, resulta na formação do granuloma e/ou na destruição do *M. leprae*. Dessa forma, esse eixo de ativação IFN- γ /IL-12 exerce um papel fundamental na resposta imunológica contra patógenos intracelulares, como no caso da hanseníase (SCHRODER *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2010; MISCH *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011).

3.2.2.2 Interleucina 10

A Interleucina 10 (IL-10) é uma citocina secretada principalmente por células da linhagem monócito/macrófago e células T dos subtipos Tr1, T_{reg} e Th17. Ela possui múltiplos efeitos imunorregulatórios e atua inibindo a secreção de citocinas do tipo Th1 e moléculas co-estimulatórias dos macrófagos – como IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ – e a apresentação de antígenos, suprimindo a resposta imune mediada por células, o que contribui para a persistência *M. leprae* (PEREIRA, *et al.*, 2008; MISCH, *et al.*, 2010; FÉLIX *et al.*, 2012). Ela também está envolvida na expansão de células T produtoras de IL-4 (AGGARWAL *et al.*, 2011).

Em humanos, elevados níveis de RNA mensageiro (mRNA) de IL-10 e outras citocinas do tipo Th2 como IL-4 e IL-5 são observados em lesões das formas multibacilares da hanseníase, em contraste com aquelas das formas paucibacilares, nas quais predominam citocinas do tipo Th1 como IFN- γ e IL-2. Uma baixa razão TNF/IL-10 também tem sido correlacionada à progressão da hanseníase (MISCH *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011).

3.3 Estudos de associação genética

A participação de fatores genéticos contribuindo para a infecção e diferentes manifestações clínicas (fenótipos) da hanseníase é hoje uma ideia largamente aceita, graças, em parte, à aplicação de modernas e poderosas ferramentas de análise genética disponíveis atualmente.

Os estudos de associação de um gene à suscetibilidade/resistência à doença geralmente baseiam-se na comparação das frequências alélicas de um marcador genético entre indivíduos afetados e não afetados. Esse marcador será considerado associado ao fenótipo estudado quando houver uma diferença significativa nas frequências observadas entre esses dois grupos (PREVEDELLO; MIRA, 2007).

Entre os diversos tipos de marcadores genéticos existentes no genoma humano, estão os polimorfismos do tipo microssatélite (STR, do inglês *short tandem repeat* e VNTR, do inglês *variable number of tandem repeats*) e os polimorfismos de base única (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*). Estes últimos são, em sua grande maioria, mutações pontuais bialélicas, o que torna a genotipagem mais fácil e menos dispendiosa, razão pela qual eles têm sido mais utilizados em estudos genéticos (PACHECO; MORAES, 2009). Os SNP apresentam frequência superior a 1% na população e podem estar presentes tanto em regiões intragênicas não codificantes como em regiões codificantes ou intergênicas. Sua presença pode resultar na alteração da afinidade de ligação entre regiões promotoras e fatores de transcrição, modificar sítios de *splicing* ou provocar a troca de um aminoácido, levando a variações na estrutura e/ou função de uma proteína (MORAES *et al.*, 2006). A combinação de dois ou mais polimorfismos é chamada de haplótipo e também pode ser utilizado como marcador genético. Há algumas vantagens no uso de haplótipos ao invés de SNP, uma vez que os primeiros contêm mais informações.

A seleção de genes candidatos geralmente se baseia em três critérios: possível papel crítico na patogênese da doença (candidatos funcionais); sua localização em região genômica previamente envolvida no controle da doença (candidatos posicionais) ou a combinação dos dois anteriores (candidatos funcionais e posicionais) (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Devido à importância da resposta imune na hanseníase, os genes candidatos mais comuns são aqueles que transcrevem para a síntese de citocinas e outras moléculas importantes na cadeia imunológica (MORAES *et al.*, 2006).

As investigações genéticas para mapeamento de *loci* associados com doenças podem ser feitas por meio de estudos de ligação ou de associação. O primeiro tipo de estudo permite o rastreamento de regiões cromossômicas ligadas à doença de forma que um “*zoom*” molecular é feito para o mapeamento dos marcadores genéticos. Já os estudos de associação são baseados em medidas de frequências de alelos em populações ou em famílias. Os estudos populacionais podem ser do tipo caso-controle ou coorte e se baseiam nas comparações entre as frequências dos alelos nos grupos de indivíduos doentes e não doentes. Já os estudos familiares se baseiam no perfil de transmissão de alelos de pais para filhos (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Com a finalização do Projeto Genoma Humano, em 2003, e do Projeto HapMap Internacional, em 2005, os pesquisadores passaram a contar com novas ferramentas para tentar identificar a influência genética sobre as doenças. Uma nova abordagem que tem sido cada vez mais utilizada nos últimos anos são os estudos de associação do genoma em larga escala (GWAS, do inglês *genome-wide association study*).

Um GWAS pode ser considerado um estudo do tipo caso-controle no qual são examinadas amostras completas do genoma de um grande número de pessoas visando identificar variações comuns aos indivíduos. Geralmente essas variações consistem em SNP e nos haplótipos formados por eles, cujas frequências são comparadas entre um grupo de portadores da doença e outro composto por indivíduos saudáveis. Por utilizar novas tecnologias de genotipagem de alto rendimento, bem como poderosas ferramentas de análise estatística, esse tipo de estudo permite analisar centenas de milhares de SNP ao mesmo tempo, indicando quais destes apresentam associações significativas com a característica estudada. Por essa razão, os GWAS estão revolucionando as pesquisas sobre a influência de variações genéticas nas doenças complexas (WANG *et al.*, 2005; PEARSON; MANOLIO, 2008; ELBERS, *et al.*, 2009; VISSCHER *et al.*, 2012).

No entanto, apesar de sua grande capacidade de apontar genes e regiões genômicas candidatos a exercerem um papel no desenvolvimento de diferentes patologias, os GWAS também possuem limitações importantes. Eles não são capazes de captar variações raras e têm pouca capacidade para captar variações estruturais. Ainda apresentam um considerável potencial para resultados falsos positivos e para vieses relacionados à seleção dos participantes do estudo e erros

de genotipagem (PEARSON; MANOLIO, 2008; ELBERS, *et al.*, 2009; SPENCER *et al.*, 2009; CANTOR; LANGE; SINSHEIMER, 2010; MANOLIO, 2010; VISSCHER *et al.*, 2012). Além disso, poucos SNP identificados por este método têm implicações funcionais claras que sejam relevantes para o mecanismo das doenças, sendo necessários estudos mais aprofundados nestes casos.

Os estudos do tipo caso-controle são largamente aplicados em pesquisas genéticas sobre a hanseníase. Esta popularidade se deve à sua facilidade no recrutamento de casos (indivíduos doentes) e controles (indivíduos sadios). Entretanto, essa aparente simplicidade pode levar a um equívoco na seleção da amostra para o estudo, gerando um viés que, mais tarde, pode resultar em uma associação espúria. Por um lado, a seleção dos casos, embora pareça simples, deveria ser feita com base em um método diagnóstico que apresentasse alta sensibilidade e especificidade, para garantir seu *status* de “afetado”. A escolha dos controles se mostra ainda mais complicada, uma vez estes devem ser escolhidos a partir da população fonte de onde vieram os casos. Além disso, eles teriam que ter sofrido a exposição ao agente infeccioso pelo menos uma vez, por tempo suficiente, para que se pudesse assumir sua resistência à infecção. Embora seja impossível assegurar a ocorrência dessa exposição, há formas de aumentar sua probabilidade como, no caso específico da hanseníase, através da escolha de contatos intradomiciliares saudáveis. Outro fator que poderia gerar erros nesse tipo de estudo é a existência de algum tipo de estratificação étnica da população, devido a uma miscigenação desigual, migração ou outro efeito genético, visto que casos e controles poderiam ser retirados de subpopulações diferentemente estruturadas (PACHECO; MORAES, 2009).

Outro tipo de estudo muito utilizado são aqueles baseados em famílias. Nestes, uma ferramenta de análise que vem ganhando cada vez mais popularidade na área de epidemiologia genética é conhecido como Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT). Este método utiliza trios formados pelo indivíduo afetado e seus genitores. No entanto, é necessário que pelo menos um destes últimos seja heterozigoto para o *locus* de interesse para que o teste seja informativo. Ele avalia se a frequência de transmissão de alelos desses genitores para seus filhos afetados se desvia da frequência mendeliana esperada – que é de 50%. Uma das principais vantagens deste teste está no fato de ele não estar sujeito a efeitos de estratificação populacional, evitando a ocorrência de vieses, principalmente no que diz respeito à

seleção da amostra. Por outro lado, podem requerer uma amostragem maior que em outros tipos de estudo, uma vez que apenas os trios em que pelo menos um dos progenitores seja heterozigoto para o gene em estudo podem ser aproveitados na análise. No seu formato original, o TDT também requer genotipagens parentais, que não são facilmente acessíveis nas doenças de início tardio, em que os pais podem não estar mais presentes, como é o caso da hanseníase. Nesses casos, algumas reformulações/adaptações do TDT permitem que sejam incluídas famílias em que apenas um dos pais foi genotipado ou que seja utilizada apenas a genotipagem de pares de irmãos discordantes ou de toda a irmandade, na ausência de informações parentais (EWENS; SPIELMAN, 1995; SCHAID, 1998; CLAYTON; JONES, 1999; SUN *et al.*, 1999; FEITOSA; KRIEGER, 2002; SANTOS *et al.*, 2002a). A baixa frequência de um alelo na população estudada é outro fator que pode dificultar a realização deste estudo, visto que ela conseqüentemente implicaria numa proporção menor de heterozigotos, reduzindo o número de trios informativos.

Em ambos os tipos de estudo, alguns aspectos devem ser cuidadosamente observados. Um deles se refere ao cálculo do tamanho da amostra, que deve ser grande o bastante para permitir a realização de testes estatísticos com poder suficiente para detectar uma diferença significativa entre os grupos e diminuir a ocorrência de erros aleatórios. Outro ponto a ser observado, ainda na fase de desenho do estudo, é o controle de possíveis variáveis de confundimento (PACHECO; MORAES, 2009). Erros na classificação do fenótipo – como erros no diagnóstico – podem reduzir o poder para detectar associação entre a doença e o *locus* do marcador (EDWARDS *et al.*, 2005; BUYSKE *et al.*, 2008).

Na fase de análise dos dados, um conceito importante a ser avaliado é o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Ele prevê que, em uma população numerosa e que atenda às condições de equilíbrio (ausência de seleção, mutação, migração, entre outras), as frequências alélicas e genotípicas permanecerão inalteradas ao longo de pelo menos uma geração de acasalamento aleatório. Segundo este modelo, se p é a frequência do alelo “A” e q a do alelo “a” de um dado *locus* bialélico, a frequência esperada no equilíbrio para os genótipos AA, Aa e aa será p^2 , $2pq$ e q^2 , respectivamente, sendo $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ e $p + q = 1$ (BEIGUELMAN, 1994). Desvios do EHW podem indicar problemas técnicos na genotipagem e é recomendado que os marcadores nessa condição sejam excluídos das análises (PACHECO; MORAES, 2009).

Outro aspecto fundamental refere-se ao desequilíbrio de ligação, que diz respeito à associação não aleatória de alelos em dois ou mais *loci*, não necessariamente no mesmo cromossomo. A medida de desequilíbrio de ligação pode ser dada em valores de r^2 . Quanto mais esses valores se aproximam de 1,0, mais forte é a ligação entre os marcadores. Já valores baixos indicam recombinação entre eles.

Por fim, o conceito de estratificação populacional implica na existência de grupos geneticamente diferentes dentro da população em estudo, como, por exemplo, no caso de subdivisões étnicas.

3.4 Influência da composição genética do indivíduo na suscetibilidade à hanseníase

Diversas evidências clínicas e epidemiológicas sugerem que a suscetibilidade ou resistência à hanseníase é influenciada por fatores genéticos do hospedeiro. Entre elas pode-se citar a ocorrência de agrupamentos de casos em conglomerados; taxas de prevalência diferentes associadas a grupos étnicos distintos em uma área endêmica com exposição semelhante ao agente infeccioso; altas taxas de concordância em estudos com gêmeos monozigóticos, superiores àquelas encontradas entre gêmeos dizigóticos; maior risco de desenvolver a doença entre contatos domiciliares consanguíneos em relação àqueles sem relações de consanguinidade, como cônjuges; o fato de as formas clínicas da doença não serem intercambiáveis; as diferentes taxas de proteção conferidas pela vacina BCG entre diferentes populações, entre outras (ALCAÏS *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2006; ALTER *et al.*, 2008; PACHECO; MORAES, 2009; ALTER *et al.*, 2011).

Além disso, estudos filogeográficos mostraram que a variabilidade genética do *M. leprae* é muito pequena (MONOT *et al.*, 2005; MONOT *et al.*, 2009), o que não permitiria explicar o largo espectro de manifestações apresentado pela doença. Embora, recentemente, uma nova espécie de micobactéria, o *Mycobacterium lepromatosis* (HAN *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2009), tenha sido descrita como causadora de uma forma disseminada da hanseníase no Canadá (JESSAMINE *et al.*, 2012), no México (HAN *et al.*, 2012) e em Cingapura (HAN; SIZER; TAN, 2012), sua significância epidemiológica ainda não é claramente entendida (PINHEIRO *et al.*, 2009; LEVIS; ZHANG; MARTINIUK, 2012).

para controlar a infecção. TLR1/2 também aumenta a expressão de VDR, que se torna ativado por meio da ligação da vitamina D e age como um fator de transcrição, também induzindo (juntamente com o NF- κ B) a expressão de genes associados com a resposta imune inflamatória (*TNF*, *IL1*, *IL6*, *IL12* e *HLA*) e a atividade microbicida do macrófago. A ativação bem sucedida dessas vias leva à degradação do patógeno após a fusão do fagossomo com os lisossomos. No entanto, é provável que indivíduos suscetíveis não atuem de forma adequada as vias autofágicas ou de NF- κ B VDR, levando à persistência do bacilo em partículas intravesiculares. O metabolismo dos eicosanoides e a formação de gotículas lipídicas também irão interagir com a autofagia e regular esta via. Variações no gene *LTA4H* resultam em níveis mais altos do mediador anti-inflamatório lipoxina A_4 . Outros mediadores lipídicos como o ADRP, perilipina e PGE2 são sobrerregulados, o que é compatível com uma inibição da autofagia e inflamação e contribui para a persistência do *M. leprae*. Já foi demonstrado que a Parkina está envolvida em várias vias, incluindo a regulação da formação de gotículas lipídicas bem como autofagia e vias apoptóticas. É provável que indivíduos suscetíveis tenham deficiências sutis na atividade da Parkina, levando ao metabolismo celular sustentável. Após esses eventos da imunidade inata, vários mediadores induzidos irão ativar e diferenciar células T e regular a formação do granuloma. Além disso, uma submodulação de genes-chave nesse processo como *HLA*, *TNF*, *LTA*, *IFNG* e *IL10* pode evoluir para um estado não responsivo que leva à infecção pelo *M. leprae* e, posteriormente, progride para a doença. As setas pontilhadas em azul correspondem à ativação de vias enquanto setas contínuas identificam tanto interações entre proteínas ou translocações.

Fonte: Adaptado de Cardoso *et al.*, 2011, p. 536. (Os nomes presentes na figura foram traduzidos para o idioma português).

3.4.1 Genes candidatos

Os genes analisados neste estudo são descritos de forma mais detalhada a seguir.

3.4.1.1 *TLR1*

O *cluster* dos genes dos TLR está localizado no cromossomo 4 (4p14) e mudanças em sua estrutura, resultantes de polimorfismos, já foram associadas com a suscetibilidade a várias doenças infecciosas, inclusive a hanseníase e seus estados reacionais (KANG; LEE; CHAE, 2002; BOCHUD *et al.*, 2008; BOCHUD *et al.*, 2009; LEANDRO *et al.*, 2009). No caso desta última, resultados consistentes têm sido observados em dois SNP no gene *TLR1*: I602S (T1805G) e N248S (G743A).

Estudos sobre o marcador I602S encontraram que o alelo S estaria associado com a proteção contra a hanseníase *per se* em amostras populacionais da Turquia (JOHNSON *et al.*, 2007) e Índia (WONG *et al.*, 2010) e também contra os episódios reacionais de RR em pacientes do Nepal (MISCH *et al.*, 2008). No entanto, em uma pesquisa feita com uma amostra da população de Bangladesh, não foi encontrada

associação para esse SNP (SCHURING *et al.*, 2009). Este mesmo estudo analisou o marcador N248S e mostrou que o genótipo homocigoto SS estava associado com a suscetibilidade à hanseníase *per se*, enquanto o genótipo heterocigoto SN foi associado à proteção contra a doença. Já para o genótipo homocigoto NN não foi encontrada nenhuma associação. O alelo N também estava presente na grande maioria dos pacientes que apresentaram episódios de ENL.

3.4.1.2 NOD2

O gene *NOD2* localiza-se na região 16q12. Dois polimorfismos presentes em sua estrutura (rs9302752 e rs7194886) foram associados pela primeira vez com a suscetibilidade à hanseníase em um GWAS realizado com um grupo de chineses (ZHANG *et al.*, 2009). No entanto, um estudo realizado com amostras populacionais da Índia e de Mali falhou em replicar os resultados para os referidos SNP (WONG *et al.*, 2010). Outro trabalho, realizado com indivíduos de diferentes etnias no Nepal, encontrou associação entre SNP diferentes dos anteriores (rs12448797, rs2287195, rs8044354 e rs1477176) e a hanseníase (BERRINGTON *et al.*, 2010).

3.4.1.3 LTA4H

Em seres humanos, dois SNP no gene *LTA4H* (rs1978331 e rs2660898), que fica localizado em um íntron do cromossomo 12 (12q22), foram associados à proteção contra as formas multibacilares da hanseníase e a incidência e mortalidade provocada pela tuberculose (TOBIN *et al.*, 2010).

3.4.1.4 IFNG

O gene *IFNG* fica localizado no cromossomo 12 (12q14) e, apesar de ser altamente conservado, apresenta alguns polimorfismos em sua região intragênica. Estes têm sido objeto de vários estudos de associação com doenças infecciosas, principalmente aquelas causadas por patógenos intracelulares, dada importância do IFN- γ no desenvolvimento da resposta imune celular (MISCH *et al.*, 2010).

Um dos principais alvos desses estudos tem sido o SNP +874 T/A, que fica localizado no primeiro íntron do referido gene. Este polimorfismo já foi associado à

tuberculose (PACHECO; CARDOSO; MORAES, 2008) e à hanseníase (CARDOSO *et al.*, 2010), embora para esta os resultados ainda não estejam claros.

Pesquisa realizada com duas amostras da população brasileira (dos municípios de Bauru e Rio de Janeiro) mostrou que o alelo +874T estava associado com a resistência à hanseníase. Entretanto, outros estudos realizados com amostras populacionais do Malawi (FITNESS *et al.*, 2004), do Brasil (FRANCESCHI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2012) e da China (WANG *et al.*, 2012) não encontraram associação para esse SNP.

3.4.1.5 IL10

O gene *IL10* fica localizado na região 1q31-32, onde estão agrupados genes de outras importantes citocinas imunorregulatórias como *IL19*, *IL20* e *IL24* (PEREIRA *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que polimorfismos em sua região promotora têm efeito sobre os níveis de produção de IL-10, influenciando na suscetibilidade/predisposição a doenças infecciosas, bem como em seus diferentes desfechos clínicos (FÉLIX *et al.*, 2012).

Em relação à hanseníase, o SNP localizado na posição -819 (C>T) tem sido alvo de diversos estudos, em diferentes populações. Ele foi associado à doença em populações do Brasil (Estado do Rio de Janeiro) (SANTOS *et al.*, 2002b; MORAES *et al.*, 2004; PACHECO; CARDOSO; MORAES, 2008), da Índia (AGGARWAL *et al.*, 2004; MALHOTRA *et al.*, 2005; WONG, 2010) e da Colômbia (CARDONA-CASTRO *et al.*, 2012). Entretanto, nenhuma associação foi encontrada em pesquisas realizadas com populações do Malawi (FITNESS *et al.*, 2004), do Brasil (Estado do Paraná) (FRANCESCHI *et al.*, 2009) e do México (FÉLIX *et al.*, 2012).

*“Vai diminuindo a cidade
Vai aumentando a simpatia
Quanto menor a casinha
Mais sincero o bom dia”*

Trecho da música “Simplicidade”
Fernanda Takai

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Escolha dos polimorfismos a serem analisados

A escolha dos polimorfismos (SNP) que seriam analisados neste estudo foi feita objetivando replicar resultados encontrados em outros trabalhos da mesma natureza. No caso do gene *NOD2*, dada a importância desse receptor na resposta imune, optou-se por trabalhar com um SNP (rs2066843) ainda não analisado em relação à hanseníase, mas já associado com a Doença de Crohn (GLAS *et al.*, 2010) e com a colite ulcerativa (JUYAL *et al.*, 2011), além de outros dois já estudados, visando aumentar a cobertura do gene.

O QUADRO 1 traz a relação dos SNP analisados e dos estudos de associação genética já realizados com eles, disponíveis na base de dados MEDLINE até o mês de agosto de 2012.

Os genes e SNP selecionados foram os seguintes: *TLR1* (rs4833095 e rs5743618), *NOD2* (rs8057341, rs2066843 e rs751271), *LTA4H* (rs1978331 e rs17525495), *IFNG* (rs2430561) e *IL10* (rs1800871).

4.2 Tipo de estudo

Trata-se de estudo de associação baseado em famílias. A técnica de análise utilizada foi o Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT), que visa determinar o padrão de transmissão dos alelos de um determinado gene de interesse dos pais para os filhos afetados, sendo que pelo menos um dos primeiros deve ser heterozigoto para o *locus* em estudo. O TDT utiliza o teste de qui-quadrado (χ^2) para verificar a hipótese nula na qual os alelos seriam transmitidos pelos genitores heterozigotos na frequência mendeliana esperada (50%) (EWENS; SPIELMAN 1995; SCHAID, 1998; FEITOSA; SANTOS *et al.*, 2002a).

A escolha por esta técnica de análise foi feita visando controlar a estratificação da amostra populacional, especialmente em um país tão miscigenado como o Brasil.

QUADRO 1
Relação dos SNP analisados e dos estudos de associação genética publicados sobre eles até agosto de 2012

Gene (marcador)	Tipo de estudo	População	Fenótipo	Referência
<i>TLR1</i> (N248S) (rs4833095)	Caso-controle	Bangladesh	- Suscetibilidade para portadores do alelo G	- SCHURING <i>et al.</i> , 2009
<i>TLR1</i> (I602S) (rs5743618)	Caso-controle Caso-controle/TDT	Turquia Índia	- Proteção para portadores do alelo G - Proteção para portadores do alelo G	- JOHNSON <i>et al.</i> , 2007 - WONG <i>et al.</i> , 2010
<i>NOD2</i> (rs8057341)	GWAS	China	- Sem associação	- ZHANG <i>et al.</i> , 2009
<i>NOD2</i> (rs751271)	Caso-controle	Nepal	- Sem associação	- BERRINGTON <i>et al.</i> , 2010
<i>LTA4H</i> (rs1978331)	Caso-controle	Vietnã	- Proteção para heterozigotos	- TOBIN <i>et al.</i> , 2010
<i>IFNG</i> (+874 T/A) (rs2430561)	Caso-controle	Malauí Brasil Brasil Brasil China	- Sem associação - Sem associação - Proteção para portadores do alelo T - Sem associação - Sem associação	- FITNESS <i>et al.</i> , 2004 - FRANCESCHI <i>et al.</i> , 2009 - CARDOSO <i>et al.</i> , 2010 - SILVA <i>et al.</i> , 2012 - WANG <i>et al.</i> , 2012
<i>IL10</i> (-819 C/T) (rs1800871)	Caso-controle	Brasil Malauí Brasil Índia Brasil Brasil Índia Colômbia México	- Suscetibilidade para homozigotos TT - Sem associação - Sem associação - Suscetibilidade para portadores do alelo T - Suscetibilidade para portadores do alelo T - Sem associação - Suscetibilidade para portadores do alelo T - Proteção para homozigotos TT e CC - Sem associação	- SANTOS <i>et al.</i> , 2002b - FITNESS <i>et al.</i> , 2004 - MORAES <i>et al.</i> , 2004 - MALHOTRA <i>et al.</i> , 2005 - PERERA <i>et al.</i> , 2008 - FRANCESCHI <i>et al.</i> , 2009 - AGGARWAL <i>et al.</i> , 2011 - CARDONA-CASTRO <i>et al.</i> , 2012 - FÉLIX <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Dados da pesquisa

4.3 Cenário do estudo

O estudo foi realizado nos municípios de Almenara, Felisburgo, Jacinto, Jordânia, Palmópolis e Rubim. Eles fazem parte da microrregião de Almenara – localizada na região nordeste do Estado de Minas Gerais – e ficam situados a uma distância média de aproximadamente 750 km da capital Belo Horizonte. Juntos eles possuem uma população total de aproximadamente 85.000 habitantes e, como já dito anteriormente, todos estão inseridos na região identificada e definida pelo Ministério da Saúde como *Cluster* N.º 4.

Eles foram escolhidos entre os 16 municípios da microrregião por terem registrado o maior número de casos de hanseníase, no período de 2001 a 2010, segundo dados disponíveis no DATASUS.

O município de Santa Maria do Salto, que ocupava a segunda posição em relação ao número de casos notificados, estava originalmente incluído neste estudo, mas, devido a inconsistências observadas no diagnóstico e classificação dos pacientes, optou-se por excluí-lo da amostra.

4.4 População do estudo

A base amostral foi constituída por núcleos familiares de casos de hanseníase residentes nos municípios estudados, diagnosticados no período de janeiro de 1998 a fevereiro de 2011. Estes núcleos eram compostos, originalmente, por trios formados pelo caso índice e seus pais biológicos. Naqueles em que um destes não estava presente, incluiu-se também os irmãos, na tentativa de inferir o genótipo do genitor ausente.

Inicialmente, o levantamento dos casos foi feito através de consulta ao banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), disponibilizado pela Coordenadoria Estadual de Dermatologia Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais (SES/MG). Posteriormente, por meio de consultas aos arquivos dos serviços de saúde locais, foram identificados e adicionados à relação alguns casos registrados no período, mas que não constavam no SINAN.

Optou-se por trabalhar apenas com os indivíduos que residiam nas sedes dos municípios ou que as visitaram durante o período de coleta. Esta escolha deveu-se à

dificuldade de buscar os moradores da zona rural, dada a dispersão destes pelas extensas áreas geográficas dos municípios, as grandes distâncias em relação às sedes e a dificuldade de acesso representada principalmente pelas más condições das estradas rurais. Exceções foram feitas para os distritos de Pedra Grande, Avaí do Jacinto e Itapiru, pertencentes aos municípios de Almenara, Jacinto e Rubim, respectivamente. Eles respondiam por um número considerável de casos da doença, sendo que a maioria destes se encontrava concentrada em suas sedes. Desta forma buscou-se a otimização do processo e a economia de recursos.

4.5 Recrutamento dos sujeitos do estudo

4.5.1 Abordagem inicial dos pacientes

Esta etapa contou com o apoio e a participação dos gestores e profissionais de saúde dos municípios estudados, principalmente aqueles inseridos nos serviços voltados à Atenção Primária, com destaque para os Enfermeiros e Agentes Comunitários de Saúde (ACS). O início das atividades em cada um dos municípios era precedido por uma reunião com esses profissionais. No primeiro momento dessa reunião, eram abordados os aspectos clínicos relacionados à hanseníase, como principais sinais e sintomas, formas de transmissão, diagnóstico, tratamento, entre outros. Em um segundo momento, eram apresentados e discutidos os objetivos, a metodologia e os sujeitos-alvo da pesquisa. Também era explicada a forma como os indivíduos deveriam ser abordados, destacando principalmente o cuidado com o sigilo e a privacidade destes. Nessas reuniões, todos tinham a oportunidade de expor suas opiniões, sugestões e dúvidas, que iam sendo esclarecidas pelos pesquisadores a medida que surgiam. Em seguida, os pesquisadores se dividiam e se reuniam com os trabalhadores de cada Unidade Básica de Saúde (UBS), com o objetivo de atualizar a relação de casos residentes naquele município e identificar os responsáveis pelas áreas de abrangência de cada um deles.

Após a reunião, os profissionais de saúde – na grande maioria das vezes, os ACS – realizavam visitas aos domicílios pertencentes às microáreas sob sua responsabilidade. A abordagem inicial era sempre feita com o caso-índice. Nesta oportunidade, ele era informado sobre a realização do estudo e lhe era solicitada uma autorização verbal para receber a visita de um dos pesquisadores. Era

explicado que esta visita tinha o objetivo de dar maiores esclarecimentos sobre a pesquisa e que a autorização não implicava em consentimento prévio para sua participação. Os indivíduos que concordaram puderam optar por receberem os pesquisadores em seus domicílios ou comparecerem a um serviço de saúde previamente definido. Nesse momento eles também eram questionados se as pessoas que residiam com ele tinham conhecimento do diagnóstico.

4.5.2 Visitas domiciliares

Todas as visitas foram realizadas pela equipe de pesquisadores, composta por Enfermeiros treinados, que sempre se apresentavam uniformizados e com crachá que os identificavam.

Após a autorização prévia, os pesquisadores realizavam visitas aos casos-índices, oportunidade na qual explicavam em detalhes os objetivos e a metodologia da pesquisa e os convidavam, juntamente com as demais pessoas de seu núcleo domiciliar e familiar, a participar. A partir de informações fornecidas pelos indivíduos, definia-se a necessidade ou não da participação dos irmãos do caso-índice, situação que ocorria quando era possível encontrar apenas um dos genitores.

Na maioria das vezes, foi necessária a realização de mais de uma visita a mesma residência, em dias e/ou horários variados, objetivando captar todos os integrantes do núcleo familiar elegíveis para o estudo. Foi comum também a visita a outros endereços, quando esses não residiam no mesmo domicílio.

As informações do caso-índice relacionadas à sua identificação, aspectos clínicos e epidemiológicos foram registradas em um formulário individual (APÊNDICE A). Alguns campos desse formulário eram informados pelo próprio indivíduo, enquanto outros foram preenchidos após consulta às Fichas de Notificação e de Acompanhamento Individual dos Casos do SINAN, bem como aos seus prontuários médicos, quando disponíveis, conforme discriminado no QUADRO 2. Já as informações referentes aos contatos eram registradas em outro formulário comum a todos eles (APÊNDICE B). Esses formulários recebiam etiquetas com códigos alfanuméricos individuais referentes ao número do domicílio e do caso-índice. Os registros de cada contato também recebiam etiquetas com códigos alfanuméricos que os identificavam.

QUADRO 2

Relação dos dados coletados no formulário de caso-índice segundo a fonte

Informações fornecidas pelo paciente		
- Data da entrevista	- Município	- Unidade de saúde/PSF
- Nome completo	- Endereço atual	- CEP
- Fone	- Celular	- Idade
- Sexo	- Data de nascimento	- Estado civil
- Cor da pele	- Naturalidade	- Estado
- Tempo de residência	- Endereço anterior	- Tempo de residência
- Nome do pai	- Endereço do pai	- Nome da mãe
- Endereço da mãe	- Número de pessoas residentes no endereço	
- Número de cômodos	- Número de dormitórios	- Outras doenças
- Uso de medicamento	- Alergia	- Cicatriz vacinal de BCG
Informações consultadas no prontuário/Ficha do SINAN		
- Data do diagnóstico	- Presença, morfologia e quantidade de lesões	
- Forma clínica (Madri)	- Forma clínica (Ridley-Jopling)	
- Classificação operacional	- Grau de incapacidade física no diagnóstico	
- Grau de incapacidade física na alta		- Baciloscopia/IB
- Localização das incapacidades físicas		- Presença/Tipo de reação

Fonte: Dados da pesquisa

4.5.3 Coleta de sangue

Foram coletadas amostras de 04 mL (quatro mililitros) de sangue total de cada um dos indivíduos que concordaram em participar. Essas amostras foram identificadas através de etiquetas de identificação com os mesmos códigos alfanuméricos utilizados nos formulários de identificação descritos anteriormente.

O protocolo utilizado para a coleta de sangue está descrito no APÊNDICE C.

4.5.4 Exame dermatoneurológico dos contatos intradomiciliares

Foram realizados exames clínicos dermatoneurológicos nos familiares e demais componentes do núcleo domiciliar do caso-índice que concordaram em participar da pesquisa. Este exame visava à identificação de sinais e sintomas suspeitos de hanseníase. Aqueles que apresentaram características sugestivas da doença foram encaminhados a um serviço de saúde de referência no município para confirmação do diagnóstico.

Para se capacitarem à realização desses exames, os pesquisadores receberam treinamento prévio no Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais (CREDEN-PES), em Governador Valadares, sob orientação do médico diretor do referido centro.

4.5.5 Orientações sobre a hanseníase

Durante as visitas domiciliares, os pesquisadores aproveitaram para fornecer orientações sobre aspectos relacionados à hanseníase, como principais sinais e sintomas, forma de transmissão, tratamento entre outros, bem como esclarecer dúvidas relatadas pelos moradores. Também foram distribuídos materiais informativos sobre a doença.

4.6 Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de sangue total foi realizada através do método de “*salting*”, ou precipitação por sal, descrito no APÊNDICE D.

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou da FIOCRUZ (LICM/CPqRR/FIOCRUZ).

4.7 Genotipagem das amostras

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por meio da técnica de discriminação alélica baseada em fluorescência. Nesta técnica são utilizadas sondas fluorescentes específicas para cada alelo e a inferência dos genótipos é baseada na intensidade de fluorescência. As reações foram feitas utilizando o ensaio *TaqMan*®

(Applied Biosystems) – de acordo com instruções do fabricante – e as amplificações foram realizadas utilizando o aparelho StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). A separação dos grupos genotípicos foi feita através da discriminação alélica pelos diferentes fluoróforos (FIG. 4).

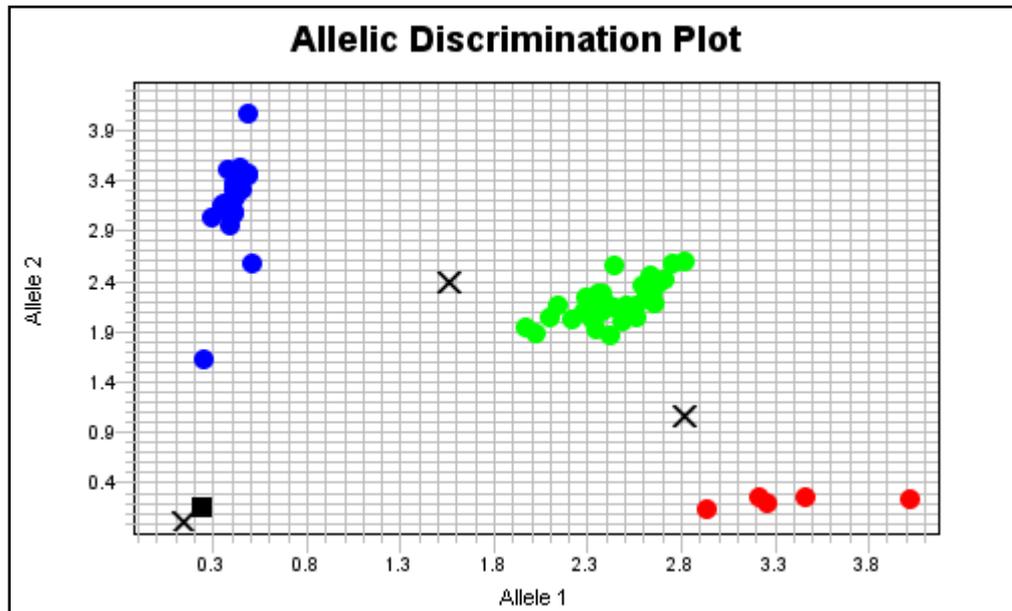


FIGURA 4 - Ilustração gráfica do resultado da genotipagem por PCR em tempo real

Exemplo da genotipagem do SNP rs2430561 do gene *IFNG*, mostrando os genótipos AA (azul), AT (verde), TT (vermelho), e as amostras indeterminadas ("X").

Fonte: Dados da pesquisa

Como forma de controlar a qualidade das genotipagens, algumas amostras – representando aproximadamente 5% do total – foram selecionadas aleatoriamente e submetidas a novas análises e os resultados destas foram comparados aos da primeira análise. Da mesma forma, nas situações em que foram constatados os chamados erros mendelianos (genótipos de pais e filhos incompatíveis com a paternidade inicialmente presumida), as amostras dos indivíduos envolvidos foram novamente analisadas, para descartar a possibilidade de erros nas genotipagens. Os resultados observados nas novas análises foram os mesmos encontrados inicialmente. Esta etapa também foi realizada no LICM/CPqRR/FIOCRUZ.

4.8 Tratamento e análise dos dados

Os dados coletados de casos-índices e contatos foram organizados, separadamente, em bancos de dados criados no *software* Epi Info, versão 2.0.3. Para evitar a ocorrência de inconsistências, foi realizada a entrada dupla de dados, com posterior conferência e correção dos erros de digitação.

A avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos marcadores foi realizada por meio de testes de χ^2 , a partir dos genótipos dos genitores não afetados.

A análise do desequilíbrio de ligação (LD, do inglês *Linkage Disequilibrium*) entre os marcadores dos genes *TLR1*, *NOD2* e *LTA4H* foi feita utilizando o parâmetro de r^2 , comparando os SNP dois a dois (CHAPMAN *et al.*, 2003; CARLSON *et al.*, 2004), por meio do *software* Haploview versão 4.1.

As análises referentes ao desequilíbrio de transmissão dos SNP e haplótipos foram realizadas utilizando-se o *software* FBAT versão 2.0.3. Este *software*, ao analisar famílias com múltiplos indivíduos afetados, automaticamente as decompõe em núcleos familiares individuais que, durante a análise, são tratados como independentes entre si. Para isso, parte-se do pressuposto de que não há ligação e nem associação entre os componentes dos referidos núcleos. No caso deste trabalho, embora o número de núcleos familiares com mais de um filho afetado seja pequeno, isso poderia afetar o resultado final da análise de transmissão. Para solucionar esse problema, o programa oferece uma função chamada “*empirical variance*”. Esta função considera a hipótese nula de que não há associação, mas há ligação e, a partir daí, os núcleos familiares pertencentes ao mesmo *pedigree* passam a não ser mais tratados como independentes. Ela utiliza um estimador empírico de variância que ajusta o resultado para a correlação entre genótipos de mais de um irmão afetado no mesmo núcleo familiar e para mais de um núcleo dentro do mesmo *pedigree*. Por esta razão, os testes para o desequilíbrio de transmissão foram realizados considerando as duas hipóteses.

As contagens da frequência e da transmissão de cada um dos alelos dos genes estudados e dos haplótipos de *TLR1*, *NOD2* e *LTA4H*, necessárias para a realização da meta-análise, foram feitas através do *software* R versão 2.10 com o uso do pacote “*tdthap*”.

4.8.1 Revisão sistemática e meta-análise

Foi realizada uma meta-análise agrupando os resultados de pesquisas envolvendo os polimorfismos dos genes *TLR1*, *IFNG* e *IL10* abordados neste trabalho e a suscetibilidade à hanseníase, visando definir uma estimativa geral do valor de associação para o *pool* de dados disponíveis para cada um deles. Para isso, utilizou-se a metodologia descrita inicialmente por PACHECO *et al.* (2008) e, posteriormente, adaptada por CARDOSO *et al.* (2011).

Primeiramente, foi realizada uma pesquisa na base dados MEDLINE, usando as citações do PUBMED, com o objetivo de identificar os estudos elegíveis para esta etapa. Buscou-se por artigos que analisaram a associação entre os referidos polimorfismos e a suscetibilidade à hanseníase *per se*, por meio de estudos de base populacional (caso-controle) ou familiar (TDT). Para a busca, foram utilizadas diferentes combinações dos termos “*Toll-like receptor*”, “*TLR1*”, “*Interferon-gamma*”, “*IFNG*”, “*Interleukin 10*”, “*IL10*”, “*polymorphism*”, “*SNP*” e “*leprosy*”. Não houve restrições em relação ao idioma de publicação e os critérios de inclusão dos artigos foram: ter sido publicado até outubro de 2012; não estar relacionado a publicações anteriores e fornecer dados suficientes para o cálculo da *odds-ratio* (OR) – a contagem de cada genótipo e da transmissão e não transmissão do alelo considerado de risco, para estudos do tipo caso-controle e TDT, respectivamente. Já os critérios de exclusão foram: conter dados sobrepostos e estar fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os artigos relacionados ou citados nas referências daqueles selecionados também foram avaliados com o objetivo de identificar bibliografia adicional, adotando-se os mesmos critérios de inclusão e exclusão já citados. No caso de estudos que combinavam mais de uma população, os dados de cada uma delas foram lançados separadamente, de forma independente.

Para o gene *TLR1* foram utilizados, além dos resultados de estudos já publicados, dados ainda não publicados de três amostras independentes com indivíduos dos municípios brasileiros de Bauru (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Rondonópolis (MT).

As meta-análises combinando dados dos dois tipos de estudo foram realizadas de acordo com o método proposto por KAZEEM e FARRALL (2005), no qual as OR dos estudos de base familiar (TDT) são estimadas utilizando a razão entre a transmissão e a não transmissão do alelo considerado de risco. Para avaliar

a existência de viés de publicação, foi utilizado o teste de Egger modificado. A heterogeneidade através dos estudos foi avaliada pela estatística Q de Cochran. Por fim, a estimativa de risco (OR) para o *pool* de dados foi obtida utilizando-se os métodos de Mantel-Haenszel, para o modelo de efeitos fixos e de DerSimonian e Laird para o modelo de efeitos randômicos.

Toda esta etapa foi realizada utilizando-se o *software* R versão 2.10.1 com o uso dos pacotes “*tdthap*”, “*catmap*” e “*meta*”.

4.9 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado atendendo às determinações da Resolução 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde, que estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Ele foi submetido à análise e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) através do parecer ETIC N.º 454/10 (ANEXO A).

Todos os sujeitos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e foram esclarecidos quanto aos seus objetivos e à garantia do anonimato. Aqueles que aceitaram assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE E).

4.10 Financiamento

Esta pesquisa foi financiada com recursos provenientes do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Edital MCT-CNPq / MS-SCTIE-DECIT – N.º 34/2008, Processo N.º 576215/2008-2, aplicado pelo Laboratório de Hanseníase da FIOCRUZ/RJ.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra estudada

No total, foram recrutados 482 indivíduos, distribuídos por 126 *pedigrees*, subdivididos em 137 núcleos familiares. No entanto, após a primeira análise de transmissão, foram identificados 13 erros mendelianos, que atingiram 7 *pedigrees* (12 núcleos familiares), que foram excluídos da análise. A amostra final foi composta por 125 núcleos familiares, inseridos em 119 *pedigrees*, totalizando 447 indivíduos. Estes incluíam 147 filhos afetados, 191 genitores e 109 irmãos não afetados. Os percentuais de recusas observados durante a etapa de recrutamento foram de apenas 2,71 e 2,96% para casos e contatos, respectivamente.

As características dos casos de hanseníase, representados pelos filhos afetados dos núcleos familiares, estão descritas na TAB. 1.

TABELA 1

Características dos casos de hanseníase participantes do estudo

(continua)

Variável	N	%
Sexo		
Masculino	81	55,1
Feminino	66	44,9
Idade^a		
Média (\pm DP)	29,6 (\pm 14,0)	Mediana = 28
Até de 20 anos	41	27,9
De 21 a 30 anos	34	23,1
De 31 a 40 anos	33	22,4
De 41 a 50 anos	17	11,6
Acima de 50 anos	11	7,5
Ignorado	11	7,5

Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase

(conclusão)		
Variável	N	%
Cor/raça^b		
Branca	24	16,3
Preta	15	10,2
Parda	107	72,8
Indígena	1	0,7
Cicatriz de BCG		
0	75	51,0
1	50	34,0
2	17	11,6
Ignorado	5	3,4
Classificação operacional		
Paucibacilar	67	45,6
Multibacilar	72	49,0
Ignorado	8	5,4
Forma clínica^c		
Indeterminada	40	27,2
Tuberculóide	24	16,3
Dimorfa	51	34,7
Virchowiana	19	12,9
Ignorado	13	8,8
Grau de incapacidade física^d		
Grau 0	81	55,1
Grau 1	48	32,7
Grau 2	6	4,1
Ignorado/Não avaliado	12	8,2

Nota: ^aIdade à época do diagnóstico.

^bCor/raça informada pelo paciente.

^cForma clínica segundo a classificação de Madri

^dGrau de incapacidade física avaliado no momento do diagnóstico

Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase

A amostra de casos recrutados para esta pesquisa apresentou uma predominância do sexo masculino (55,1%). A média de idade observada foi de 29,6 ($\pm 14,0$). A grande maioria dos entrevistados (72,8%) declarou-se de cor parda. Em relação à vacinação com BCG, apenas 45,6% dos indivíduos apresentavam pelo menos uma cicatriz. A distribuição dos casos segundo a classificação operacional encontrou valores próximos para paucibacilares e multibacilares – com leve predominância dos últimos – e a forma clínica mais frequente foi a dimorfa. Quanto à avaliação da incapacidade física, 36,8% já apresentavam algum tipo de comprometimento no momento do diagnóstico.

A TAB. 2 traz os detalhes da estrutura dos núcleos familiares utilizados na análise de transmissão.

TABELA 2

Caracterização dos núcleos familiares envolvidos no estudo – Microrregião de Almenara - 2011

Estrutura das famílias	Núcleos convencionais^a	Núcleos alternativos^b
Número de <i>pedigrees</i>		119
Número de núcleos familiares	73	52
Núcleos com 1 irmão afetado	66	41
Núcleos com 2 irmãos afetados	5	9
Núcleos com 3 irmãos afetados	2	2
N.º de genitores afetados		29
N.º de irmãos não afetados		109
N.º total de indivíduos		447

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: ^aNúcleos compostos pelo filho afetado e seus dois genitores

^bNúcleos compostos pelo filho afetado, um dos genitores e os irmãos

Observa-se que 85,6% (n = 107) dos núcleos familiares eram compostos por apenas 1 irmão afetado, 11,2% (n = 14) possuíam 2 irmãos afetados e apenas 3,2% (n = 4) apresentavam 3 irmãos afetados.

5.2 Análise da associação dos SNP com a hanseníase

O teste de χ^2 calculado para analisar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg – feito a partir dos genótipos dos genitores não afetados – mostrou que todos os marcadores analisados estavam em equilíbrio, conforme mostra a TAB. 3. Desta forma, todos foram incluídos nas análises subsequentes.

TABELA 3
Cálculo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

(continua)

Gene	SNP	Genótipo	N	FREQ OBS	FREQ ESP	χ^2	<i>p</i>
<i>TLR1</i>	rs4833095	GG	55	0,34	0,34	0,05	<i>p</i> > 0,05
		GA	80	0,49	0,49		
		AA	27	0,17	0,17		
	rs5743618	TT	76	0,47	0,49	0,96	<i>p</i> > 0,05
		TG	73	0,45	0,42		
		GG	12	0,08	0,09		
<i>NOD2</i>	rs8057341	GG	73	0,45	0,44	0,34	<i>p</i> > 0,05
		GA	69	0,43	0,45		
		AA	20	0,12	0,11		
<i>LTA4H</i>	rs2066843	CC	109	0,67	0,67	0,01	<i>p</i> > 0,05
		CT	48	0,30	0,30		
		TT	05	0,03	0,03		
	rs751271	GG	55	0,34	0,32	1,54	<i>p</i> > 0,05
		GT	72	0,44	0,49		
		TT	35	0,22	0,19		
rs17525495	GG	140	0,86	0,87	0,86	<i>p</i> > 0,05	
	GA	22	0,14	0,13			
	AA	00	0,00	0,00			
rs1978331	AA	41	0,25	0,27	0,41	<i>p</i> > 0,05	
	AG	85	0,53	0,50			
	GG	36	0,22	0,23			

(conclusão)

Gene	SNP	Genótipo	N	FREQ OBS	FREQ ESP	χ^2	p
IFNG	rs2430561	AA	49	0,30	0,34	3,20	$p > 0,05$
		AT	90	0,56	0,49		
		TT	23	0,14	0,18		
IL10	rs1800871	CC	60	0,37	0,37	0,06	$p > 0,05$
		CT	76	0,47	0,47		
		TT	26	0,16	0,16		

A análise do desequilíbrio de ligação entre os marcadores dos genes *TLR1*, *NOD2* e *LTA4H* está ilustrada na FIG. 5 e detalhada na TAB. 4.

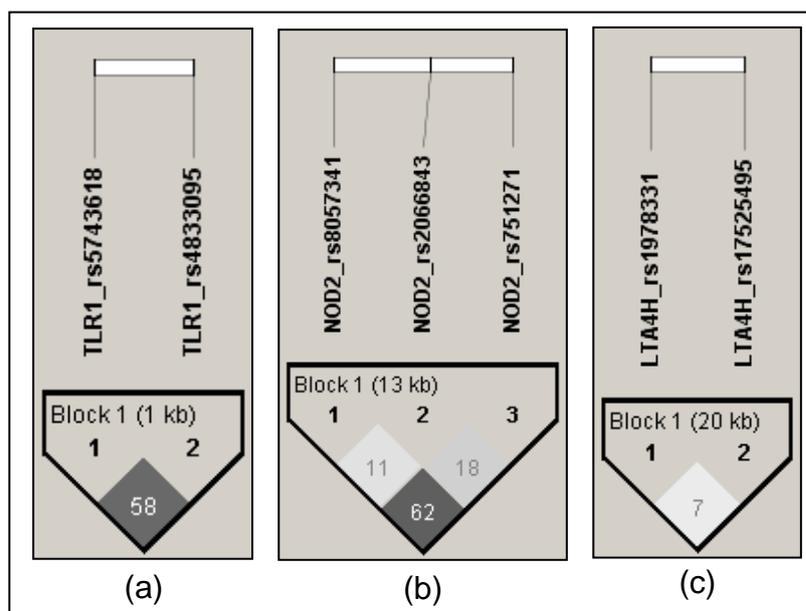


FIGURA 5 – Diagrama ilustrativo da análise do desequilíbrio de ligação entre os marcadores dos genes *TLR1* (a), *NOD2* (b) e *LTA4H* (c)

Os diferentes tons de cinza estão relacionados ao valor de r^2 (quanto mais escuro, maior). O número no interior dos blocos indica o valor de r^2 entre os respectivos marcadores.

TABELA 4
Análise do desequilíbrio de ligação entre os SNP de *TLR1*, *NOD2* e *LTA4H*

Gene	SNP1	SNP2	D'	IC	r ²	LOD	Distância
<i>TLR1</i>	rs5743618	rs4833095	0,985	0,92 – 1,00	0,599	48,88	1062
	rs8057341	rs2066843	1,000	0,84 – 1,00	0,117	10,34	7219
<i>NOD2</i>	rs8057341	rs751271	0,971	0,91 – 1,00	0,620	52,10	13195
	rs2066843	rs751271	1,000	0,88 – 1,00	0,177	15,82	5976
<i>LTA4H</i>	rs1978331	rs17525495	1,000	0,73 – 1,00	0,069	6,14	20176

Fonte: Dados da pesquisa

O valor de r² observado para os SNP de *TLR1* mostram que eles estão em desequilíbrio de ligação moderado. O mesmo acontece com os marcadores rs8057341 e rs751271 de *NOD2*. Já para *LTA4H*, o valor encontrado para r² foi baixo, indicando que eles estão mais sujeitos à recombinação. No final, todos ficaram abaixo do ponto de corte estabelecido pelo projeto HapMap para se definir blocos de marcadores (r² = 0,8) (CHAPMAN *et al.*, 2003; CARLSON *et al.*, 2004), razão pela qual cada SNP foi analisado separadamente. Também foram realizadas análises haplotípicas utilizando arranjos combinatórios dos SNP estudados.

Os resultados das análises de transmissão de cada um dos alelos estudados, realizadas com e sem o uso da correção pela variância empírica estão na TAB. 5.

TABELA 5
Teste de desequilíbrio de transmissão dos alelos

(continua)

Gene	SNP	Alelo	Freq	Núcleos ^a	Trans ^b	Z	p ^c	p ^d
<i>TLR1</i>	rs4833095	G	0,551	82	53	2,156	0,0311	0,0474
		A	0,449		34	-2,156		
	rs5743618	T	0,676	74	52	2,159	0,0309	0,0560
		G	0,324		30	-2,159		

Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase

(conclusão)

Gene	SNP	Alelo	Freq	Núcleos ^a	Trans ^b	Z	p ^c	p ^d
NOD2	rs8057341	G	0,678	71	31	-1,177	0,2392	0,1961
		A	0,322		40	1,177		
	rs2066843	C	0,815	66	42	0,669	0,5036	0,5281
		T	0,185		29	-0,669		
	rs751271	G	0,581	76	39	-0,972	0,3311	0,3097
		T	0,419		47	0,972		
LTA4H	rs17525495	G	0,934	29	16	-0,202	0,8403	0,8430
		A	0,066		17	0,202		
	rs1978331	A	0,514	84	51	-0,852	0,3941	0,4228
		G	0,486		62	0,852		
IFNG	rs2430561	A	0,589	84	50	0,029	0,9770	0,9778
		T	0,411		48	-0,029		
IL10	rs1800871	C	0,609	80	47	-0,114	0,9096	0,9108
		T	0,391		48	0,114		

Nota: ^aNúmero de núcleos familiares informativos
^bNúmero de transmissões do alelo
^cAnálise sem a correção da variância empírica
^dAnálise com a correção da variância empírica

O teste de desequilíbrio de transmissão mostrou que os valores observados para a transmissão dos alelos foram diferentes dos esperados apenas para os SNP do gene *TLR1*. No caso do rs8057341, o alelo G foi mais transmitido dos genitores para os filhos afetados ($p = 0,0311$), indicando que ele estaria associado à suscetibilidade à hanseníase. Na análise considerando o ajuste de variância empírica o valor de p sofreu um pequeno aumento ($p = 0,047$), mas manteve-se significativo. Ainda no gene *TLR1*, o marcador rs5743618 também foi associado à hanseníase ($p = 0,0309$), sendo que o alelo G apresentou um menor número de transmissões aos filhos afetados, o que sugere associação à resistência. Nesse caso, o ajuste para variância empírica tornou a associação estatística *borderline* ($p = 0,056$). Para os demais marcadores, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores observados e esperados em nenhuma das duas análises. Não foi realizada a correção do valor de p para múltiplas comparações devido ao fato de tratar-se de um estudo de replicação de marcadores que já haviam

sido associados à hanseníase em pelo menos um estudo anterior (ALTER *et al.*, 2010).

TABELA 6

Teste de desequilíbrio de transmissão dos haplótipos formados pelos polimorfismos rs4833095 e rs5743618 do gene *TLR1*, respectivamente

Haplótipos ^a	Freq	Nº núcleos	Trans ^b	Não Trans ^c	Z	p ^d	p ^e
G/T	0,534	76	49	32	2,353	0,0186	0,0310
A/T	0,136	44	18	16	-0,255	0,7987	0,7898
A/G	0,324	71	27	45	-2,240	0,0251	0,0488

Nota: ^aNão foram apresentados os haplótipos com frequência inferior a 1%

^bNúmero de transmissões do haplótipo

^cNúmero de não transmissões do haplótipo

^dAnálise sem a correção da variância empírica

^eAnálise com a correção da variância empírica

TABELA 7

Teste de desequilíbrio de transmissão dos haplótipos formados pelos polimorfismos rs805734, rs2066843 e rs751271 do gene *NOD2*, respectivamente

Haplótipos ^a	Freq	Nº núcleos	Trans ^b	Não Trans ^c	Z	p ^d	p ^e
G/C/G	0,394	77	44	38	-0,338	0,7350	0,7535
G/C/T	0,103	30	8	14	-0,298	0,7657	0,7689
G/T/G	0,193	65	20	31	-0,578	0,5632	0,5755
A/C/T	0,304	63	39	25	1,398	0,1620	0,1652

Nota: ^aNão foram apresentados os haplótipos com frequência inferior a 1%

^bNúmero de transmissões do haplótipo

^cNúmero de não transmissões do haplótipo

^dAnálise sem a correção da variância empírica

^eAnálise com a correção da variância empírica

TABELA 8

Teste de desequilíbrio de transmissão dos haplótipos formados pelos polimorfismos rs17525495 e rs1978331 do gene *LTA4H*, respectivamente

Haplótipos ^a	Freq	Nº núcleos	Trans ^b	Não Trans ^c	Z	p ^d	p ^e
G/A	0,517	82	45	54	-0,710	0,4780	0,4878
G/G	0,416	80	49	39	0,759	0,4478	0,4746
A/G	0,067	28	14	15	0,028	0,9774	0,9771

Nota: ^aNão foram apresentados os haplótipos com frequência inferior a 1%

^bNúmero de transmissões do haplótipo

^cNúmero de não transmissões do haplótipo

^dAnálise sem a correção da variância empírica

^eAnálise com a correção da variância empírica

Os testes de desequilíbrio da transmissão dos haplótipos formados pelos marcadores dos genes *TLR1*, *NOD2* e *LTA4H* também foram realizados com e sem a correção da variância empírica. As análises indicaram a associação dos haplótipos de *TLR1* G/T e A/G, formados pelos polimorfismos rs4833095 e rs5743618, nesta ordem, com a suscetibilidade e a resistência à hanseníase, respectivamente. Mesmo após a correção, os valores de *p* permaneceram significativos (TAB. 6). Não houve associação para os haplótipos dos demais genes, conforme mostrado nas TAB. 7 e 8.

5.3 Meta-análise

Na revisão sistemática foram identificados 15 artigos que analisaram a associação dos SNP abordados neste estudo com a hanseníase *per se*, sendo três sobre o gene *TLR1* (um para rs4833095 e dois para rs5743618), quatro sobre o gene *IFNG*, sete sobre o gene *IL10*, além de um que abordava conjuntamente os genes *IFNG* e *IL10*.

A partir dos dados fornecidos pelos estudos, foi avaliado se eles atendiam aos critérios para serem incluídos na meta-análise. Os resultados dessa avaliação são exibidos no QUADRO 3 e cada gene é discutido separadamente, a seguir.

QUADRO 3

Relação dos artigos identificados na revisão sistemática e avaliação dos critérios para inclusão na meta-análise

Autores	Tipo de estudo	População	Caso	Controle	EHW	Genótipos separados
TLR1 rs4833095 SCHURING <i>et al.</i> , 2009	Caso-controle	Bangladesh	842	543	Sim	Sim
TLR1 rs5743618 JOHNSON <i>et al.</i> , 2007	Caso-controle	Turquia	90	57	Sim	Sim
WONG <i>et al.</i> , 2010	Caso-controle TDT	Índia ^a	258	300	Sim	Sim
			852		Sim	
IFNG FITNESS <i>et al.</i> , 2004	Caso-controle	Malauí	236	402	Não	Sim
FRANCESCHI <i>et al.</i> , 2009	Caso-controle	Brasil (PR)	164	240	Não	Sim
CARDOSO <i>et al.</i> , 2010	Caso-controle	Brasil (RJ e SP) ^a	774	978	Sim	Sim
SILVA <i>et al.</i> , 2012	Caso-controle	Brasil (AM)	108	113	Sim	Sim
WANG <i>et al.</i> , 2012	Caso-controle	China	527	583	Sim	Sim
IL10 SANTOS <i>et al.</i> , 2002b ^b	Caso-controle	Brasil (RJ)	202	62	Sim	Sim
FITNESS <i>et al.</i> , 2004	Caso-controle	Malauí	215	353	Sim	Sim
MORAES <i>et al.</i> , 2004 ^b	Caso-controle	Brasil (RJ)	293	293	Sim	Sim
MALHOTRA <i>et al.</i> , 2005	Caso-controle	Índia	282	266	Sim	Sim
FRANCESCHI <i>et al.</i> , 2009	Caso-controle	Brasil (PR)	165	240	-	Não
AGGARWAL <i>et al.</i> , 2011	Caso-controle	Índia ^a	807	1640	Sim	Sim
CARDONA-CASTRO <i>et al.</i> , 2012	Caso-controle	Colômbia	100	100	-	Não
FÉLIX <i>et al.</i> , 2012 ^c	Caso-controle	México	64	138	Sim	Sim

Nota: EHW = Equilíbrio de Hardy-Weinberg (a população estudada estava em equilíbrio?);

PR = Paraná; RJ = Rio de Janeiro; SP = São Paulo; AM = Amazonas

^aEsses estudos foram realizados com mais de uma amostra populacional, por isso cada uma delas foi incluída separadamente na meta-análise.

^bEmbora os artigos não trouxessem todas as informações necessárias para a avaliação, os dados faltantes foram fornecidos pelos autores.

^cEsse estudo trabalhou apenas com pacientes da forma clínica LL.

Observa-se, analisando os trabalhos identificados, que apenas um deles traz dados de um estudo de base familiar (TDT), sendo todos os demais de base populacional (caso-controle). Desta forma, torna-se interessante a tentativa de replicação dos resultados utilizando um estudo baseado em famílias.

5.3.1 *TLR1* (rs4833095 e rs5743618)

Foi identificado apenas um trabalho publicado sobre o marcador rs4833095 do gene *TLR1*, que envolveu uma amostra populacional de Bangladesh, composta por 842 casos e 543 controles (SCHURING *et al.*, 2009). Para possibilitar a realização da meta-análise, foram incluídos, além deste resultado e daqueles encontrados na microrregião de Almenara, dados ainda não publicados de um estudo do tipo caso-controle com três amostras populacionais independentes dos municípios de Bauru (SP) (375 casos e 380 controles), Rio de Janeiro (RJ) (778 casos e 661 controles) e Rondonópolis (MT) (411 casos e 425 controles). Considerando todos os dados envolvidos nessa meta-análise, alcança-se um total de 4297 indivíduos, sendo 2558 casos.

Nenhuma heterogeneidade foi observada entre os estudos ($\chi^2 = 2,77$; $p = 0,43$) e o teste de Egger não identificou nenhuma evidência estatística de viés de publicação ($p = 0,1251$). Dessa forma, utilizou-se o modelo de efeitos fixos para se estimar o valor da OR combinada para todos os estudos. Esta foi de 1,22 ($p < 0,001$), com o alelo 743G (248S) sendo associado à suscetibilidade à hanseníase, conforme representado na FIG. 6. A TAB. 9 traz o detalhamento dos dados para cada estudo.

Para o polimorfismo rs5743618 foram encontrados dois trabalhos publicados. Um deles, um estudo do tipo caso-controle, foi realizado com uma amostra de 147 indivíduos (90 casos e 57 controles) da Turquia (JONHSON *et al.*, 2007). O outro combinou dados provenientes de três populações independentes da Índia, utilizando dois tipos de estudos. O primeiro, do tipo caso-controle, utilizou indivíduos de Nova Deli e Kolkata e o outro, do tipo TDT, analisou 246 famílias provenientes de Kumbakonam, totalizando, juntos, 1410 indivíduos (WONG *et al.*, 2010).

Na meta-análise do SNP rs5743618, os dados desses dois estudos foram combinados aos resultados obtidos na microrregião de Almenara e a dados ainda não publicados da população de Bauru. Durante as análises, foi apontada uma heterogeneidade entre os estudos ($\chi^2 = 25,77$; $p < 0,001$) e o teste de Egger identificou evidência estatística de viés de publicação ($p = 0,004$). Desta forma, optou-se por utilizar o modelo de DerSimonian e Laird para efeitos randômicos. O valor estimado para a OR combinada foi 0,530 (IC95% = 0,347 – 0,808; $p < 0,001$), com o alelo 1805G (602S) sendo associado à resistência à doença, conforme representado na FIG. 7. O *software* não forneceu os dados detalhados de cada

estudo para o modelo de efeitos randômicos, por isso a TAB. 10 apresenta os dados apenas do modelo de efeitos fixos.

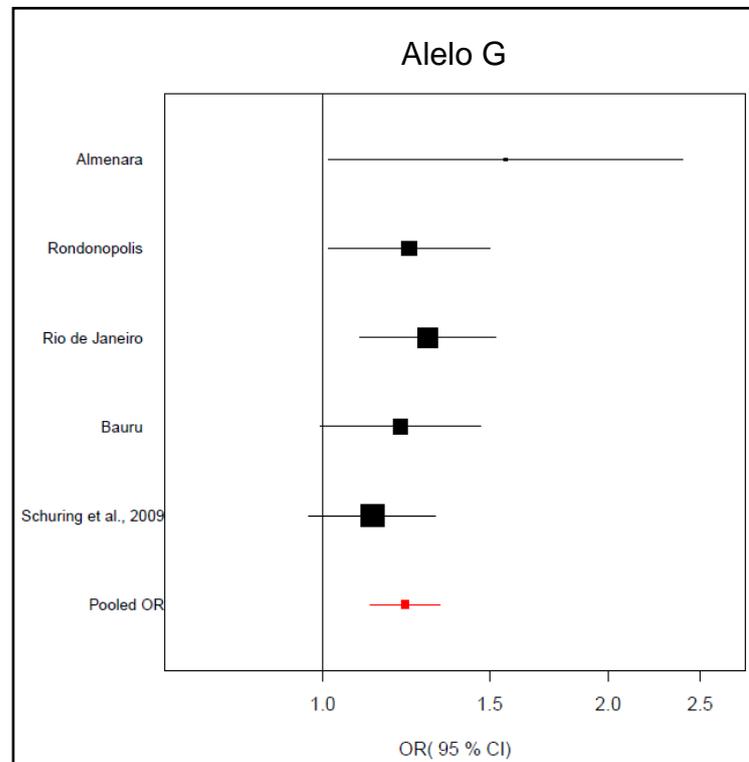


FIGURA 6 – Diagrama representativo da meta-análise dos estudos que analisaram o marcador rs4833095 do gene *TLR1*.

As caixas representam o valor da OR e o seu tamanho indicam o peso do estudo no resultado final. As barras representam os intervalos de confiança de 95%.

TABELA 9

Resultado da meta-análise dos dados dos estudos sobre o SNP *TLR1* rs4833095

Estudo	OR Efeito-fixado	IC 95%	Peso
Schuring <i>et al.</i> , 2009	1,128	0,968 - 1,314	164,623
Almenara	1,559	1,013 - 2,398	20,713
Bauru	1,209	0,996 - 1,467	102,145
Rio de Janeiro	1,291	1,095 - 1,521	142,536
Rondonópolis	1,234	1,015 - 1,499	101,233
Agrupado	1,221	1,121 - 1,330	-

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: IC = Intervalo de Confiança

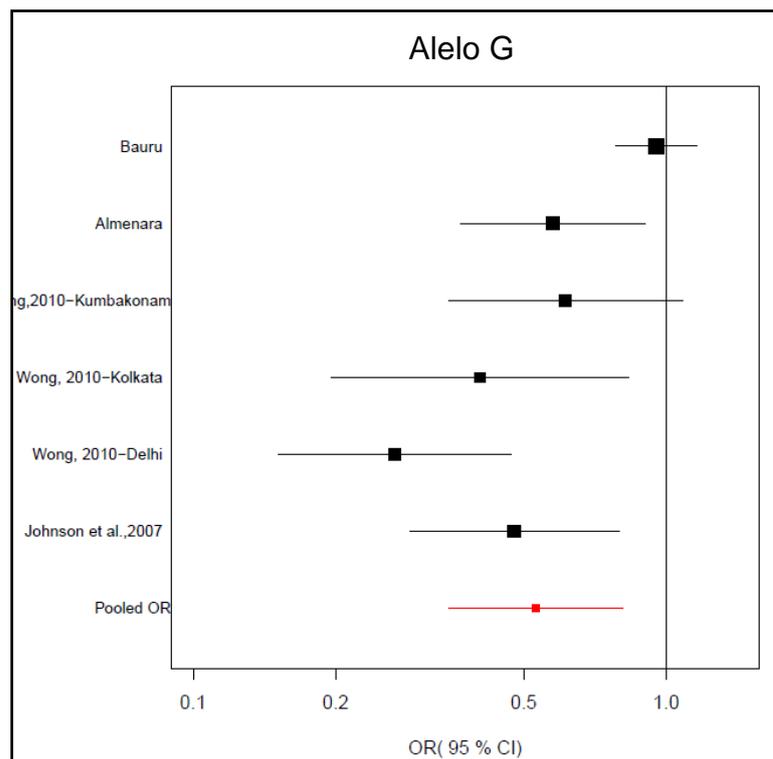


FIGURA 7 – Diagrama representativo da meta-análise dos estudos que analisaram o marcador rs5743618 do gene *TLR1*.

TABELA 10

Resultado da meta-análise dos dados dos estudos sobre o SNP *TLR1* rs5743618

Estudo	OR Efeito-fixado	IC 95%	Peso
Johnson <i>et al.</i> , 2007	0,478	0,287 – 0,796	14,720
Wong <i>et al.</i> , 2010 – Nova Deli	0,267	0,152 – 0,471	11,973
Wong <i>et al.</i> , 2010 - Kolkata	0,404	0,196 – 0,832	7,351
Wong <i>et al.</i> , 2010 - Kumbakonam	0,613	0,346 – 1,085	83,541
Almenara	0,577	0,368 – 0,904	11,780
Bauru	0,955	0,783 – 1,163	98,255
Agrupado	0,754	0,664 – 0,857	-

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: IC = Intervalo de Confiança

Os resultados obtidos para o gene *TLR1* na microrregião de Almenara foram reunidos àqueles obtidos nas populações de Bauru, Rio de Janeiro e Rondonópolis e somados a resultados de um estudo funcional sobre a expressão de *TLR1* em células mononucleares do sangue periférico desenvolvido pela equipe do Laboratório de Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, em um artigo intitulado “*Toll-like receptor 1 (TLR1) N248S single nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection*” (ANEXO B). Este *paper* foi submetido e aprovado para publicação no periódico *The Journal of Infectious Diseases*.

5.3.2 *IFNG* (rs2430561)

No total, foram encontrados cinco artigos publicados sobre o marcador rs2430561 (+874 T/A) do gene *IFNG*, todos relacionados a estudos do tipo caso-controle.

Nos trabalhos desenvolvidos por Fitness e colaboradores (2004), realizado com indivíduos do Malawi e por Franceschi e colaboradores (2009), com indivíduos brasileiros do Estado do Paraná, o grupo de controles se encontrava fora do EHW, razão pela qual foram excluídos da meta-análise.

O estudo desenvolvido por Cardoso e colaboradores (2010) utilizou duas amostras populacionais independentes, dos municípios de Bauru (SP) e Rio de Janeiro (RJ), respectivamente. A primeira era composta por 360 casos e 369 controles e a segunda por 414 casos e 609 controles. Na meta-análise, elas foram incluídas separadamente. Nesta análise, a combinação dos estudos resultou em uma amostra de 1561 casos, num total de 3565 indivíduos envolvidos.

Nenhuma heterogeneidade foi observada entre os estudos ($\chi^2 = 5,52$; $p = 0,24$) e o teste de Egger não identificou nenhuma evidência estatística de viés de publicação ($p = 0,9948$). Desta forma, utilizou-se o modelo de efeitos fixos para se estimar o valor da OR combinada para todos os estudos, que foi de 0,84 ($p < 0,003$), com o alelo T sendo associado à resistência à hanseníase, conforme representado na FIG. 8. A TAB. 11 traz o detalhamento dos dados para cada estudo.

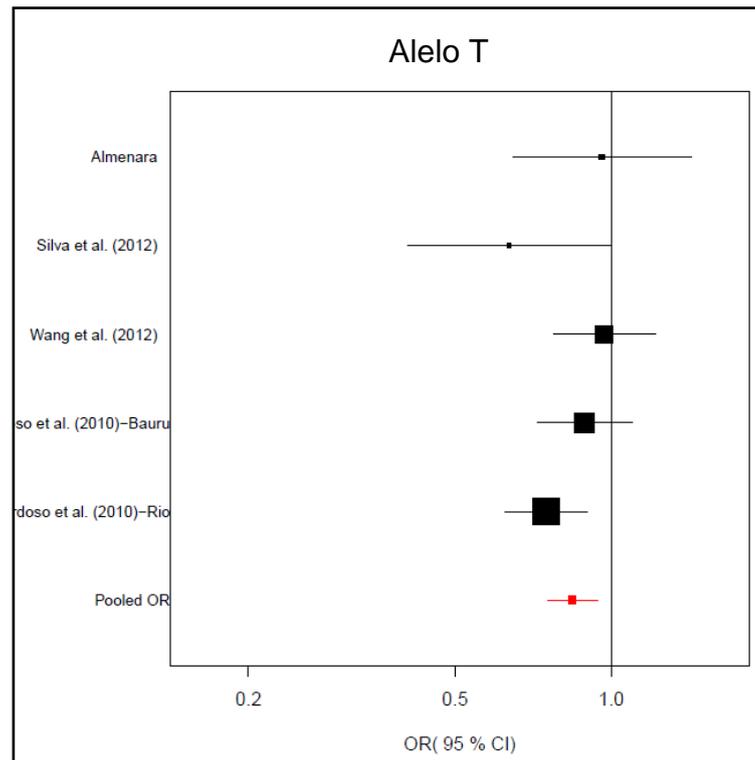


FIGURA 8 – Diagrama representativo da meta-análise dos estudos que analisaram o marcador rs2430561 do gene *IFNG*.

TABELA 11

Resultado da meta-análise dos dados dos estudos sobre o SNP *IFNG* rs2430561

Estudo	OR Efeito-fixado	IC 95%	Peso
Cardoso, 2010 - Bauru	0,889	0,719 – 1,099	85,683
Cardoso, 2010 – Rio	0,749	0,624 – 0,900	113,939
Silva <i>et al.</i> , 2012	0,636	0,406 – 0,996	19,016
Wang <i>et al.</i> , 2012	0,969	0,773 – 1,214	75,289
Almenara	0,96	0,646 – 1,427	24,490
Agrupado	0,841	0,754 – 0,939	-

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: IC = Intervalo de Confiança

5.3.2 IL10 (rs1800871)

Foram encontrados oito estudos sobre o marcador rs1800871 (-819 C>T) do gene *IL10*, todos do tipo caso-controle. Entretanto, três deles não atenderam aos critérios para inclusão na meta-análise. O trabalho de Franceschi e colaboradores (2009), com indivíduos brasileiros do Estado do Paraná, trazia apenas informações dos haplótipos formados pelos marcadores -592, -819 e -1082 do gene *IL10* e não dos genótipos separadamente. O estudo de Cardona-Castro e colaboradores (2012), realizado na Colômbia, também não detalhou os genótipos dos indivíduos, não permitindo a análise do EHW e a contagem dos alelos nos grupos de casos e controles. Já na pesquisa realizada por Félix e colaboradores (2012), no México, o grupo de casos era composto apenas por pacientes portadores de hanseníase na forma clínica LL, inviabilizando a comparação com outros estudos que analisaram a ocorrência da doença em todas as suas formas clínicas. Aggarwal e colaboradores (2011) trabalharam com duas amostras populacionais distintas, provenientes da Índia. Uma delas, de Orissa, era composta por 73 casos e 346 controles. Já a outra, de Nova Déli, era formada por 734 casos e 1294 controles. Cada uma delas foi incluída separadamente na meta-análise. No total, a amostra formada pela combinação dos estudos escolhidos para a meta-análise é de 5097 indivíduos, dos quais 2015 são casos.

Nenhuma heterogeneidade foi observada entre os estudos ($\chi^2 = 7,19$; $p = 0,41$) e o teste de Egger não identificou nenhuma evidência estatística de viés de publicação ($p = 0,9915$). Desta forma, utilizou-se o modelo de efeitos fixos para se estimar o valor da OR combinada para todos os estudos, que foi de 1,28 ($p < 0,001$), com o alelo T sendo associado à suscetibilidade à hanseníase, conforme representado na FIG. 9. A TAB. 12 traz o detalhamento dos dados para cada estudo.

Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase

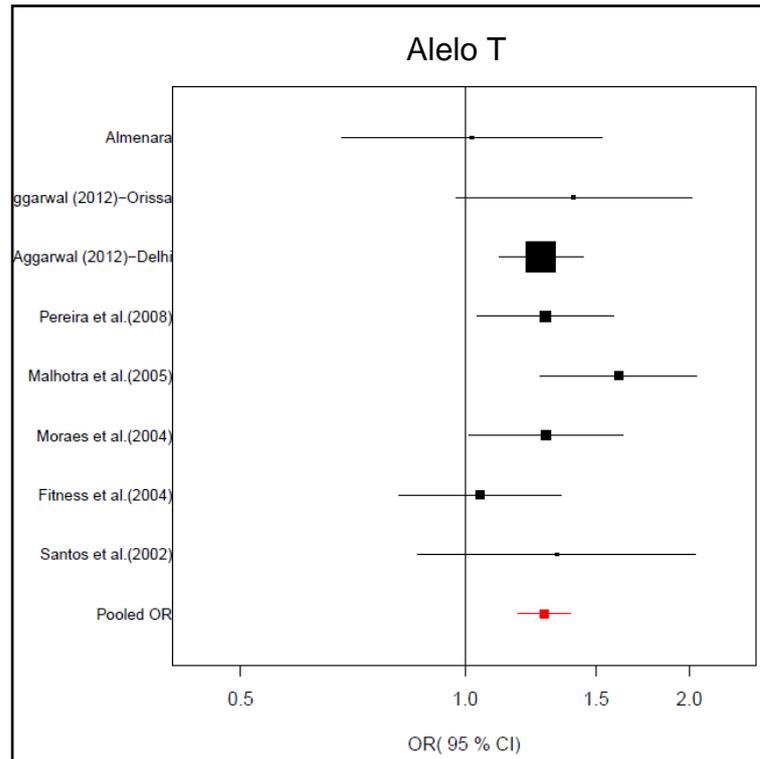


FIGURA 9 – Diagrama representativo da meta-análise dos estudos que analisaram o marcador rs1800871 gene *IL10*.

TABELA 12

Resultado da meta-análise dos dados dos estudos sobre o SNP *IL10* rs1800871

Estudo	OR Efeito-fixado	IC 95%	Peso
Santos <i>et al.</i> , 2002b	1,329	0,865 - 2,040	20,866
Fitness <i>et al.</i> , 2004	1,048	0,815 - 1,348	60,741
Moraes <i>et al.</i> , 2004	1,285	1,012 - 1,631	67,601
Malhotra <i>et al.</i> , 2005	1,607	1,261 - 2,048	65,350
Pereira <i>et al.</i> , 2008	1,282	1,036 - 1,586	84,937
Aggarwal <i>et al.</i> , 2012 – Nova Deli	1,265	1,111 - 1,439	229,676
Aggarwal <i>et al.</i> , 2012 – Orissa	1,399	0,973 - 2,013	29,074
Almenara	1,021	0,683 – 1,527	23,747
Agrupado	1,277	1,177 - 1,384	-

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: IC = Intervalo de Confiança

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Características da população estudada

A decisão pela exclusão dos casos do município de Santa Maria do Salto da amostra final trouxe à tona um questionamento sobre a questão da confiabilidade do diagnóstico da hanseníase na microrregião. Por tratarem-se, na grande maioria, de pacientes já diagnosticados e submetidos ao tratamento anos antes da realização dessa pesquisa, não foi possível submetê-los à avaliação de especialistas para a confirmação do diagnóstico. Por esta razão, não podem ser descartadas as hipóteses de super ou subnotificação de casos nos municípios estudados, embora esta última seja mais provável devido à capacidade operacional dos serviços de saúde locais, conforme já apontado em estudos anteriores (LANA *et al.*, 2004; LANA *et al.*, 2006; AMARAL; LANA, 2008).

A média de idade encontrada na amostra de casos recrutados para este estudo foi menor que a observada em outro trabalho semelhante realizado na mesma microrregião (AMARAL; LANA, 2008). Este resultado pode ser explicado pelo fato de que eram elegíveis para este trabalho apenas pacientes que possuíssem pelo menos um dos genitores vivos, o que acabava por excluir muitos daqueles com idade mais avançada.

Embora diversas pesquisas que analisam a associação de fatores genéticos com doenças infecciosas avaliem separadamente as diferentes etnias, avaliando-as segundo características físicas dos indivíduos como cor da pele, formato da face, tipo de cabelo, entre outros, optou-se, neste trabalho, por classificar os participantes segundo a cor/raça autodeclarada. Essa escolha baseou-se em estudos anteriores de ancestralidade que mostraram que, no Brasil, a cor da pele, avaliada individualmente, não constitui um bom preditor de ancestralidade. Considerando a intensa miscigenação étnica existente em nosso país, a forma ideal para se realizar essa classificação seria por meio da análise de marcadores moleculares de ancestralidade (PARRA *et al.*, 2003; PIMENTA *et al.*, 2006). Nesse aspecto, como já foi discutido anteriormente, o uso do TDT elimina o efeito de uma eventual estratificação étnica presente na amostra estudada.

Há estudos que sugerem que a vacinação com BCG seja capaz de induzir a resposta imune celular contra a hanseníase, protegendo contra suas formas mais

graves (DUPPRE *et al.*, 2008; DUPPRE *et al.*, 2012). Embora, dentro das medidas de controle da hanseníase, a aplicação dessa vacina seja indicada apenas para os contatos dos casos-índice (BRASIL, 2008), ela já faz parte dos programas de imunização desde a década de 70, sendo indicada a todas as pessoas, que deveriam recebê-la já nos primeiros dias de vida. Anteriormente, o esquema básico ainda incluía uma dose de reforço a ser aplicada entre os 6 e 10 anos de idade. Por essa razão, chama a atenção o fato de que metade dos casos não apresentava nenhuma cicatriz vacinal. Embora, em parte, isso possa ser explicado pela idade dos indivíduos, visto que os mais velhos não teriam recebido a vacina na infância, por tratar-se de uma região hiperendêmica, deveria haver um maior esforço para garantir altos índices de cobertura para esta vacina, como medida adicional de prevenção e/ou controle da doença.

A classificação operacional dos casos foi feita, em grande parte, com base apenas na contagem do número de lesões, sem o auxílio do exame baciloscópico, método que facilita a implementação do tratamento, mas está sujeito a erros (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2007; PARDILLO *et al.*, 2007; BARRETO *et al.*, 2008; GROSSI *et al.*, 2008). A identificação da forma clínica também foi baseada apenas no exame da quantidade e das características morfológicas das lesões de pele e nervos, uma vez que não foram encontrados registros nos prontuários médicos dos pacientes sobre a realização de exames histopatológicos que auxiliassem nessa classificação. Desta forma, não foi possível definir a forma clínica segundo o modelo proposto por Ridley-Jopling – que é o mais utilizado nas publicações científicas – visando comparar os resultados encontrados neste estudo com aqueles disponíveis na literatura. Também eram escassas as informações disponíveis sobre a ocorrência e classificação dos episódios reacionais. Por esta razão, optou-se por utilizar como desfecho nas análises apenas a ocorrência da hanseníase *per se*, não sendo avaliada a associação dos marcadores genéticos com o desenvolvimento das diferentes formas clínicas ou com a ocorrência dos episódios reacionais ocasionados pela doença.

Na avaliação do grau de incapacidade física no momento do diagnóstico, observa-se que uma grande proporção dos casos (36,8%) foram descobertos já com algum tipo de seqüela decorrente da hanseníase. Embora a PQT já tenha se mostrado eficiente no tratamento da doença, ela não reverte as incapacidades

físicas já instaladas e estas podem trazer limitações à vida dos seus portadores, bem como evoluir para formas mais graves se não forem corretamente tratadas.

6.2 Associação dos SNP rs4833095 e rs5743618 do gene *TLR1* com a hanseníase

Neste estudo, de todos os marcadores analisados, apenas aqueles pertencentes ao gene *TLR1* – rs4833095 e rs5743618 – foram associados à hanseníase. Após a análise utilizando a correção da variância empírica, a associação do segundo acabou assumindo um valor considerado *borderline*, mas esta variação pode ser explicada pelo fato de que este segundo teste é mais conservador que o primeiro e ainda há uma diminuição no número de núcleos familiares informativos, visto que alguns deles são desconsiderados por terem mais de um irmão afetado dentro do mesmo núcleo familiar ou mais de um núcleo dentro do mesmo *pedigree*. Ainda assim, os resultados devem ser considerados como indicativo de associação desses SNP com a ocorrência da doença.

O marcador rs5743618, ou T1805G, consiste em uma troca de bases que resulta na substituição de uma isoleucina (alelo 602I) por uma serina (alelo 602S) na posição 602 da proteína codificada por esse gene, por isso também é conhecido por I602S. Ela fica localizada no domínio transmembrana e teria influência direta na translocação do receptor, prejudicando sua expressão na membrana celular (JOHNSON *et al.*, 2007). Estudo sobre a influência desse SNP na resposta imune a lipopeptídeos demonstrou que o alelo 602S estaria relacionado a uma menor sinalização, tanto basal quanto estimulada por lipopeptídeos, do NF- κ B em células sanguíneas. Essa diferença também foi observada quando o estímulo foi produzido com extratos do *M. tuberculosis*. Foi demonstrado também que células com o genótipo homozigoto 602SS produziam menos IL-6 que aquelas homozigotas 602II (HAWN *et al.*, 2007). Outro estudo comparou o efeito sobre a ativação do NF- κ B de diversos polimorfismos de *TLR1* que resultavam em trocas de aminoácidos na estrutura da proteína, combinando-os com o tipo selvagem do *TLR2*, e o I602S apresentou uma das maiores perdas dessa função (aproximadamente 60%), com níveis semelhantes àqueles obtidos com o *TLR2* apenas (BEN-ALI *et al.*, 2011). Esses dados indicam que o alelo 602S acaba gerando um fenótipo hipofuncional. Este, porém, resultaria em proteção contra a hanseníase *per se* (JOHNSON *et al.*,

2007; WONG *et al.*, 2010) e contra os episódios reacionais de RR (MISCH *et al.*, 2008), sugerindo que o *M. leprae*, assim como determinadas micobactérias, atuaria subvertendo o sistema TLR como parte de seu mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro (JOHNSON *et al.*, 2007; CIRL *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2010). Este mecanismo incluiria ainda a inibição da maturação de DC e dos fagossomos e da expressão de moléculas do MHC II (KRUTZIK; MODLIN, 2004). Johnson e colaboradores (2007) propõem que falhas no funcionamento dos TLR seriam prejudiciais ao hospedeiro no caso de doenças agudas, mas benéficas no caso de doenças crônicas, como a hanseníase.

No entanto, em estudo realizado com uma amostra da população de Bangladesh, não foi encontrada associação para esse SNP, mas sim para o marcador rs4833095 (SCHURING *et al.*, 2009). Também chamado de G743A, ele envolve a troca de uma guanina por uma adenina na estrutura do DNA, resultando na substituição de uma aspargina por uma serina na posição 248 da respectiva proteína, daí também ser conhecido como N248S. Embora essa troca ocorra no domínio extracelular, no sítio de ligação do receptor – responsável pela detecção de vários lipopeptídeos bacterianos - ela também teria influência na sua expressão na membrana celular (UCIECHOWSKI *et al.*, 2011). Estudo realizado com indivíduos de Bangladesh mostrou que o alelo 248N diminui a resposta do receptor a agonistas bacterianos, prejudicando seu funcionamento. Os indivíduos homocigotos 248SS foram associados com a suscetibilidade à hanseníase *per se*, enquanto os heterocigotos 248SN foram associados à proteção contra a doença. No entanto, ao contrário do que seria esperado, não foram encontradas diferenças para os homocigotos 248NN. Ao avaliar a ocorrência dos episódios reacionais, constatou-se que alelo 248N era mais frequente em pacientes que desenvolveram ENL do que naqueles que não apresentaram episódios reacionais, sugerindo que a diminuição na função do receptor desencadeada por esse alelo está fortemente associada à ocorrência desse tipo de reação, embora o grupo analisado tenha sido composto por apenas 11 indivíduos. Em relação à RR, não foi encontrada associação significativa para nenhum dos alelos, embora o 248S tenha sido mais frequente em pacientes que apresentaram essa reação (SCHURING *et al.*, 2009).

O alelo 248S já havia sido associado com a suscetibilidade à tuberculose em uma amostra da população norte-americana (MA *et al.*, 2007) - em um estudo também do tipo TDT – e outra da população alemã (UCIECHOWSKI *et al.*, 2011),

reforçando a hipótese de que este marcador estaria envolvido no controle da resposta imunológica contra outras infecções micobacterianas.

As diferenças observadas entre os resultados dos estudos de associação dos SNP N248S e I602S à hanseníase e a outras doenças infecciosas podem ser explicadas pelo tamanho das amostras utilizadas em cada um deles e, principalmente, pela grande variação nas frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas desses *loci* observada entre populações de diferentes regiões do mundo e entre diferentes etnias residentes em uma mesma região (JOHNSON *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2007; BEN-ALI *et al.*, 2011; UCIECHOWSKI *et al.*, 2011; PLANTINGA *et al.*, 2012), maior que aquela encontrada no restante do genoma humano (WONG *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados na microrregião de Almenara são reforçados pelas meta-análises que também mostraram a existência de associações significativas, mesmo após combinarem dados de populações distintas. A análise dos haplótipos formados pelos alelos dos SNP rs4833095 e rs5743618, nesta ordem, mostraram que G/T e A/G também estavam associados à suscetibilidade e à resistência à hanseníase, respectivamente, mesmo após a correção pela variância empírica.

O desequilíbrio de ligação moderado existente entre esses dois marcadores ($r^2 = 0,6$) dificulta a individualização do papel de cada um deles e pode levar a uma falsa associação entre um deles e à doença.

6.3 Replicação dos SNP *IFNG* rs2430561 e *IL10* rs1800871

A pesquisa com a população da microrregião de Almenara não obteve êxito ao tentar reproduzir os achados de outros estudos que associaram os SNP rs2430561 e rs1800871 à ocorrência da hanseníase. Uma explicação para este resultado pode estar no tamanho da amostra utilizada. Considerando a questão dos pequenos efeitos dos genes nas doenças complexas, estudos de associação genética, sejam eles do tipo caso-controle ou TDT, requerem amostras expressivas. Para se estimar o tamanho da amostra, deve-se levar em conta o efeito do gene, a frequência do alelo e o nível de poder para detectar significância. Diante disso, o número ideal de núcleos pode variar de 83 a 11868, dependendo da frequência dos polimorfismos analisados (RISCH; MERIKANGAS, 1996). Neste estudo, no caso dos genes *IFNG* e *IL10*, o número de núcleos informativos foi de 85 e 84,

respectivamente, reduzindo o poder do teste para detectar o efeito desses marcadores.

O marcador rs2430561 do gene *IFNG*, também conhecido como +874 T/A, já foi alvo de diversos estudos de associação com a hanseníase – todos do tipo caso controle – identificados durante a etapa de revisão sistemática deste trabalho. As duas primeiras pesquisas realizadas especificamente com esse SNP envolveram indivíduos do Malawi (FITNESS *et al.*, 2004) e do Brasil (Estado do Paraná) (FRANCESCHI *et al.*, 2009) e não encontraram associação entre ele e a suscetibilidade à doença. Entretanto, cabe ressaltar que, em ambos os casos, o grupo de controles se encontrava fora do EHW – embora no segundo o valor calculado do qui-quadrado tenha sido *borderline* ($\chi^2 = 3,92$). O primeiro estudo a encontrar uma associação significativa entre o +874 T/A e a hanseníase foi desenvolvido com amostras brasileiras independentes dos municípios de Bauru e do Rio de Janeiro (CARDOSO *et al.*, 2010). No entanto, nesse trabalho, observou-se que o alelo +874T estava associado com a proteção contra a doença apenas nos indivíduos afrodescendentes das duas populações. Os autores conduziram ainda um estudo funcional com células mononucleares do sangue periférico que mostrou que, na ausência de estímulos, as portadoras do alelo +874T produziam níveis mais altos de IFN- γ quando comparadas àquelas portadoras apenas do alelo +874A. Por fim, dois novos estudos publicados recentemente, um com a população chinesa (WANG *et al.*, 2012) e outro com uma nova amostra da população brasileira (Estado do Amazonas) (SILVA *et al.*, 2012), também não encontraram nenhuma associação entre o marcador em questão e a hanseníase.

Esse polimorfismo também já foi diversas vezes associado à tuberculose (LÓPEZ-MADERUELO *et al.*, 2003; TSO *et al.*, 2005; SALLAKCI *et al.*, 2007; VALLINOTO *et al.*, 2010; MOSAAD *et al.*, 2011; SELMA *et al.*, 2011), inclusive em um estudo de meta-análise (PACHECO; CARDOSO; MORAES, 2008). Este fato reforça a ideia de que ele está relacionado à imunidade contra micobactérias.

O SNP +874 T/A coincide com o sítio de ligação para o fator de transcrição NF- κ B e deve exercer um papel importante na transcrição do gene *IFNG*. Alguns estudos indicam que o alelo +874T induz uma maior produção dessa citocina (PRAVICA *et al.*, 2000; LÓPEZ-MADERUELO *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2010; SELMA *et al.*, 2011).

Embora esses mecanismos ainda não estejam claramente definidos, a hipótese para explicar a associação é de que os indivíduos que carregam o alelo T apresentariam maiores níveis de produção de IFN- γ e seriam capazes de montar uma resposta imune eficiente contra o *M. leprae* (PRAVICA *et al.*, 2000; CARDOSO *et al.*, 2010).

A meta-análise indicou a existência de uma associação significativa entre esse SNP e a hanseníase, entretanto, cabe ressaltar que este resultado foi influenciado, principalmente, pelo estudo realizado com as populações brasileiras do Rio de Janeiro e Bauru, que apresentou o maior peso relativo no valor final da OR combinada (TAB. 11). Considerando o fator étnico envolvido na associação encontrada para essas populações, esse resultado deve ser visto com ressalvas e novos estudos, em outras populações, devem ser realizados antes de se atestar a relação deste marcador com a doença.

Diversos trabalhos publicados, todos referentes a estudos do tipo caso-controle, já analisaram a relação do SNP *IL10* -819 C/T (rs1800871) com a hanseníase. O primeiro deles foi realizado com indivíduos brasileiros do município do Rio de Janeiro (RJ) (SANTOS *et al.*, 2002b) e mostrou que o alelo -819T estava associado com a suscetibilidade à doença. Em 2004, porém, dois novos estudos, um deles realizado com uma amostra diferente de brasileiros (MORAES *et al.*, 2004) e outro com a população do Malawi (FITNESS, 2004), não encontraram associação para esse marcador. Um terceiro estudo com a população brasileira (PEREIRA *et al.*, 2008), agora com indivíduos do município de Bauru (SP), conseguiu replicar o resultado anteriormente encontrado no Rio de Janeiro, associando o alelo -819T à suscetibilidade. Nesta pesquisa ainda foi feita uma análise da produção de IL-10 por células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos do *M. leprae*, na qual as portadoras do referido alelo produziram níveis mais baixos daquela citocina quando comparadas às não portadoras. Dois estudos com amostras independentes da população indiana (MALHOTRA *et al.*, 2005; AGGARWAL *et al.*, 2011) também associaram o alelo -819T a um risco maior de adoecer. Recentemente, um trabalho conduzido por CARDONA-CASTRO e colaboradores (2012), na Colômbia, encontrou um efeito protetor para os genótipos homocigotos TT e AA. Por fim, um estudo realizado no México (FÉLIX *et al.*, 2012), não encontrou nenhuma associação significativa para esse polimorfismo, mas deve-se chamar a atenção para o fato de que o grupo de casos foi composto apenas por

pacientes da forma clínica LL. Uma explicação para essa grande variedade nos resultados poderia estar na ancestralidade étnica das populações, que resultaria em diferentes distribuições geográficas dos haplótipos de *IL10* (CARDONA-CASTRO *et al.*, 2012).

Em relação a este estudo, outra hipótese para explicar a falta de associação seria a baixa média de idade observada na amostra analisada, visto que a influência de IL-10 seria maior em idades mais avançadas.

Os resultados de estudos funcionais sobre a influência de cada um dos alelos desse SNP na regulação da produção da IL-10 ainda são controversos, visto que alguns associam o alelo -819T a níveis mais altos dessa citocina, enquanto outros atribuem esse efeito ao alelo -819C (MISCH *et al.*, 2010). Apesar disso, a existência de vários trabalhos relatando a associação desse polimorfismo com a hanseníase, corroborada pelo resultado da meta-análise realizada nesta pesquisa, evidencia seu papel como marcador do efeito do gene *IL10* na suscetibilidade à doença, provavelmente regulando padrões da resposta imune e, conseqüentemente, influenciando no desfecho da infecção.

6.4 Necessidade de novos estudos para os genes *NOD2* e *LTA4H*

Nenhum dos SNP dos genes *NOD2* (rs8057341, rs2066843 e rs751271) e *LTA4H* (rs1978331 e rs17525495) analisados neste estudo, nem os haplótipos formados por eles, foram associados à hanseníase.

O primeiro trabalho a apontar a associação entre polimorfismos do gene *NOD2* e a hanseníase foi um estudo de associação do genoma em larga escala, seguido por três estudos de replicação, realizado na China. Neste trabalho, dois SNP do *NOD2* foram associados à suscetibilidade à doença (rs9302752 e rs7194886). Estes marcadores ficam localizados em uma região intergênica e provavelmente estariam envolvidos na regulação da expressão do receptor NOD2. O SNP rs8057341 também foi analisado, mas apresentou um resultado *borderline* ($p = 0,0522$). Esse estudo também encontrou associação em polimorfismos presentes em outros quatro genes implicados em vias regulatórias da imunidade inata mediadas por NOD2 (*HLA-DRB1*, *LRRK2*, *RIPK2* e *TNFSF15*), reforçando a importância desse receptor na resposta imunológica à infecção pelo *M. leprae*, além de dois outros cujas funções ainda eram desconhecidas – *CCDC122* e *C13orf31*

(ZHANG *et al.*, 2009). No entanto, um estudo do tipo caso-controle, realizado com duas amostras populacionais da Índia e uma de Mali, envolvendo um total de 1368 indivíduos, no qual se tentou replicar esses resultados, encontrou associação apenas para os marcadores de *CCDC122* e *C13orf31* (WONG *et al.*, 2010). Berrington e colaboradores (2010) conduziram um estudo do tipo caso-controle, com 1034 indivíduos do Nepal (933 casos), que analisou a associação entre SNP de *NOD2* e a ocorrência da hanseníase *per se*, sua evolução para as diferentes formas clínicas e a ocorrência de episódios reacionais. Na análise considerando os alelos separadamente, quatro marcadores apresentaram resultados estatisticamente significativos. Ao se analisar os genótipos, foram oito marcadores associados, entre eles o rs751271, também analisado na microrregião de Almenara. Este SNP também mostrou uma associação estatisticamente significativa com a proteção à ocorrência de reação reversa. Apesar desses resultados positivos, nenhum desses marcadores está entre aqueles descritos pelos estudos anteriores. Recentemente, a associação do SNP rs9302752 foi replicada na população do Vietnã (GRANT *et al.*, 2012), representando a primeira replicação para um marcador desse gene em relação à hanseníase.

Por estar presente no compartimento intracelular, o receptor *NOD2* provavelmente atua reconhecendo lipídios da parede celular do *M. leprae* e ativando o NF- κ B, levando à indução um perfil inflamatório na resposta imune específica. Alterações em sua estrutura, resultante de polimorfismos no gene *NOD2*, provavelmente interferem na regulação dessa via, podendo favorecer a sobrevivência do bacilo (BERRINGTON *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011).

Polimorfismos no gene *NOD2* já foram associados à tuberculose (AUSTIN; MA; GRAVISS, 2011) e à Doença de Crohn (SCHURR; GROS, 2009; GLAS *et al.*, 2010), entre outras. Considerando sua importância na resposta imune inata e o papel desempenhado na indução da resposta imune adaptativa, torna-se evidente sua implicação no desfecho da infecção pelo *M. leprae* e, conseqüentemente, do papel que SNP presentes em sua estrutura podem desempenhar na regulação de suas funções. Entretanto, ainda não há um consenso em relação a quais de seus marcadores estariam associados à suscetibilidade ou resistência à hanseníase. Diferenças na ancestralidade das populações estudadas são apontadas como a principal razão para as discrepâncias observadas entre os estudos. O desequilíbrio de ligação entre os SNP pode ser outro fator que estaria contribuindo para essas

diferenças. Isso reforça a necessidade da realização de novas pesquisas, a fim de melhor entender essas diferenças.

O gene *Ita4h* foi inicialmente associado à hipersuscetibilidade à infecção por micobactérias – mais especificamente, o *Mycobacterium marinum* – em larvas de peixes-zebra (*zebrafish*). Em seguida, análises funcionais trouxeram evidências de que essa suscetibilidade era provocada por deficiências na via imunorregulatória dos eicosanóides, que levaria à produção excessiva de lipoxinas anti-inflamatórias que limitariam a produção de TNF, permitindo a proliferação bacilar. A partir daí, os pesquisadores decidiram analisar a influência de polimorfismos do gene *LTA4H* na suscetibilidade à tuberculose e à hanseníase em seres humanos. Para isso, foram realizados dois estudos: um do tipo caso-controle, com portadores de tuberculose na forma pulmonar ou meníngea e indivíduos saudáveis do Vietnã, e uma coorte com pessoas expostas à hanseníase do Malawi. No primeiro, foram testados seis marcadores e, após os ajustes nas comparações, apenas os SNP rs1978331 e rs2660898 permaneceram estatisticamente significativos, tendo sido associados a uma menor incidência da tuberculose e também a uma menor mortalidade causada pela doença em indivíduos heterozigotos. Posteriormente, esses dois marcadores foram avaliados entre os portadores de hanseníase e os resultados também mostraram uma associação entre os genótipos heterozigotos e uma menor incidência das formas clínicas multibacilares sem episódios reacionais de ENL (TOBIN *et al.*, 2010). Esses resultados sugerem a modulação da função do gene *LTA4H* resulta em um balanço entre eicosanóides pró e anti-inflamatórios que conferiria proteção contra essas duas infecções (CARDOSO *et al.*, 2011).

Já foi demonstrado que o *M. leprae* tem a capacidade de induzir a produção e o acúmulo de gotas lipídicas no interior dos macrófagos ou células de Schwann, como parte de seu mecanismo de evasão das defesas do hospedeiro. Sabe-se também que essas gotas são um sítio intracelular para a síntese de prostaglandina E2 (PGE₂), um mediador lipídico que suprime a resposta Th1 em portadores de hanseníase, sendo mais frequente em pacientes da forma LL (CRUZ *et al.*, 2008; MATTOS *et al.*, 2010; MATTOS *et al.*, 2011).

Nosso estudo não encontrou associação para esses dois marcadores de *LTA4H* na população da microrregião de Almenara. Considerando ter sido esta a primeira tentativa de replicar esses resultados, faz-se necessária realização de novas pesquisas, em diferentes regiões, para se definir se os efeitos observados no

Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase

trabalho anterior podem ser replicados ou seriam específicos para as populações estudadas.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais ou menos lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”.

Isaac Newton

Considerações finais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de todos os esforços empreendidos para eliminar a hanseníase, ela ainda persiste como um importante problema de saúde pública no Brasil e em outros países do mundo, com centenas de milhares de novos casos sendo registrados a cada ano. Ainda que a poliquimioterapia tenha se mostrado eficaz, reduzindo o tempo de tratamento e trazendo ao paciente a possibilidade real de cura, ela não foi capaz de conter a transmissão da doença, como era esperado. Dessa forma, embora as medidas de controle adotadas até o momento tenham possibilitado um grande avanço em relação à redução da endemia, elas já se mostram insuficientes para resolver de forma definitiva o problema, necessitando de novas abordagens e estratégias complementares. A elaboração dessas novas estratégias passa por um maior conhecimento da doença e de todos os aspectos relacionados à sua transmissão e desenvolvimento. Nesse sentido, considerando o papel desempenhado pelo sistema imunológico do hospedeiro na resposta à infecção e a influência exercida sobre ele pela composição genética do indivíduo, torna-se fundamental buscar um maior entendimento sobre os mecanismos genéticos envolvidos na modulação dessa resposta.

Embora não seja recente a ideia da influência de fatores genéticos no desenvolvimento de doenças infecciosas, ainda são relativamente poucos os pontos de consenso nesta área, quando comparados àqueles que permanecem sem esclarecimento. No caso da hanseníase não é diferente, uma vez que, apesar de várias descobertas já alcançadas, elas ainda não puderam ser convertidas em medidas concretas de prevenção, tratamento e controle da doença. É possível que, em alguns anos, a partir do conhecimento dos genes envolvidos no processo de adoecimento, vacinas possam ser criadas, novos medicamentos possam ser desenvolvidos e novos protocolos de tratamento e prevenção possam ser adotados.

Para isso, é necessário que se continue avançando no estudo desses genes, a fim de confirmar ou refutar o papel daqueles já conhecidos e identificar aqueles ainda não descobertos. Este foi o objetivo deste estudo, de replicar os resultados de outros trabalhos, em uma região hiperendêmica para a hanseníase ainda não estudada, adotando um tipo de estudo ainda relativamente pouco utilizado.

A escolha pelo Teste de Desequilíbrio de Transmissão se mostrou um desafio, principalmente pela dificuldade em se recrutar os indivíduos participantes,

pelas limitações impostas pelo tamanho da amostra. Por outro lado, ela possibilitou a realização de análises menos sujeitas a vieses e a apresentação de resultados obtidos por meio de uma metodologia diferente, enriquecendo a comparação e a discussão com outros resultados já existentes.

Sem dúvida, o resultado mais consistente dessa pesquisa foi a associação significativa dos SNP rs4833095 e rs5743618 do gene *TLR1* à ocorrência da hanseníase, confirmada pelas meta-análises. Esses dados puderam ser combinados aos de outras populações – e outros tipos de estudo – e geraram um trabalho robusto, que traz uma grande contribuição para o entendimento do papel desse gene no desenvolvimento da doença.

Os resultados das análises dos SNP dos genes *IFNG* e *IL10*, embora não tenham mostrado significância estatística, se apresentaram na mesma direção dos resultados de outros trabalhos já publicados e foram confirmados por meio das meta-análises.

Já as análises dos SNP dos genes *NOD2* e *LTA4H* não conseguiram replicar nenhum dos resultados obtidos em estudos anteriores. No caso desses genes, novas tentativas de replicação, em populações diferentes, serão necessárias até que se obtenha evidências consistentes de um marcador de consenso.

A estratégia adotada de realização das meta-análises permitiu confirmar os dados observados nos genes *IFNG*, *IL10* e, principalmente, *TLR1*, dando mais robustez aos resultados encontrados e confirmando que, apesar das limitações, o Teste de Desequilíbrio de Transmissão foi capaz de gerar dados consistentes.

A partir deste estudo, surgem novas perspectivas, uma vez que, com a amostra populacional formada, novos SNP poderão ser analisados utilizando-se esse tipo de estudo. Além disso, o material já coletado de outra amostra populacional independente da mesma região permitirá também a replicação desses e de outros resultados por meio de um estudo do tipo caso-controle.

Referências

REFERÊNCIAS

ABEL, L.; DEMENASIS, F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean Island: Desirade Island. **American Journal of Human Genetic**, v. 45, n. 2, p. 256-266, Feb. 1988.

AGGARWAL, S. *et al.* Genetic variations and interactions in anti-inflammatory cytokine pathway genes in the outcome of leprosy: a study conducted on a massARRAY platform. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 8, p. 1264-1273, Oct. 2011.

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.

ALCAÏS, A. *et al.* Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin- α allele as a major risk factor for early-onset leprosy. **Nature Genetics**, v. 39, n. 4, p. 517-522, Apr. 2007.

ALTER, A. *et al.* Genetic and functional analysis of common *MRC1* exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. **Human Genetics**, v. 127, n. 3, p. 337-348, Mar. 2010.

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

ALTER, A. *et al.* Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. **Human Genetics**, v. 123, n. 3, p. 227-235, Feb. 2008.

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

ARAÚJO, M. G. 1925-2005 – Evolução e estado atual da quimioterapia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80. n. 2, p. 199-202, 2005.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 3, p. 373-382, Maio/Jun. 2003.

ASCENZI, P. *et al.* H₂O₂ and NO scavenging by *Mycobacterium leprae* truncated hemoglobin O. **Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 2, p. 197-201, Aug. 2008.

ASCENZI, P. *et al.* Nitric oxide scavenging by *Mycobacterium leprae* G1bO involves the formation of the ferric heme-bound peroxynitrite intermediate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 1, p. 450-456, Jan.2006.

ASCENZI, P.; MILANI, M.; VISCA, P. Peroxynitrite scavenging by ferrous truncated hemoglobin G1bO from *Mycobacterium leprae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 351, n. 2, p. 528-533, Oct. 2006.

ASCENZI, P.; VISCA, P. Scavenging of reactive nitrogen species by mycobacterial truncated hemoglobin. **Methods in Enzymology**, v. 436, p. 317-337, 2008.

ATTIA, E. A. S. *et al.* Circulating CD4⁺ CD25^{high}FoxP3⁺ T cells vary in different clinical forms of leprosy. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 10, p. 1152-1158, Oct. 2010.

AUSTIN, C. M.; MA, X.; GRAVISS, E. A. Common nonsynonymous polymorphisms in the *NOD2* gene are associated with resistance or susceptibility to tuberculosis disease in African Americans. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 12, p. 1713-1716, June 2008.

BARRETO, J. A. *et al.* Sorologia rápida para hanseníase (teste ML Flow) em pacientes dimorfos classificados como paucibacilares pelo número de lesões cutâneas: uma ferramenta útil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, sup. II, p. 45-47, 2008.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

BEN-ALI, M. *et al.* Functional characterization of naturally occurring genetic variants in the human *TLR1-2-6* gene family. **Human Mutation**, v. 32, n. 6, p.643-652, June, 2011.

BERRINGTON, W. R. *et al.* Common polymorphisms in the *NOD2* gene region are associated with leprosy and its reactive states. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1422-1435, May 2010.

BEUTLER, B.; REHLI, M. Evolution of the TIR, tolls and TLRs: functional inferences from computational biology. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 270, p. 1-21, 2002.

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

BOCHUD, P. Y. *et al.* Toll-like Receptors 2 (*TLR2*) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 2, p. 253-261, Jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Hanseníase. **Relatório de Gestão Janeiro de 2009 a Dezembro de 2010**. Brasília, 2011. 88p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o controle da hanseníase**. Brasília, 2002. 89p.

BRASIL. 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, 2010. 368p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em saúde**: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil. Brasília, 2008. 12p.

BÜHRER-SÉKULA, S. *et al.* The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. **Acta Tropica**, v. 111, n. 2, p. 172-176, Aug. 2009.

BÜHRER-SÉKULA, S. *et al.* The ML Flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Leprosy Review**, v. 78, n. 1, p. 70-79, Mar. 2007.

BUYSKE, S. *et al.* When a case is not a case: effects of phenotype misclassification on power and sample size requirements for the transmission disequilibrium test with affected child trios. **Human Heredity**, v. 67, n. 4, p. 287-292, Jan. 2009.

CANTOR, R. M.; LANGE, K.; SINSHEIMER, J. S. Prioritizing GWAS results: a review of statistical methods and recommendations for their application. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 1, p. 6-22, Jan. 2010.

CARDONA-CASTRO, N. *et al.* IL-10 gene promoter polymorphisms and leprosy in a Colombian population sample. **Biomédica**, v. 32, p. 71-76, Jan./Mar. 2012.

CARDOSO, C. C. *et al.* IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. **Human Genetics**, v. 128, n. 5, p. 481-490, Nov. 2010.

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

CARLSON, C. S. *et al.* Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. **American Journal of Human Genetics**, v. 74, n. 1, p. 106-120, Jan. 2004.

CHAPMAN, J. M. *et al.* Detecting disease associations due to linkage disequilibrium using haplotype tags: a class of tests and the determinants of statistical power. **Human Heredity**, v. 56, n. 1-3, p. 18-31, 2003.

CIRL, C. *et al.* Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. **Nature Medicine**, v. 14, n. 4, p. 399-406, Apr. 2008.

CLAYTON, D.; JONES, H. Transmission Disequilibrium Tests for extended marker haplotypes. **The American Journal of Human Genetics**, v. 65, n. 4 p. 1161-1169, Oct. 1999.

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

CONTIN, L. A. *et al.* Uso do teste ML-Flow como auxiliar na classificação e tratamento da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 91-95, jan./fev. 2011.

CRUZ, D. *et al.* Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 8, p. 2917-2928, Aug. 2008.

DORNELLES, L. N.; PEREIRA-FERRARI, L.; MESSIAS-REASON, I. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against the lepromatous but not the tuberculoid forms. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n. 3, p. 463-468, Sep. 2006.

DOUGLAS, J. T. *et al.* Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 897-900, Sep. 2004.

DUPPRE, N. C. *et al.* Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n.7, p. 631-638, July 2008.

DUPPRE, N. C. *et al.* Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, Dec. 2012.

DURÃES, S. M. B. **Estudo de replicação dos polimorfismos nos genes de TNF, LTA e Parkina em famílias com hanseníase do Estado do Rio de Janeiro**. 2008. 96f. Tese (Doutorado em Medicina – Dermatologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro.

EDWARDS, B. J. *et al.* Power and sample size calculations in the presence of phenotype errors for case/control genetic association studies. **BMC Genetics**, v. 6, n. 18, Apr. 2005.

ELBER, C. C. *et al.* Using genome-wide pathway analysis to unravel the etiology of complex diseases. **Genetic Epidemiology**, v. 33, n. 5, p. 419-431, July 2009.

EWENS, W. J.; SPIELMAN, R. S. The Transmission/Disequilibrium Test: history, subdivision and admixture. **The American Journal of Human Genetics**, v. 57, p. 455-464, Aug. 1995.

FEITOSA, M. F.; KRIEGER, H. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 73-83, 2002.

FÉLIX, J. S. V. *et al.* Lack of effects of the TNF- α and IL-10 gene polymorphisms in Mexican patients with lepromatous leprosy. **Leprosy Review**, v. 83, n. 1, p. 34-39, Mar. 2012.

FINE, P. E. *et al.* Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 1, p. 91-102, July 1997.

FITNESS, J. *et al.* Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 330-340, Sep. 2004.

FITNESS, J.; TOSH, K.; HILL, A. V. Genetics of susceptibility to leprosy. **Genes and Immunity**, v. 3, n. 8, p. 441-453, Dec. 2002.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Simpósio: Hanseníase**. Cap. II. Medicina, Ribeirão Preto. v. 30, p. 335-339, jul./set. 1997.

FRANCESCHI, D. S. A. *et al.* Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 493-498, July 2009.

GLAS, J. *et al.* The *NOD2* single nucleotide polymorphisms rs2066843 and rs2076756 are novel and common Crohn's Disease susceptibility gene variants. **PLoS One**, v.5, n.12, Dec. 2010.

GOMES, G. I. *et al.* The functional state of the complement system in leprosy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 605-610, Apr. 2008.

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**, Uberaba, v. 35, n. 4, p. 365-375, jul./ago. 2002.

GOULART, L. R.; FERREIRA, F. R.; GOULART, I. M. B. Interaction of TaqI polymorphism at exon 9 of the vitamin D receptor gene with the negative lepromin response may favor the occurrence of leprosy. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, p. 91-98, Oct. 2006.

GROSSI, M. A. F. *et al.* A influência do teste sorológico ML Flow na classificação da hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, sup. II, p. 34-38, 2008.

GRANT, A. V. *et al.* Crohn's disease susceptibility genes are associated with leprosy in the Vietnamese population. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 11, p. 1763-1767, Dec. 2012.

HAN, X. Y. *et al.* A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856-864, Dec. 2008.

HAN, X. Y. *et al.* Comparative sequence analysis of *Mycobacterium leprae* and the new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 6067-6074, Oct. 2009.

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, Aug. 2012.

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

HAWN, T. R. *et al.* A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 8, p. 2280-2289, June 2007.

HILL, A. V. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. **Annual Review of Genetics**, v. 40, p. 469-486, 2006.

JANEWAY JR., C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 197-216, 2002.

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. 229-233, Feb. 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, p. 7520-7524, June 2007.

JOPLING, W. H.; McDOUGALL, A. C. **Handbook of leprosy**, 4.ed. Oxford: Heinmann Professional Publishing, 1988.

JUYAL, G. *et al.* An investigation of genome-wide studies reported susceptibility *loci* for ulcerative colitis shows limited replication in North Indians. **PLoS One**, v.6, n.1, Jan. 2011.

KANG, T. J.; LEE, S.B.; CHAE, G. T. A polymorphism in the Toll-like Receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. **Cytokine**, v. 20, n. 2, p. 56-62, Oct. 2002.

KAPLAN, G.; COHN, Z. A. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. **Leprosy Review**, v. 57, sup. 2, p. 199-202, 1986.

KAWAHITA, I. P.; LOCKWOOD, D. N. J. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 4, p. 329-337, Apr. 2008.

KAWAHITA, I. P.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 1, p. 75-82, jan./fev. 2008.

KAZEEM, G. R.; FARRAL, M. Integrating case-control and TDT studies. **Annals of Human Genetics**, v. 69, p. 329-335, May 2005.

KRUTZIK, S. R. *et al.*, 2003. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 525-532, May 2003.

KRUTZIK, S. R. *et al.*, 2005. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 11, n. 6, p. 653-660, June 2005.

KRUTZIK, S. R.; MODLIN, R. L. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 35-41, Feb. 2004.

KUMAR, B.; DOGRA, S.; KAUR, I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from North India. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 72, n. 2, p. 125-133, June 2004.

LANA, F. C. F. *et al.* Análise da situação epidemiológica da hanseníase na microrregião de Almenara/Minas Gerais - Período: 1998-2004. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 10, n. 2, p. 107-112, Abr./Jun. 2006.

LANA, F. C. F. *et al.* Detecção da hanseníase no Vale do Jequitinhonha - Minas Gerais: redução da tendência epidemiológica ou problemas operacionais para o diagnóstico?. **Hansenologia Internationalis**, v. 29, n. 2, p. 118-123, 2004.

LEANDRO, A. C. C. S. *et al.* Genetic polymorphisms in vitamin D receptor, vitamin D-binding protein, Toll-like receptor 2, nitric oxide synthase 2, and interferon- γ genes and its association with susceptibility to tuberculosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 4, p. 312-322, Apr. 2009.

LEVIS, W. R.; ZHANG, S.; MARTINIUK, F. *Mycobacterium lepromatosis*: emerging strain or species?. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 2, p. 158, Feb. 2012.

LIBRATY, D. H. *et al.* Interferon- γ differentially regulates Interleukin-12 and Interleukin-10 production in leprosy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 2, p. 336-341, Jan. 1997.

LIU, P. T. *et al.* Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, n. 5768, p. 1770-1773, Mar. 2006.

LÓPEZ-MADERUELO, D. *et al.* Interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 7, p. 970-975, Apr. 2003.

LYON, S. *et al.* Associação do teste sorológico ML Flow com a baciloscopia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, sup. II, p. 23-26, 2008.

MA, X. *et al.* Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. **PLoS One**, v. 2, n. 12, Dec. 2007.

MALHOTRA, D. *et al.* Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, n. 4, p. 438-442, Apr. 2006.

MALHOTRA, D. *et al.* IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. **Human Genetics**, v. 118, n. 2, p. 295-300, Nov. 2005.

MANOLIO, T. A. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 2, p. 166-176, July 2010.

MARQUET, S.; SCHURR, E. Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 4, p. 479-483, Apr. 2001.

MARTELLI, C. M. *et al.* Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. São Paulo, v. 5, n. 3, p. 273-285, 2002.

MARTINIUK, F. *et al.* Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 5, p. 626-630, May 2012.

MATTOS, K. A. *et al.* Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 3, p. 371-384, Mar. 2010.

MATTOS, K. A. *et al.* Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 259-273, Feb. 2011.

McINTURFF, J. E.; MODLIN, R.L.; KIM, J. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 1, p. 1-8, Jul. 2005.

MENDONÇA, V. A. *et al.* Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 4, p. 343-350, jul./ago. 2008.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria Estadual de Dermatologia Sanitária. **Seminário Estadual de Avaliação em Hanseníase Minas Gerais 2010**. Belo Horizonte: Secretaria de Estado da Saúde, 2010. 61 p.

MIRA, M. T. *et al.* Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nature Genetics**, v. 33, n. 3, p. 412-415, Mar. 2003.

MIRA, M. T. *et al.* Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 636-640, Feb. 2004.

MISCH, E. A. *et al.* Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 5, May 2008.

MISCH, E. A. *et al.* Leprosy and the human genome. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 74, n. 4, p. 589-620, Dec. 2010.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **The Journal of Investigative Epidemiology**, v. 102, n. 6, p. 828-832, June 1994.

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

MONOT, M. *et al.* Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p.1282-1289, Dec. 2009.

MONOT, M *et al.* On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, May 2005.

MONTOYA, D. *et al.* Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host & Microbe**, v. 6, n. 4, p. 343-353, Oct. 2009.

MORAES, M. O. *et al.* Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 6, p. 935-941, Dec. 2000.

MORAES, M. O. *et al.* Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for Interferon-g and Interleukin-12 in reactions (RR and ENL). **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 50, n. 5, p. 541-549, Nov. 1999.

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

MORAES, M. O. *et al.* Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. **Genes and Immunity**, v. 5, n. 7, p. 592-595, Nov. 2004.

MORAES, M. O. *et al.* Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 1, p. 175-181, Jan. 2001.

MOSAAD, Y. M. *et al.* Interferon-gamma +874 T/A and interleukin-10 -1082 A/G single nucleotide polymorphism in Egyptian children with tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 72, n. 4, p. 358-364, Oct. 2010.

MURRAY, R. A. *et al.* *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 1, p. 338-344, Jan. 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS); ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). **Manual para o controle da lepra**. Washington: OPAS, 1989. p. 48-62.

OZINSKY, A. *et al.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13766-13771, Dec. 2000.

PACHECO, A. G.; CARDOSO, C. C.; MORAES, M. O. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Human Genetics**, v. 123, n. 5, p. 477-484, June 2008.

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-regulatory molecules in lepromatous leprosy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 5, p. 878-883, May 2012.

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

PEARSON, T. A.; MANOLIO, T. A. How to interpret a genome-wide association study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 299, n. 11, p. 1335-1344, Mar. 2008.

PARRA, F. C. *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 1, p.177-182, Jan. 2003.

PEREIRA, A. C. *et al.* Genetic epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 2, p. 174-180, Mar. 2009.

PIMENTA, J. R. *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. **Human Heredity**, v. 62, n. 4, p. 190-195, 2006.

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

PINTO NETO, J. M. *et al.* Considerações epidemiológicas referentes ao controle dos comunicantes de hanseníase. **Hansenologia Internationalis**, Bauru, v. 27, n. 1, p. 23-28, 2002.

PLANTINGA, T. S. *et al.*, 2012. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 6, p. 934-943, Mar. 2012.

PRAVICA, V. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. **Human Immunology**, v. 61, n. 9, p. 863-866, Sep. 2000.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética?. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 5, p. 451-459, 2007.

RADA, E.; ARANZAZU, N. ; CONVIT, J. Respuesta inmunitaria de la enfermedad de Hansen. Revisión. **Investigación Clínica**, Maracaibo, v. 50, n. 4, p. 513-517, 2009.

REYNARD, M. P. *et al.* Allele frequencies for an interferon-gamma microsatellite in a population of Brazilian leprosy patients. **European Journal of Immunogenetics**, v. 30, n. 2, p. 149-151, Apr. 2003.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 24, p. 255-273, 1966.

RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, v. 273, n. 5281, p. 1516-1517, Sep. 1996.

ROACH, J. C. *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 27, p. 9577-9582, July 2005.

ROBINSON, N. *et al.* Mycobacterial phenolic glycolipid inhibits phagosome maturation and subverts the pro-inflammatory cytokine response. **Traffic**, Copenhagen, v. 9, n. 11, p. 1936-1947, Nov. 2008.

RODRIGUES; L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 464-470, June 2011.

ROY, S. *et al.* Association of Vitamin D Receptor genotype with leprosy type. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 1, p. 187-191, Jan.1999.

SALES, A. M. *et al.* Double-blind trial of the efficacy of pentoxifylline vs thalidomide for the treatment of type II reaction in leprosy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 2, p. 243-248, Feb. 2007.

SALLAKCI, N. *et al.* Interferon-gamma gene+874T-A polymorphism is associated with tuberculosis and gamma interferon response. **Tuberculosis (Edinburg, Scotland)**, v. 87, n. 3, p. 225-230, May 2007.

SAMPAIO, E. P. *et al.* Current status in reactions and nerve damage in leprosy. What next? In: TDR. **Report of the Scientific Working Group meeting on leprosy**. Geneva: World Health Organization, 2002. Cap. 7, p. 47-56.

SAMPAIO, E. P. *et al.* Pentoxifylline decreases *in vivo* and *in vitro* tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 111, n. 2, p. 300-308, Feb. 1998.

SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 69-76, Jan.1998.

SANTOS A. R. *et al.* Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 186, n. 11, p. 1687-1691, Dec. 2002b.

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

SANTOS, J. *et al.* Uso de trios caso-padres en estudios epidemiológicos de asociación entre polimorfismos genéticos y enfermedades complejas. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v. 130, n. 11, p. 1307-1315, 2002a.

SAPKOTA, B. R. *et al.* Association of TNF, MBL and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. **Human Immunology**, v. 71, n. 10, p. 992-998, Oct. 2010.

SARDINHA, J. F. J. *et al.* Genetic risk factors for human susceptibility to infections of relevance in dermatology. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 708-715, jul./ago. 2011.

SCHAID, D. J. Transmission disequilibrium, family controls, and great expectations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 4, p. 935-941, Oct. 1998.

SCHENK, M. *et al.* NOD2 triggers an interleukin-32–dependent human dendritic cell program in leprosy. **Nature Medicine**, v. 18, n. 4, p. 555-564, Apr. 2012.

SCHRODER, K. *et al.* Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, Feb. 2004.

SCHURING, R. P. *et al.* Polymorphism N248S in the human Toll-like Receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 12, p. 1816-1819, June 2009.

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

SELMA, W. B. *et al.* Interferon gamma +874T/A polymorphism is associated with susceptibility to active pulmonary tuberculosis development in Tunisian patients. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n. 6, p. 379-387, June 2011.

SHEVACK, E. M. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 6, p. 389-400, June 2002.

SILVA, G. A. *et al.* IFN- γ +875 microsatellite polymorphism as a potential protection marker for leprosy patients from Amazonas state, Brazil. **Cytokine**, v. 60, n. 2, p. 493-497, Nov. 2012.

SILVA, R. C. *et al.* Comportamento dos testes sorológicos ML Flow e ELISA (PGL-I) em áreas endêmica e não endêmica de hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, sup. II, p. 19-22, 2008.

SOUZA, V. N. B.; PEREIRA, A. C. Genética humana na susceptibilidade à hanseníase. **Hansenologia Internationalis**, Bauru, v. 32, n. 1, p. 81-93, 2007.

SPENCER, C. C. A. *et al.* Designing genome-wide association studies: sample size, power, imputation, and the choice of genotyping chip. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 5, May 2009.

SUN, F. *et al.* Transmission disequilibrium test (TDT) when only one parent is available: the 1-TDT. **American Journal of Epidemiology**, v. 150, n. 1, p. 97-104, July 1999.

SUN, Y. *et al.* Gene expression analysis of leprosy by using a multiplex branched DNA assay. **Experimental dermatology**, v. 20, n. 6, p. 520-522, June 2011.

SUNDAR RAO, P. S. *et al.* Impact of MDT on incidence rates of leprosy among household contacts. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 57, n. 3, p. 647-651, Sep. 1989.

TALHARI, S.; GARRIDO, R. **Medicina Tropical: Hanseníase**, 3.ed. Manaus: Gráfica Tropical, 1997.

TOBIN, D. M. *et al.* The *Ita4h* locus modulates susceptibility to Mycobacterial infection in zebrafish and humans. **Cell**, v. 140, n. 5, p. 717-730, Mar. 2010.

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, Apr. 2011.

TSO, H. W. *et al.* Association of interferon gamma and interleukin 10 genes with tuberculosis in Hong Kong Chinese. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 4, p. 358-363, June 2005.

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

VALLINOTO, A. C. R. *et al.* IFNG +874T/A polymorphism and cytokine plasma levels are associated with susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and clinical manifestation of tuberculosis. **Human Immunology**, v. 71, n. 7, p. 692-696, July 2010.

van BEERS, S. M.; WIT, M. Y. L.; KLATSER, P. R. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. **FEMS Microbiology Letters**, v. 136, n. 3; p. 221-230, Mar. 1996.

VANDERBORGHT, P. R. *et al.* Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNF α promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. **International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Diseases**, v. 72, n. 2, p. 143-148, June 2004.

VISSCHER, P. M. *et al.* Five years of GWAS discovery. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, n. 1, p. 7-24, Jan.2012.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N.J. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. **Leprosy Review**, v. 79, n. 4, p. 372-386, Dec. 2008.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N.J. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 77-78, n. 1, p. 103-121, Nov. 2006.

WALKER, S. L.; WATERS, M. F. R.; LOCKWOOD, D. N.J. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. **Leprosy Review**, v. 78, n. 3, p. 197-215, Sep. 2007.

WANG, D. *et al.* Genetic variants of the *MRC1* gene and the *IFNG* gene are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. **Human Genetics**, v. 131, n. 7, p. 1251-1260, July 2012.

WANG, W. Y. S. *et al.* Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 2, p. 109-118, Feb. 2005.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy**: Plan Period: 2011-2015. New Delhi, 2009. 28p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guide to eliminate leprosy as a public health problem**. Geneva, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leprosy prevalence rates, data reported to WHO as of beginning January 2011**. Disponível em <http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2010.pdf>. Acesso em: 20 set. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 83, n. 33, p. 293-300, Aug. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v. 87, n. 34, p. 317-328, Aug. 2012a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Expert Committee in leprosy: Sixth Report**. Geneva, 1988. 52 p.

YAMAMURA, M. *et al.* Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277-279, Oct. 1991.

ZHANG, F.R. *et al.* Genomewide association study of leprosy. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 27, p. 2609-2618, Dec. 2009.

Apêndice

APÊNDICE A – Formulário para coleta de dados clínicos e epidemiológicos do caso-índice

IDENTIFICAÇÃO		
Data da entrevista: ____/____/____		Município:
Unidade de saúde/PSF:		
Nome completo:		
Endereço atual (rua, número e bairro):		
CEP:	Fone: ()	Celular: ()
Idade:	Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	Data de nascimento: ____/____/____
Estado civil: <input type="checkbox"/> solteiro <input type="checkbox"/> casado <input type="checkbox"/> separado <input type="checkbox"/> divorciado <input type="checkbox"/> viúvo <input type="checkbox"/> amasiado <input type="checkbox"/> Outros. Especificar: _____		
Cor da pele: <input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Índio <input type="checkbox"/> Oriental		
Naturalidade:		Estado:
Há quanto tempo reside neste endereço?		
Endereço anterior (rua, número e bairro):		<input type="checkbox"/> Não se aplica
Município:		Estado:
Quanto tempo morou no endereço anterior?		
Nome do pai:		
Nome da mãe:		
Endereço dos pais (rua, número e bairro):		
Município/UF:	Fone: ()	Celular: ()
DADOS DO DOMICÍLIO		
Número de pessoas que residem neste endereço:		
Número de cômodos do domicílio:	Número de dormitórios:	

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	
Mais algum morador da residência tem/teve hanseníase? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quantos? _____	
Além da hanseníase, o(a) Sr.(a) tem ou teve outra(s) doença(s)? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Especificar: _____	
Faz uso de algum medicamento regularmente? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Especificar: _____	
Tem algum tipo de alergia? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Especificar: _____	
Cicatriz vacinal de BCG: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2	Data do diagnóstico: ____/____/____
INFORMAÇÕES CLÍNICAS	
Presença de lesões na pele: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quantas? _____	
Morfologia das lesões	
Manchas hipocrômicas	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quantas? _____ <input type="checkbox"/> Ignorado
Áreas referidas hipo/anestésicas:	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quantas? _____ <input type="checkbox"/> Ignorado
Placas (lesões planas com \geq 1cm):	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quantas? _____ <input type="checkbox"/> Ignorado
Pápulas (pequenas elevações < 1cm):	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quantas? _____ <input type="checkbox"/> Ignorado
Nódulos (lesões palpáveis \geq 1 cm):	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quantas? _____ <input type="checkbox"/> Ignorado
Infiltração difusa:	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quantas? _____ <input type="checkbox"/> Ignorado
Espessamento neural:	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim. Quantas? _____ <input type="checkbox"/> Ignorado
Forma clínica (Madri): <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> Ignorada	
Forma clínica (Ridley-Jopling): <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> TT <input type="checkbox"/> BT <input type="checkbox"/> BB <input type="checkbox"/> BL <input type="checkbox"/> LL <input type="checkbox"/> Ignorada	
Classificação operacional: <input type="checkbox"/> Paucibacilar <input type="checkbox"/> Multibacilar	
Grau de incapacidade física – diagnóstico: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> Ignorado	Grau de incapacidade física – alta: <input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> Ignorado
Localização da(s) incapacidade(s) (assinalar uma ou mais alternativas): Olhos: <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E Mãos: <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E Pés: <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E	
Baciloscopia: <input type="checkbox"/> Não realizada <input type="checkbox"/> Ignorada <input type="checkbox"/> Realizada. Resultado: _____	
Presença de reação: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Ignorada <input type="checkbox"/> Sim. Qual? <input type="checkbox"/> Tipo 1 – RR <input type="checkbox"/> Tipo 2 – ENH <input type="checkbox"/> Não especificada	

APÊNDICE C - 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 punccionados 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 punccionada 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 D - Protocolo de extração de DNA por “salting”

Material: sangue total

Volume utilizado: 2 mL

1. Distribuir 10 mL de tampão TE em tubos cônicos de 15 mL.
2. Adicionar 2 mL de sangue total a cada tubo.
3. Centrifugar a 2500 rpm (\square 1000 g) por 20 minutos.
4. Verter o sobrenadante.
5. Repetir este processo 2 ou 3 vezes descartando o sobrenadante e completando o volume para 10 mL com tampão TE.
6. Verter o sobrenadante.
7. Adicionar 600 μ L de tampão de lise, 80 μ L de SDS 10% e 9 μ L de proteinase K (solução a 25 mg/mL) e homogeneizar no vórtex.
8. Incubar a 37°C durante a noite.
9. Adicionar 200 μ L de solução de acetato de sódio saturada e homogeneizar no vórtex.
10. Centrifugar a 2500 rpm (\square 1000 g) por 20 minutos.
11. Transferir o sobrenadante para outro tubo cônico de 15 mL.
12. Adicionar etanol absoluto (2 vezes o volume obtido) e misturar por inversão até que o DNA precipite.
13. Recolher o DNA precipitado e transferir para um tubo de 500 μ L.
14. Adicionar 200 μ L de etanol 70 %.
15. Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos.
16. Descartar o sobrenadante.
17. Deixar o tubo invertido por 30 minutos para evaporar o restante do etanol.
18. Ressuspender o DNA em 100 μ L de TE (5mM Tris ; 0,1 mM EDTA)
19. Deixar dissolver em banho-maria a 56°C.

Tampão TE para lise de hemácias

Concentração desejada	Solução estoque	Volume para 1 L de solução
Tris-HCL 10 Mm	1 M	10 mL
EDTA 1 mM	0,5 M	2 mL
Água Mili-Q	-	q.s.p 1 L

Estocar a temperatura ambiente.

Tampão de lise de núcleos

Concentração desejada	Solução estoque	Volume para 100 mL de solução
Tris-HCL 10 mM	1 M (pH 8.0)	1 mL
EDTA 2 mM	0,5 M (pH 8.0)	0,4 mL
NaCl 400 mM	5 M	8mL
Água Mili-Q	-	q.s.p 100 mL

Estocar a temperatura ambiente.

Solução de acetato de sódio saturada

Para 50 mL de solução.

- 1) Aquecer 50 mL de água.
- 2) Pesar aproximadamente 28 g de acetato de sódio anidro.
- 3) Adicionar o acetato de sódio aos poucos à água previamente aquecida.
- 4) Manter sob agitação constante em placa quente até que o sal dissolva por completo.

Estocar a temperatura ambiente.

OBS: Caso seja o acetato de sódio seja tri-hidratado deve ser utilizada a proporção de 40 g de sal para cada 40 mL de água quente.

Tampão TE para ressuspender as amostras

Concentração desejada	Solução estoque	Volume para 50 mL de solução
Tris-HCL 5 mM	1 M (pH 8.0)	0,25 mL
EDTA 0,1 mM	0,5 M (pH 8.0)	0,01 mL
Água Mili-Q	-	p.s.p. 50 mL

Estocar a temperatura ambiente.

Apêndice E – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



ESCOLA DE ENFERMAGEM

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

(Crianças de 7 a 12 anos)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase em municípios da microrregião de Almenara, MG” por morar em um município com casos registrados de hanseníase.

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, causada por uma bactéria. Seus principais sinais e sintomas são lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem evoluir para incapacidades e deformidades físicas. Essa doença é transmitida através do contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa sadia, por meio das vias aéreas. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio freqüente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso concorde em 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 meio de punção venosa no braço, utilizando material estéril e descartável, que visa evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos deste procedimento são mínimos e podem estar associados à punção venosa (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido).

Através dos resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença através da previsão do risco de adoecer e/ou desenvolver suas formas clínicas mais graves.

Os materiais e dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores especificamente 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 segredo das informações.

A sua participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. A recusa não trará nenhum prejuízo em 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 remuneração por sua 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.

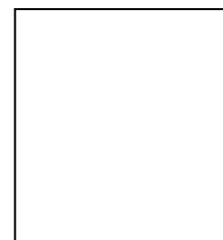
Seu responsável também assinará este termo, declarando que também entendeu os objetivos, riscos e benefícios de sua participação na pesquisa e autorizando sua participação.

Nome do Participante: _____

Assinatura: _____

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

Evaldo Pinheiro Amaral
Pesquisador Responsável
Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia
Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG
CEP: 30130-100 Tel: (31) 3409-9862

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG)
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005
Belo Horizonte – MG - CEP: 31270-901 Tel: (31) 3409-4592



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE
(Crianças de 13 a 17 anos de idade – Cópia da criança)**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase em municípios da microrregião de Almenara, MG” por morar em um município com casos registrados de hanseníase.

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, causada por uma bactéria. Seus principais sinais e sintomas são lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem evoluir para incapacidades e deformidades físicas. Essa doença é transmitida através do contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa sadia, por meio das vias aéreas. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio freqüente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso concorde em 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 meio de punção venosa no braço, utilizando material estéril e descartável, que visa evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos deste procedimento são mínimos e podem estar associados à punção venosa (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido).

Através dos resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença através da previsão do risco de adoecer e/ou desenvolver suas formas clínicas mais graves.

Os materiais e dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores especificamente 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 segredo das informações.

A sua participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. A recusa não trará nenhum prejuízo em 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 remuneração por sua participação nesta pesquisa.

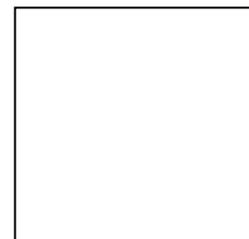
Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal e do Comitê de Ética da UFMG, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação a qualquer momento.

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

Evaldo Pinheiro Amaral
Pesquisador Responsável
Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia
Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG
CEP: 30130-100 Tel: (31) 3409-9862

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG)
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005
Belo Horizonte – MG - CEP: 31270-901 Tel: (31) 3409-4592



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE
(Crianças de 13 a 17 anos de idade – Cópia responsável)**

_____ está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase em municípios da microrregião de Almenara, MG” por morar em um município com casos registrados de hanseníase.

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, causada por uma bactéria. Seus principais sinais e sintomas são lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem evoluir para incapacidades e deformidades físicas. Essa doença é transmitida através do contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa sadia, por meio das vias aéreas. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio freqüente e prolongado dessa pessoa com o doente.

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

Em seguida, ele(a) será submetido 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 meio de punção venosa no braço, utilizando material estéril e descartável, que visa evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos deste procedimento são mínimos e podem estar associados à punção venosa (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido).

Através dos resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença através da previsão do risco de adoecer e/ou desenvolver suas formas clínicas mais graves.

Os materiais e dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores especificamente 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 segredo das informações.

A participação é voluntária e a qualquer momento vocês poderão desistir de participar e retirar o consentimento. A recusa não trará nenhum prejuízo à relação de vocês com o pesquisador ou com a instituição.

Este estudo não trará nenhum custo para vocês e todos os procedimentos serão realizados gratuitamente. Não haverá remuneração 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: _____



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

Evaldo Pinheiro Amaral
Pesquisador Responsável
Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia
Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG
CEP: 30130-100 Tel: (31) 3409-9862

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG)
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005
Belo Horizonte – MG - CEP: 31270-901 Tel: (31) 3409-4592



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE
(Adulto)**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase em municípios da microrregião de Almenara, MG” por morar em um município com casos registrados de hanseníase.

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, causada por uma bactéria. Seus principais sinais e sintomas são lesões na pele e nos nervos. Quando ela não é tratada, essas lesões podem evoluir para incapacidades e deformidades físicas. Essa doença é transmitida através do contato de uma pessoa doente e sem tratamento com outra pessoa sadia, por meio das vias aéreas. Para que a transmissão ocorra, geralmente é preciso que haja um convívio freqüente e prolongado dessa pessoa com o doente.

Caso concorde em 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 meio de punção venosa no braço, utilizando material estéril e descartável, que visa evitar ou diminuir a ocorrência de infecção. Os riscos deste procedimento são mínimos e podem estar associados à punção venosa (pequeno hematoma, dor ou desconforto rápido).

Através dos resultados deste estudo, espera-se obter formas mais eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença através da previsão do risco de adoecer e/ou desenvolver suas formas clínicas mais graves.

Os materiais e dados coletados serão de uso exclusivo da equipe de pesquisadores especificamente 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 segredo das informações.

A sua participação é voluntária e a qualquer momento você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. A recusa não trará nenhum prejuízo em 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 remuneração por sua 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: _____

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

Evaldo Pinheiro Amaral
Pesquisador Responsável
Av. Alfredo Balena, 190 - Bairro Santa Efigênia
Escola de Enfermagem - Belo Horizonte - MG
CEP: 30130-100 Tel: (31) 3409-9862

Endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG)
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - sala 2005
Belo Horizonte – MG - CEP: 31270-901 Tel: (31) 3409-4592

Anexos

ANEXO A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0454.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Francisco Carlos Félix Lana
Depto. de Enfermagem Materno Infantil e Saúde Pública
Escola de Enfermagem - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 1º. de dezembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise da influência de fatores genéticos na suscetibilidade à hanseníase em municípios da microrregião de Almenara, Minas Gerais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG